



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA
A LA TOXINA PET DE *Escherichia coli* EN MACRÓFAGOS
HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
DIANA ROJAS BAÑOS.



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

VOCAL: Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRON RUÍZ

SECRETARIO: Profesor: LUZ MARÍA ROCHA RAMÍREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: SANTIAGO ÁVILA RÍOS

2° SUPLENTE: Profesor: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo fue realizado en el **laboratorio de Virología** perteneciente al **Departamento de Infectología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”** en colaboración con el **Departamento de Salud Pública, División de Posgrado Facultad de Medicina, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LUZ MARÍA ROCHA RAMÍREZ

SUSTENTANTE:

DIANA ROJAS BAÑOS

Este trabajo fue financiado por el **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)** con número de convenio **82755** y también por el apoyo a proyectos de investigación (**Fondos Federales**) registros: **HIM-2010-010 y HIM-2011-007**.

“Ten el valor de vivir, que morir, lo sabe hacer cualquiera”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bendición, por permitirme realizar un sueño más en mi vida y por siempre estar a mi lado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la oportunidad que me brindaron de formar parte de su comunidad y ser parte importante en mi formación académica.

A la Dra. Luz María Rocha Ramírez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio desde que inicié este camino, por sus consejos y enseñanzas que han contribuido de manera importante a mi formación.

Al Dr. Carlos Eslava, por la confianza brindada, por todas las enseñanzas y consejos a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Ulises Chiñas por compartir sus experiencias y comentarios para mejorar este trabajo.

A mí jurado por el apoyo que me brindo para mejorar este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Inmunoquímica del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", a la Química Araceli Santos, por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por la accesibilidad a sus equipos e instalaciones pero sobre todo por la amistad brindada.

Al laboratorio de Virología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

***"Casi todo lo que realice será insignificante,
pero es muy importante
que lo haga"***

DEDICATORIAS

A mis padres, por el regalo tan maravilloso que me pudieron brindar "la vida".

*A mi hermano Daniel,
por motivarme a la superación.*

A mi familia, porque aunque muchas veces no entendían que era lo que hacía realmente, me apoyaron en todo momento.

A mis amigos, por su amistad brindada durante todos estos años, por su apoyo y por haber estado ahí siempre.

A Marlen, por formar parte importante de mi vida universitaria, y ayudarme a mejorar la impresión de este trabajo.

A Adriana, por todo este tiempo juntas en el laboratorio y todas las experiencias que hemos adquirido.

Y a todas las personas con las que me he cruzado en este maravilloso camino y que de una u otra forma participaron para llegar a este momento.

CONTENIDO.

I. ÍNDICE DE FIGURAS	i
II. ÍNDICE DE TABLAS	ii
III. ABREVIATURAS	iii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Características generales de <i>Escherichia coli</i>	2
2.2 Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>	3
2.3 Análisis de los eventos moleculares asociados a la patogenicidad y virulencia de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	5
2.4 El papel de la toxina Pet (enterotoxina codificada en el plásmido) como miembro del grupo de las SPATEs (Proteínas autotransportadoras de serina-proteasa) de <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.5 Inflamación y la respuesta inmune innata del hospedero.....	12
2.6 Inflamación inducida por <i>Escherichia coli</i> , sus PAMPs y la señalización por activación del receptor de TLR4 y TLR5	16
3. ANTECEDENTES	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
5. JUSTIFICACIÓN	24
6. HIPÓTESIS	25
7. OBJETIVOS	26
7.1. Objetivo general.....	26
7.2. Objetivos específicos	26
8. MATERIAL Y MÉTODOS	27
8.1. Reactivos.....	27
8.1.1. Material Biológico	27
8.1.2. Medios de Cultivo Celular.....	27
8.2. Métodos.....	27
8.2.1. Condiciones de crecimiento de la cepa de <i>Escherichia coli</i> HB101 (pCEF1)	27
8.2.2. Extracción de la toxina Pet de <i>Escherichia coli</i> HB101 (pCEF1).	28
8.2.3. Cuantificación de Endotoxina (ensayo de <i>Limulus</i>)	30

8.2.4. Determinación de Proteínas por método de Bradford.....	30
8.2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), tinción de coomassie, tinción de plata y reconocimiento Ag-Ac por inmunoelectrotransferencia (Western-Blot) revelado por BCIP/NBT y quimioluminiscencia	31
8.2.6. Obtención y procesamiento de células mononucleares derivadas de sangre periférica.....	33
8.2.7. Determinación de viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano y cuantificación de células en hematocitometro (cámara de neubauer).....	34
8.2.8. Separación de células adherentes (monocitos) por adherencia a vidrio y diferenciación a macrófago.....	34
8.2.9. Ensayo de la migración dirigida (quimiotaxis) en respuesta a la toxina Pet en macrófagos humanos por cámara de Boyden.....	36
8.2.10. Cuantificación de IL-8, TNF- α , e IL-10 humanas por el método de ELISA en macrófagos humanos tratados con Pet.....	38
8.2.11. Activación de NF- κ B (p65) por inmunofluorescencia indirecta.....	39
8.2.12. Análisis estadístico	40
9. RESULTADOS	41
9.1. Determinación de Endotoxina (ensayo de <i>Limulus</i>).....	41
9.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en la toxina Pet.....	41
9.3. Caracterización inmunoquímica de la toxina Pet de <i>Escherichia coli</i>	43
9.4. Efecto de la toxina Pet sobre la migración dirigida (quimiotaxis) de macrófagos humanos.....	45
9.5. Producción de IL-8, TNF- α e IL-10 por macrófagos humanos tratados con proteína Pet de <i>Escherichia coli</i>	46
9.6. Evaluación de toxina Pet en la translocación del factor nuclear NF- κ B.....	50
10. DISCUSIÓN	53
11. CONCLUSIONES	60
12. PERSPECTIVAS	61
13. BIBLIOGRAFÍA	62
14. APÉNDICE	73

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de colonización de <i>Escherichia coli</i> patógena.....	4
Figura 2. Mecanismos moleculares de la toxina Pet en la <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	7
Figura 3. Modelo tridimensional de la proteína Pet de <i>Escherichia coli</i>	9
Figura 4. Análisis filogenético de las SPATEs	10
Figura 5. Estructura, mecanismos de secreción, translocación citoplasmica e interacción con blancos a la proteína Pet de EAEC y la EspC en EPEC	11
Figura 6. Componentes de la respuesta inflamatoria	13
Figura 7. Las vías principales de patogénesis de EAEC	20
Figura 8. Proceso de extracción de la toxina Pet de <i>Escherichia coli</i> clona HB101 (pCEF1)	29
Figura 9. Obtención de células mononucleares	33
Figura 10. Proceso de diferenciación de monocito a macrófago	35
Figura 11. Cámara de Boyden de doble filtro (ensayo de quimiotaxis).....	36
Figura 12. Ensayo de lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).	41
Figura 13. Curva estándar de BSA	42
Figura 14. Perfil electroforético revelado con azul de coomasie y tinción de plata.....	43
Figura 15. Caracterización de la toxina Pet por inmunotransferencia (Western-blot).....	44
Figura 16. Efecto de la toxina Pet sobre la migración dirigida (quimiotaxis) en MDM	45
Figura 17. Evaluación de la síntesis de IL-8 inducida por la proteína Pet en MDM durante 6 y 24 horas de estimulación	46
Figura 18. Efecto de Pet sobre la producción de TNF- α en MDM	47
Figura 19. La síntesis de TNF- α inducida por la toxina Pet en los MDM no se inhibe al tratamiento de polimixina B.....	48
Figura 20. Secreción de IL-10 en MDM tratados con toxina Pet de <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 21. Microscopia confocal a la activación de NF- κ B	51
Figura 22. Activación de NF- κ B por inmunofluorescencia	52
Figura 23. Respuesta inmune innata a la toxina Pet de <i>Escherichia coli</i>	59

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia expresados en la cepa prototipo EAEC O42.....	5
Tabla 2. Ensayo de <i>Limulus polyphemus</i>	30
Tabla 3. Método de Bradford.....	31
Tabla 4. Determinación de la concentración de proteínas en la toxina Pet.....	42

III. ABREVIATURAS

Pet	Toxina codificada en el plásmido
SPATEs	Serin proteasas autotransportadas de la familia Enterobactereace
MN	Células mononucleares
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato de toluidina
NBT	Nitro azul de tetrazolio
IL	Interleucina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
EXPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena extra-intestinal
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa
CDEC	<i>Escherichia coli</i> que desprende células
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causante de meningitis

HEp-2	Línea celular de carcinoma laríngeo humano
AA	Adherencia agregativa
pb	Pares de bases
ShET 1	Enterotoxina-1 de <i>Shigella</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
OMP	Proteína de membrana externa
PM	Peso molecular
KDa	Kilodaltones
WB	Western blot
AT	Autotransportadora
SAT	Serin proteasa autotransportadora
EspP	Serin proteasa extracelular codificada en el plasmido
SigA	Serin proteasa secretada por <i>Shigella flexneri</i>
Pic	Proteína involucrada en la colonización
SepA	Proteína extracelular de <i>Shigella</i>
EspC	Proteína C secretora de EPEC
TLRs	Receptor tipo Toll
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
AMP	Péptidos antimicrobianos
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
AAF	Fimbrias de adherencia agregativa
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácidos lipoteicos

MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitogenos
IKK	Cinasa del I κ B
CL	Caldo luria
AL	Agar luria
FPLC	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas
BSA	Albumina sérica bovina
ZAS	Zimosan activado por suero
DMSO	Dimetilsulfóxido
EU/ml	Unidades de endotoxina por mililitro
PBS	Solución buffer de fosfatos
nm	Nanómetros
min	Minutos
h	Horas
μ l	Microlitros
pcg	Picogramos
°C	Grado centígrado
ORF	Marco abierto de lectura
CaCo-2	Línea celular de carcinoma colónico humano
Hela	Línea celular de cáncer cérvico-uterino
J774	Línea celular de macrófagos de ratón

1 RESUMEN

La toxina Pet miembro de la subfamilia SPATEs se ha relacionado con la virulencia de *E. coli*. Datos de la necropsia de un niño muerto a consecuencia de la infección por *E. coli* enteroagregativa productora de Pet, muestran una reacción inflamatoria severa con daño importante del tejido. En esta respuesta los macrófagos son células del sistema inmune innato que al activarse secretan diversos mediadores pro- y anti-inflamatorios (citocinas), parte de estos mediadores facilitan el control de las infecciones bacterianas; aunque también están involucrados en el daño de la mucosa intestinal. En este trabajo utilizando un modelo *in vitro*, se analizó si la toxina Pet de *E. coli* enteroagregativa era capaz de activar macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana. La toxina Pet se purificó por columna de afinidad y se caracterizó por análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western-blot. A partir de concentrados leucocitarios (Buffy coat) de donadores sanos se obtuvieron células mononucleares (MN) por gradiente (Lymphopred). Alícuotas de 60 µl que contenían 15×10^6 células MN se adicionaron a cubreobjetos de 0.9 mm de diámetro y se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%. Después de 2 horas de incubación, las células adherentes (monocitos) se dejaron en cultivo para su diferenciación a macrófagos. Posteriormente se trataron con Pet (0-20µg/ml) y se evaluó: 1) la migración celular dirigida (quimiotaxis) por método de Boyden a los 90 minutos de tratamiento con Pet, 2) la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-8 y TNF-α) y anti-inflamatorias (IL-10) después de 6 y 24 horas por método de ELISA 3) la translocación del factor nuclear NF-κB evaluado por inmunofluorescencia indirecta a los 30 minutos de estimulación con la toxina, empleando un anticuerpo policlonal anti-conejo dirigido a la proteína p65. Los resultados mostraron que Pet induce efecto quimioatrayente en macrófagos con actividad similar al inducido por un estímulo de zymosan opsonizado (25 cél/campo vs 18 cél/campo tratadas con Pet). El análisis de la producción de interleucinas mostro la síntesis significativa de IL-8 y TNF-α. Así como la translocación de p65 en porcentaje mayor del 50% comparado a los macrófagos no tratados. Con respecto a la síntesis de IL-10, esta solo se observó a tiempos cortos de estimulación, por lo que estos datos sugieren que Pet induce la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-8 y TNF-α) tempranamente, y tiene efecto quimiotáctico a macrófagos; con la participación de la activación de la proteína p65 del factor nuclear NF-κB. Los resultados obtenidos muestran que Pet activa los mecanismos de la respuesta inmune innata, posiblemente a través de la polarización de respuesta TH1.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Características generales de *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria comensal de la biota intestinal de diferentes especies animales incluido el humano, es anaerobio facultativo y presenta movilidad a través, de sus flagelos peritricos (que rodean su cuerpo). No forma esporas, fermenta glucosa y lactosa, además coadyuva en el proceso de fermentación oxidativa para la síntesis de vitaminas K y B **(Bentley et al, 1982)**.

E. coli forma parte de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, es quizás el organismo procarionte más estudiado por el humano, es un organismo unicelular que coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido pocas horas después del nacimiento; sin embargo, establece una relación de mutualismo con su hospedero por tiempo indefinido **(Kaper et al, 2004)**.

E. coli es una bacteria con gran plasticidad genética, altamente adaptable y vía transferencia horizontal pueden adquirir “DNA extraño” que aumentan la capacidad de adaptación de la bacteria a nuevos nichos. Sin embargo dicho material también puede colaborar a la virulencia de la bacteria y causar daño a través de la síntesis de productos como: enterotoxinas, adhesinas y factores de invasividad. Por lo contrario, cuando la bacteria no adquiere elementos genéticos que se relacionen a factores de virulencia, la bacteria se mantiene como comensal. **(Nataro et al, 1998)**.

E. coli patógena es responsable de un amplio espectro de enfermedades en el hospedero. Hay tres síndromes clínicos principales que resultan de la infección con las cepas de *E. coli* patógena: la enfermedad entérica/diarreas, la infección del tracto genitourinario y la sepsis/ meningitis **(Nataro et al, 1998)**.

Las diferentes variedades de *E. coli* que causan enfermedad se han integrado en los llamados “*patotipos*” los que son clasificados de acuerdo a sus mecanismos de daño y sitio de colonización en el hospedero **(Kaper et al, 2004; Russo et al, 2000)**.

2.2 Grupos patógenos de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis diferentes tipos de patógenos (*patotipos*), cada uno definido por sus mecanismos de virulencia, incluida la adherencia (tipo de adhesinas), producción de toxinas y su capacidad de invasividad **(Matthew et al, 2010)**.

De tal manera que se agrupan como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigena (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, incluyendo a la de *Shigella*), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC). También, esta la propuesta de un grupo más que tiene la capacidad de desprender células en cultivo (CDEC); la importancia de esta última desde el punto de vista epidemiológico no está definida. Por otro lado, también se encuentra al grupo de las que producen infección extraintestinal como *E. coli* uropatogénica (UPEC) y la causante de meningitis neonatal (NMEC). Cada una de las variedades patógenas de *E. coli* coloniza un sitio específico en el hospedero, por lo que de manera consecuente y relacionado con sus propiedades de virulencia, cada uno de ellos desencadenan un cuadro clínico característico **(Figura 1)**.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), está definida como un patógeno oportunista; que se ha aislado de cuadros agudos de diarrea persistente en niños, de viajeros-turistas y de individuos inmunocomprometidos **(Harrington et al, 2006)**. La característica de EAEC es la capacidad para adherirse a células epiteliales de la línea HEP-2 en forma de ladrillo apilado **(Hiscks et al, 1996)**.

El genoma de la bacteria está integrado por un cromosoma circular de 5, 241,977 bp y de un plásmido (pAA) de 113,346 bp; en el plásmido se han identificado alrededor de 120 genes que codifican para distintas proteínas, entre ellas, la enterotoxina estable al calor (EAST-1) **(Savarino et al, 1993)** y la toxina Pet **(Eslava et al, 1998)**.

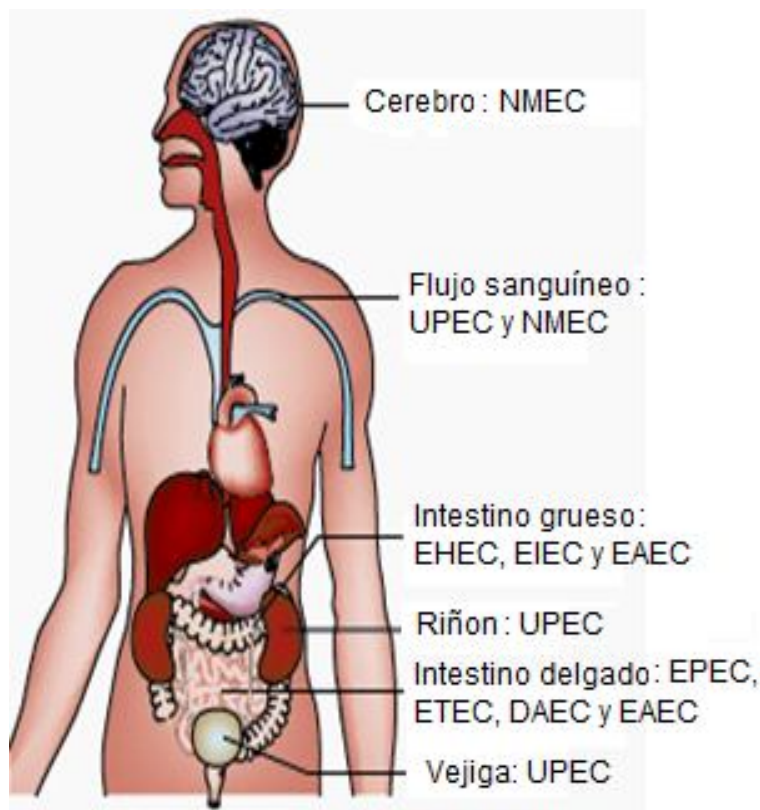


Figura 1. Sitios de colonización de *Escherichia coli* patógena.

E. coli patógena puede colonizar varios órganos en el hospedero humano, entre ellos están el cerebro, la vejiga y el intestino; puede causar infecciones muy graves como la meningitis neonatal (NMEC) infecciones crónicas de vías urinarias (UPEC) y las más comunes como las diarreas (ETEC, DAEC y EAEC).

Tomado de: Matthew et al, *Nat. Rev. Microbiol*, 2010;8:26-37.

En el cromosoma, la bacteria tiene los genes que codifican para Pic (proteína involucrada en la colonización), esta tiene actividad de mucinasa estrechamente relacionada a la toxina-1 de *Shigella* (ShET1) (Henderson et al, 1999).

Estudios recientes muestran la presencia en la bacteria de genes que codifican para hemolisina E (HlyE) con un nuevo sistema de secreción de tipo VI. En la **Tabla 1** se muestran los principales factores de virulencia identificados en la cepa EAEC O42 y sus respectivos sistemas de secreción de proteínas. Cada uno de estos componentes de virulencia está involucrado en los diferentes efectos de patogenicidad de la EAEC (Navarro et al, 2011).

Tabla 1. Factores de virulencia expresados en la cepa prototipo EAEC O42.

Factor de virulencia	Gene (s)	Sistema de secreción	Atributos	Mecanismo de acción
Toxina termoestable de <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAST-1)	<i>AstA</i>	?	Enterotoxina	Actividad enterotóxica debido a la activación de cAMP/cGMP
Toxina codificada en el plásmido (Pet)	<i>Pet</i>	Tipo 5	Enterotoxina	Inducción de efectos citotóxicos debido a la degradación de la α-fodrina
Proteína involucrada en la colonización (Pic)	<i>Pic</i>	Tipo 5	Mucinasas con actividad similar a lectina	Papel en la colonización intestinal del ratón y la inducción de la hipersecreción de moco
Enterotoxina Shigella 1 (ShET-1)	<i>Set1BA</i>	?	Enterotoxina	Actividad enterotóxica debido a la activación de cAMP/cGMP
Hemolisina E (HlyE)	<i>hlyE</i>	Tipo 1	Citolisina	Actividad hemolítica de los poros de formación y efectos citolíticos/citopáticos
Dispersina (Aap)	<i>Aap</i>	Tipo 1	Proteína anti-agregación	Promoción de la dispersión de EAEC a través de la mucosa intestinal
Factor de adherencia agregativa II (AAF/II)	<i>aafABCD/aggR</i>	Chaperona	Adhesina	Adhesión a la mucosa intestinal y la formación de mediadores de biofilm

Tomado de: Navarro-García F et al, *Gut Microbes*, 2010:2(1); 13-24.

2.3 Análisis de los eventos moleculares asociados a la patogenicidad y virulencia de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

Cada uno de los “patotipos” de *E. coli* se distingue por su epidemiología, patogénesis, variedad antigénica, cuadro clínico y su tratamiento. EAEC es una bacteria que fue descrita desde 1987, aislada de un niño de Chile con un cuadro de diarrea persistente (Nataro et al, 1995).

En la actualidad, EAEC está considerada como un patógeno emergente con un fenotipo de adherencia agregativa (AA) característico, observado en diferentes líneas de células epiteliales, (HEp-2 y Hela). Dicho patrón de adherencia ha sido asociado con el plásmido pAA de 55 a 65 MDa el cual lleva distintos genes putativos de virulencia entre ellos, la producción de distintas fimbrias y la síntesis de toxinas. (Pereira et al, 2008; Boisen et al, 2008). La patogénesis de la EAEC es compleja porque involucra principalmente, la colonización de la mucosa intestinal, la producción de una o más citotoxinas (Pet y Pic), además de enterotoxinas, que de estas últimas se incluye a la toxina estable al calor (EAST1) y la enterotoxina-1 de Shigella (ShET1) (Harrington et al, 2006).

En la primera fase del análisis de la patogénesis de esta bacteria, la adherencia a la mucosa intestinal es una etapa central en la colonización y la producción de la enfermedad por EAEC. El patrón característico de adherencia en EAEC es un contacto íntimo importante con las células del epitelio que también se ha observada en cultivo con células epiteliales y en modelos *in vivo* sobre la mucosa intestinal infectada con EAEC. En estudios previos, se ha demostrado que varias adhesinas tipo fimbrias de la membrana interna del patógeno, están involucradas en la adherencia a la mucosa intestinal **(Dudley et al, 2006)**.

EAEC se adhiere a las células (enterocitos) de la mucosa intestinal formando un acumulo de células bacterianas o también llamada biopelícula (*biofilm*) compuesto por agregados de bacterias, adicionados de una capa mucoide y con efectos tóxicos sobre la mucosa intestinal (intestino delgado y grueso). Este efecto de adherencia puede llevar a la diarrea en el hospedero; aunque el mecanismo de patogenicidad no es del todo claro **(Tzipori et al, 1992)**.

No obstante, a través de su adherencia agregativa, y de sus fimbrias principalmente la fimbria de adherencia agregativa (AAF), o también la síntesis de ciertas proteínas de la membrana interna (OMP) de pesos moleculares (PM) entre 18 y 59 KDa estimulan una fuerte respuesta inflamatoria, con producción de IL-8, y la formación del *biofilm* sobre la superficie de las células epiteliales. **(Debroy et al, 1995; Steiner et al, 1998)**.

En el colón, la infección por la EAEC además de la intensa respuesta inflamatoria produce también efectos citotóxicos sobre las micro vellosidades de las criptas y aumento de las extensiones de las células epiteliales. Uno de los principales estudiados es el AggR, un factor de virulencia que controla la expresión de factores de adherencia entre ellos el AAF que producen moco **(Figura 2) (Knutton et al, 1992; Suzart et al, 2001)**.

Sin embargo, otras moléculas son participantes importantes en dicho evento, entre ellas, la proteína denominada dispersina, la cual tiene un efecto antiagregativo **(Sheikh et al, 2002) (Figura 2)**.

La dispersina, es una proteína de 10.2 KDa que se ha identificado en el 80% de los aislados de EAEC (Nishi et al, 2003). Esta proteína es exportada por un cassette de ABC/ATP y la proteína parece regular al complejo de Aat, así también es responsable de mediar como su nombre lo indica, la dispersión de EAEC a través de la mucosa intestinal para permitir una eficiente adherencia y agregación de la bacteria. Dicha proteína además neutraliza la carga negativa del LPS y permite que el AAF se active; la dispersina también es altamente inmunogénica y se ha considerado como posible candidato de vacuna (Velarde et al, 2007). La expresión de AFF y la dispersina requieren del AggR (activador transcripcional de la familia de Arac).

Otras proteínas, como la toxina Pet, también pueden intervenir de manera importante en la interacción con la mucosa intestinal y su expresión intracelular es acompañada por la ruptura de proteínas como es la espectrina (proteína del citoesqueleto) (Villaseca et al, 2000; Monteiro et al, 2009).

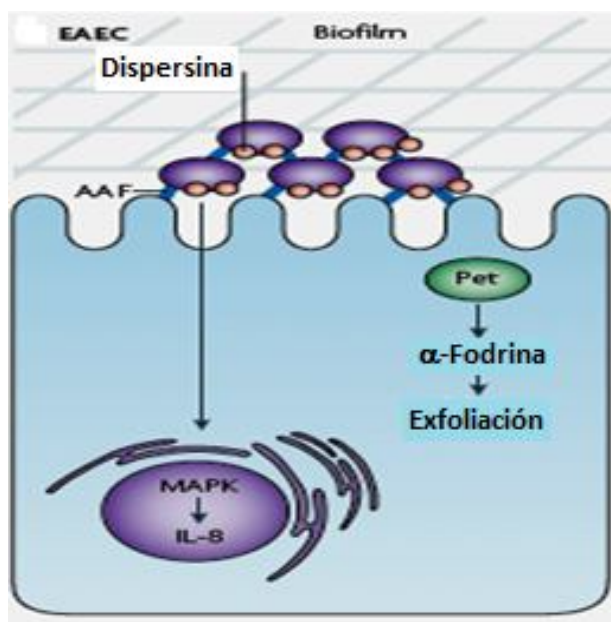


Figura 2. Mecanismos moleculares de la toxina Pet en la *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). La toxina codificada en el plásmido (Pet) es una serina proteasa autotransportadora de Enterobacteriaceae (SPATEs) la cual tiene un efecto lítico sobre la α -fodrina (también conocida como SPTAN1). El efecto de Pet en la fodrina conduce a un desorden de la proteína de actina del citoesqueleto e induce una importante exfoliación en la célula. Así mismo, la formación de la biopelícula (*biofilm*) favorece la adherencia y estos eventos llevan a la producción de citocinas inflamatorias principalmente IL-8, modulado por la señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK).

Tomado de: Matthew et al, *Nat Rev Microbiol*, 2010;8;26-38.

En estudios *in vitro* la estimulación con la toxina Pet (de forma purificada) ha demostrado la elongación, el redondeo de las células y la exfoliación de sustratos (**Figura 2**).

Estos efectos son acompañados por estrés en las fibras de actina; por lo que la toxina Pet juega un papel muy importante que involucra a uno de los principales miembros de las proteínas SPATES y que contribuyen a la patogénesis asociada a estas bacterias (**Bennett et al, 1993; Djabali et al, 1999**).

2.4 El papel de la toxina Pet (enterotoxina codificada en el plásmido) como miembro del grupo de las SPATEs (Proteínas autotransportadoras de serina-proteasa) de Enterobacteriaceae.

La familia de las SPATEs (*serina-proteasa-autotransportadora de la familia enterobacteriaceae*) representan a un subgrupo de proteínas autotransportadoras (AT) que poseen un dominio consenso de serina-proteasa (**Herdenson et al, 2004**). Estas proteínas se han identificado en diferentes *E. coli* patógenas y contribuyen a la capacidad de virulencia de la bacteria. Las SPATEs son las proteínas AT mejor caracterizadas y poseen un rango de funciones biológicas importantes, incluidas sus propiedades de citotoxicidad (**Brunder et al, 1997; Eslava et al, 1998**) y algunas de ellas con actividad de mucinasa (**Guyer et al, 2002; Mellies et al, 2001**).

Las proteínas clasificadas como SPATEs constituyen un grupo de proteasas similares a tripsina y quimiotripsina que también son secretadas por EAEC y otros patógenos como *Shigella ssp*, *E. coli uropatógena* y otras *E. coli* del grupo diarreogénico (DEC) *Citrobacter* y *Salmonella*. Las SPATEs son exoproteínas que exhiben funciones de virulencia. (**Huang et al, 2004**).

Dichas toxinas son traslocadas a través de vía de autotransporte de la membrana externa en el cual la translocación requiere un dominio carboxilo terminal estructurado en forma de beta barril (**Figura 3**).

La región amino terminal de la toxina del grupo de las SPATEs en su forma madura, presenta una estructura típica de proteasas de serina terminal con PM entre 104 a 110 KDa; con un dominio catalítico; así mismo una región conservada con motivos en beta-hélice (la cual se presenta en todas las proteínas autotransportadoras) (Herderson et al, 2004) y se ha propuesto un modelo tridimensional a dicha proteína (Figura 3).

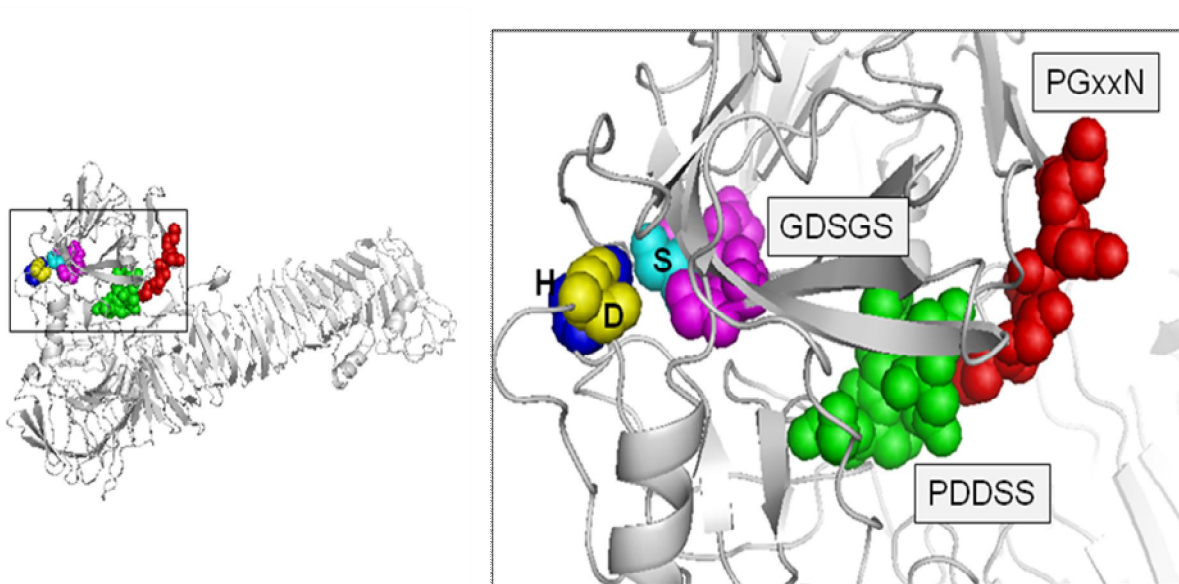


Figura 3. Modelo tridimensional de la proteína Pet de *Escherichia coli*.

Usando programa de Modeller 9v2 y la estructura previamente descrita de HBp, se propone la estructura tridimensional de la proteína Pet, se observan los motivos PDDSS y PGXXN entre otros.

Tomado de: Hernández-Chiñas et al, *Peptides*, 2009:30; 2117-35.

La familia de SPATEs ha sido organizada filogenéticamente dentro de dos clases: Los miembros de la clase I SPATEs (incluida la toxina de Pet). Estas proteínas, en su mayoría tienen actividad citotóxica sobre células epiteliales y actividad proteolítica para algunos sustratos entre ellos la mucina, la pepsina, factor V de la coagulación y la espectrina de los eritrocitos (Dutta et al, 2002) (Figura 4).

Además de la toxina Pet también en este grupo se incluye a la proteína EspP de EHEC, EspC de EPEC, la toxina SigA de *Shigella flexneri* y la proteína Sat de *E. coli uropatógena* y DAEC (Figura 4).

Al respecto del grupo clasificado como clase II de SPATEs, este es más diverso; y tiene efectos líticos importantes sobre la mucina, un ejemplo de este grupo es Pic presente en EAEC y *Shigella* que promueve la colonización intestinal vía un mecanismo todavía no determinado (Henderson et al, 1999; Harrington et al, 2009).

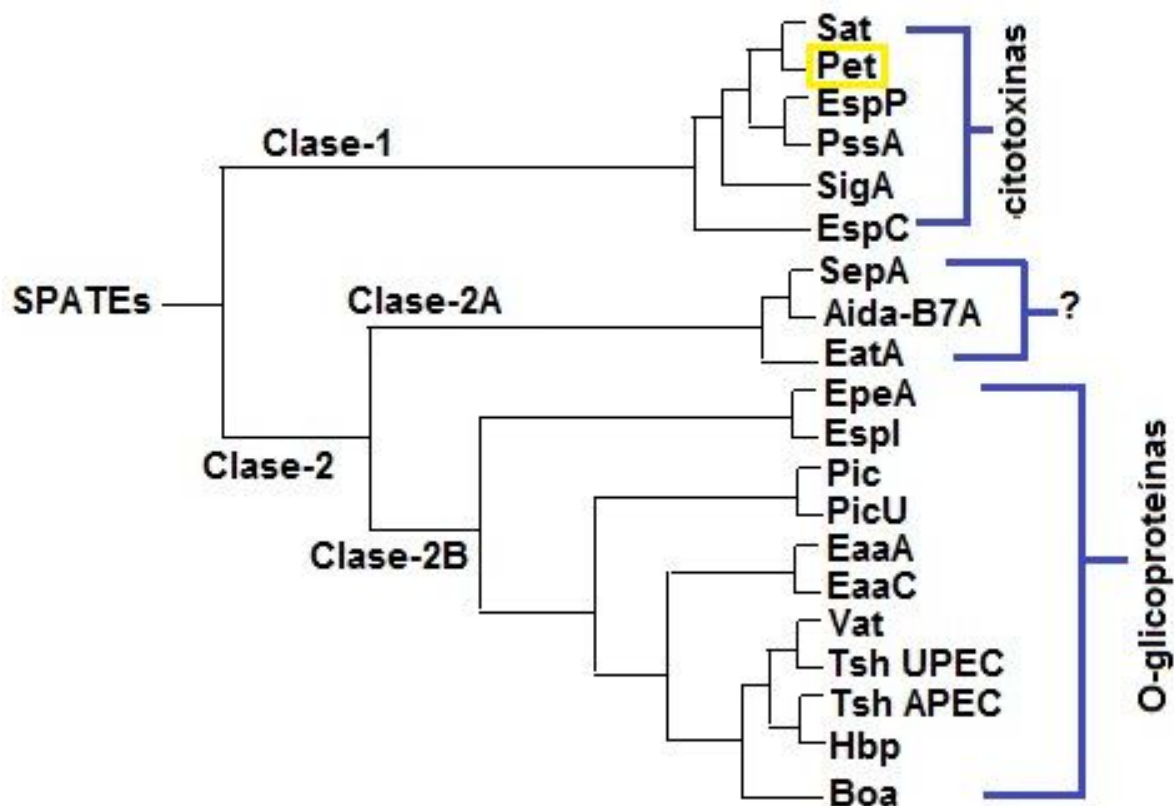


Figura 4. Análisis filogenético de las SPATEs.

En este grupo de proteínas se incluyen a dos subfamilias de la clase 2 de SPATEs, la cual puede subdividirse además en otro subgrupo importante, la (clase 2b), incluidas las oligoglicoproteínas.

Modificado de: Pérez et al, Material suplementario PNAS 2011:108(31); 12881-128.

Cerca del 86% de las cepas de EAEC presentan genes que codifican para una o más SPATEs (Pet, Pic, Sat, EspP o SigA). Las proteínas EspC y Pet son toxinas secretadas principalmente por EPEC y EAEC. Ambas toxinas tienen un PM de 110 KDa (y son parte del grupo de las SPATEs).

Así también, ambas toxinas tienen acciones importantes dentro del citosol de células epiteliales y son capaces de destruir la arquitectura de la actina del citoesqueleto de las células. Este efecto entero-tóxico y citopático involucra el rompimiento de la fodrina (proteína que une a la actina) (Navarro et al, 1999; Villaseca et al, 2000).

No obstante, el rompimiento de la fodrina, por la toxina Pet y la EspC se asocia a sitios de reconocimiento distintos. EspC y Pet también usan sistemas de secreción tipo V que exportan al espacio extracelular a la proteína. (Navarro et al, 2010) (Figura 5).

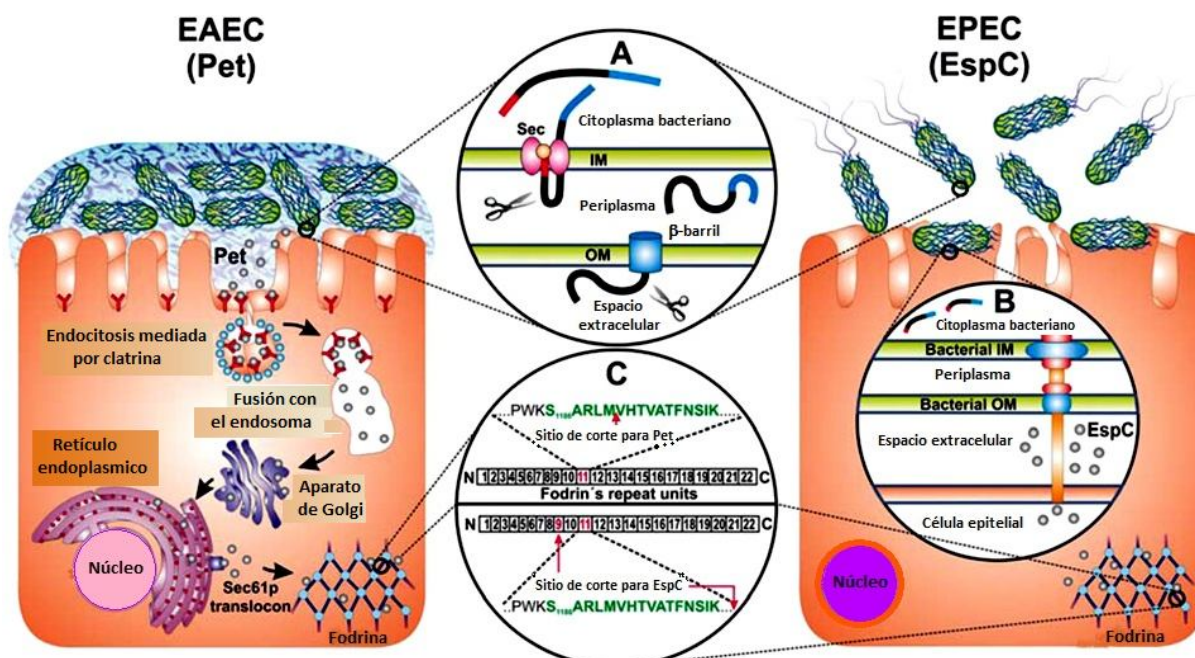


Figura 5. Estructura, mecanismos de secreción, translocación citoplasmica e interacción con blancos a la proteína Pet de EAEC y la EspC en EPEC. La estructura y secreción de Pet y EspC es través del sistema de secreción tipo V (T5SS) (circulo A). Así también la toxina puede ser endocitada e inducir un tráfico intracelular importante en líneas epiteliales. Por otro lado, EspC puede translocarse a través de la cooperación del sistema de secreción tipo V y el sistema de secreción tipo III (circulo B) y ambas toxinas presentan diferentes sitios de rompimiento de la proteína de fodrina (circulo C).

Tomado de: Navarro-García F et al, *Toxins (Basel)*, 2010:2(5); 1134-47.

Las toxinas Pet y la EspC tienen organización estructural similar; por análisis in Silico esta propuesto que la secuencia líder de Pet está presente entre los residuos de aminoácido A52 y A53, y que el sitio de unión de la proteína madura es localizado entre los residuos N1080 y N1009 (Eslava et al, 1998).

El dominio pasajero de la proteína Pet secretada es además una proteína de 104 KDa que es asociada a una Pet naciente de entre 53 y 1018 aminoácidos; siendo en el caso de EspC, la secuencia del péptido líder de una extensión del aminoácido 54 a 1030 aminoácidos. Los motivos de serina proteasa de Pet (GDSGS260G) y EspC (GDSGS256G) son idénticos pero difieren en el sitio activo del residuo de serina dentro del dominio pasajero **(Figura. 5). (Stein et al, 1996; Vidal et al, 2008).**

La gran contribución de la proteína y toxina Pet es la inducción del daño citotóxico y citopático en la mucosa intestinal; el cual está ampliamente demostrado por los modelos *in vitro* e *in vivo* sobre las células epiteliales humanas. Aunque su participación sobre los mecanismos de activación y señalización, del sistema inmune innato del hospedero, no está definido.

2.5 Inflamación y la respuesta inmune innata del hospedero.

Una importante premisa de la respuesta inmune innata es la inflamación. Esta respuesta inflamatoria es importante en el daño a los tejidos vascularizados; además está considerada como un importante proceso fisiológico activado por diferentes estímulos tanto infecciosos como no- infecciosos **(Lippolis et al, 2008)**. La función primordial de la inflamación es reparar el daño provocado en el tejido del hospedero o resolver la infección para después retornar a un estado de homeostasis, aún en condiciones nocivas **(Nathan et al, 2002)**.

Una típica respuesta inflamatoria consiste de 4 componentes principales: 1) Los *inductores*, 2) *sensores*, 3) *mediadores inflamatorios* y 4) *tejidos blancos* **(Figura 6)**. Cada uno de ellos puede iniciar la activación en forma múltiple o bien en combinación a diferentes vías de activación durante la respuesta inflamatoria **(Medzhitov et al, 2010)**.

El tipo de vía inflamatoria es dependiente de la señal de alerta; por ejemplo diferentes patógenos son censados por grupos de receptores de la inmunidad innata tipo (*PRRs*), tal es el caso de los TLRs (*Toll-like receptors*). Dichos receptores son expresados en diferentes células incluyendo a macrófagos residentes; estas moléculas pueden modular la respuesta de varios mediadores inflamatorios entre ellos, la producción de citocinas

inflamatorias por ejemplo TNF- α , IL-1 e IL-6, quimiocinas (CCL2 y CXCL8), así como prostaglandinas. Posteriormente los mediadores inflamatorios tienen su acción sobre tejidos blanco y pueden inducir efectos directos como la vasodilatación, y la extravasación de células inflamatorias (neutrófilos) (**Medzhitov et al, 2010**).

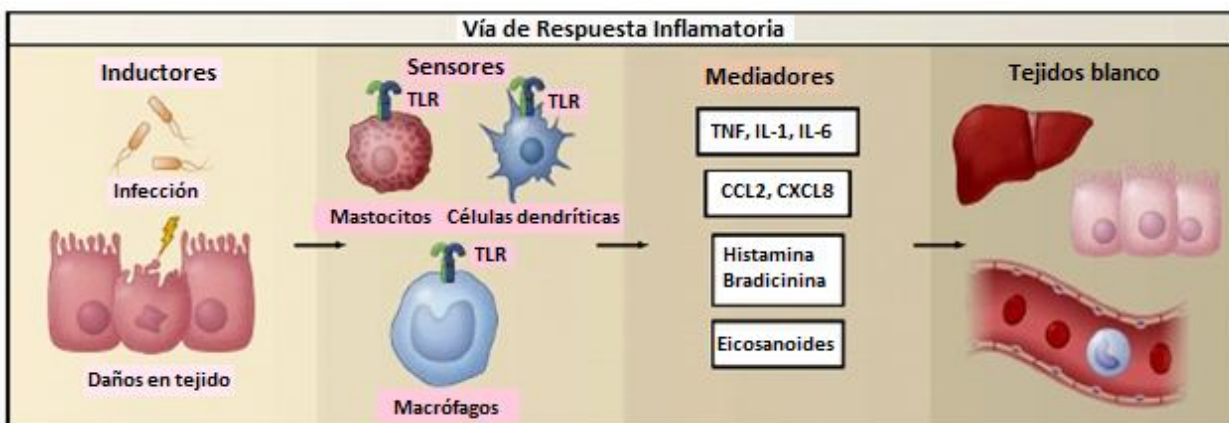


Figura 6. Componentes de la respuesta inflamatoria. La vía de la respuesta inflamatoria es un evento inducible que requiere de iniciadores o señales de alerta modulados por receptores (por ejemplo, TLRs). Los sensores a su vez inducen mediadores de la inflamación que presentan diferentes blancos en el hospedero y son parte esencial del sistema inmune innato.

Tomado de: Ruslan Medzhitov et al, Cell, 2010:140; 771-76.

En dicho proceso el balance de la respuesta pro y anti-inflamatoria constituye una parte esencial en el control de señales de encendido y apagado de la inflamación y está demostrado que la excesiva respuesta inflamatoria, observada en ciertas enfermedades y desordenes inflamatorios como el choque séptico, arterioesclerosis, y la enfermedad inflamatoria del intestino, es la principal causa de daño al hospedero (**Segal et al, 2000**).

El control de la inflamación por el sistema inmune innato, es una respuesta calculada que no deberá tener disonancias para considerarse efectiva en la destrucción de los microorganismos patógenos (**Barton et al, 2008**).

Los fagocitos profesionales polimorfonucleares (neutrófilos) y el sistema monocito-macrófago son células de la inmunidad innata que participan activamente en la respuesta inflamatoria, además de las citocinas pro-inflamatorias como son (TNF- α , IL-12 e IL-8) y otros mediadores lipídicos entre ellos, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (**Nathan et al, 2006**).

La mayoría de estos mediadores inducen cambios en las células endoteliales que promueven la conversión de tejido infectado a tejido inflamado. Las citocinas como TNF- α e IL-1 causan una serie de cambios que en forma colectiva con llevan al aumento de migración (quimiotaxis) de los fagocitos profesionales, al sitio de infección **(Nathan et al, 2000)**.

Los inductores en la vía de respuesta inflamatoria son detectados por los sensores, tal es el caso de los receptores tipo toll (*Toll-like receptor, TLRs*). Estas moléculas, censorsas como ya fue mencionado son expresados en diferentes células especializadas entre ellas células dendríticas, macrófagos y mastocitos **(Medzhitov R et al, 2010)**.

Las células fagocíticas al migrar y llegar al sitio de infección; disponen de varios mecanismos efectores entre ellos su sistema de proteasas, capaces de degradar el material fagocitado, acompañado a la producción del estallido respiratorio (intermediarios de oxígeno, ROS), la producción de intermediarios de nitrógeno- óxido nítrico (RNS), la formación de redes atrapadoras de patógenos (*formación de NETs*), particularmente en fagocitos polimorfonucleares (neutrófilos) así como la secreción de péptidos antimicrobianos (*AMP*) **(Medzhitov et al, 2010; Medzhitov et al, 2008)**.

Los macrófagos por otro lado, contribuyen a depurar a los neutrófilos en proceso de apoptosis e iniciar los mecanismos de reparación de la inflamación. La liberación de todos estos mediadores inflamatorios pueden controlar a las infecciones bacterianas; sin embargo en ocasiones los mismos mediadores de la respuesta inflamatoria están involucrados en el daño al hospedero y son responsables de la destrucción de tejido y más que ayudar a limitar la entrada del microorganismo patógeno favorecen su invasión en el hospedero **(Netea et al, 2003; Tahar et al, 2009)**.

El control de la inflamación por el sistema inmune innato, esta modulado también por la síntesis de moléculas con efectos anti-inflamatorios entre ellas, citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) y algunas familias de mediadores lípidicos como lipoxinas, protectinas y resolvinas **(Serhan et al, 2005)**. Estas moléculas endógenas limitan a la inflamación a través de prevenir el influjo de neutrófilos y la disminución de las moléculas inflamatorias **(Serhan et al, 2007; Nathan et al, 2002)**.

Así mismo, el control de la respuesta inmune innata es modulado por un sistema restringido de moléculas de reconocimiento de los distintos microorganismos patógenos.

Parte de estos sistemas, se expresan como receptores presentes en la superficie de las células inmunes; y están considerados como “**prototipos**” al reconocimiento de patógenos (***receptores con patrones de reconocimiento, PRRs***). (Parker et al, 2007; Kumar et al, 2009; Akira et al, 2009).

Las moléculas del grupo de PRRs tienen la característica de reconocer variantes estructurales de las moléculas de patógenos denominadas “**Patrones moleculares asociados a los patógenos**” (PAMPs) (Parker et al, 2007; Kumar et al, 2009; Akira et al, 2009).

La activación por la vía de interacción **PAMPs-PRRs**, da especificidad a la respuesta inmune del hospedero y provoca un estado de alerta en las células, principalmente en los monocitos y macrófagos. La activación en estas células, también induce la secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias (principalmente IL-10) entre otros mecanismos efectores (producción de intermediarios de oxígeno y óxido nítrico). (Bianchi et al, 2007).

Parte de estos mecanismos efectores de la inmunidad innata son producidos por las señales de factores de la transcripción, como es el factor nuclear NF- κ B. Estas moléculas además participan en la señalización para la síntesis de citocinas y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), moléculas muy importantes durante la conexión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida (Montero et al, 2008).

La familia de los receptores tipo Toll (*toll-like receptors*, TLRs), integran a los principales grupos de moléculas tipo PRRs (***y también denominados sensores de la respuesta inflamatoria***). Dichas moléculas están caracterizadas como proteínas transmembranales tipo I, con un dominio extracelular rico en secuencias de leucina y un dominio conservado citoplasmático. Estos receptores tienen homología a la región intra-citoplasmática del receptor IL-1 y del receptor de la IL-18, el denominado dominio TIR (receptor de IL-1/Toll).

Los TLRs son expresados por células mielomonocíticas, células endoteliales, células epiteliales y por varios sistemas de órganos. La mayoría de los TLRs son moléculas constitutivas con capacidad para ser modulados en respuesta a diferentes estímulos **(Parker et al, 2007)**.

La vía PAMPs-PRRs por neutrófilos y macrófagos es muy significativa, en la generación de productos dependientes de oxígeno (estallido respiratorio) y de la síntesis de citocinas (pro- y anti-inflamatorias); así como en la síntesis de especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico).

Estas moléculas efectoras facilitan el control de las infecciones bacterianas, acompañado por un infiltrado importante de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos activados, que puede ocasionar la ruptura del epitelio y facilitar la invasión de los tejidos por microorganismos **(Barton et al, 2008, Sansonetti et al, 2004)**, siendo la inmunoregulación de la respuesta muy importante para la homeostasis del hospedero.

El control de las respuestas pro- y antiinflamatorias involucra fuertemente a las células de inmunidad innata y a citocinas. Las citocinas antiinflamatorias son muy importantes al control asociado al exceso de reactividad inflamatoria, que puede provocar una autodestrucción en el hospedero, por el exceso de mediadores de la respuesta inflamatoria **(Sansonetti et al, 2004)**.

2.6 Inflamación inducida por Escherichia coli, sus PAMPs y la señalización por activación del receptor de TLR4 y TLR5.

En el caso de la respuesta inflamatoria a la infección por EAEC, esta es dependiente de la activación del sistema inmune innato y de la cepa de EAEC. En estudios epidemiológicos, a la infección por EAEC se ha demostrado la síntesis de altos niveles en lactoferrina y quimiocinas (principalmente de IL-8) en las heces de los hospederos infectados.

Así mismo, también otros marcadores inflamatorios incluyen al receptor antagonista de interleucina 1 (IL-1-Ira), la IL-1 β , y la síntesis de IL-8, interferon gamma (IFN- γ), leucocitos totales y sangre oculta (**Jiang et al, 2002; Huang et al, 2004**).

Trabajos por Steiner y colaboradores demuestran a la cepa prototipo de EAEC O42 como inductora de citocinas pro-inflamatorias entre ellas, la síntesis de IL-8 en células no polarizadas de la línea epitelial CaCo-2 siendo el modulador de dicho efecto pro-inflamatorio el plásmido (pAA) (**Steiner et al, 1998**).

En otras investigaciones, la enfermedad sintomática por infección de EAEC produce la síntesis de IL-8 en heces con valores mayores de 100pg/ml; así como en estudios *in vitro* de células intestinales T84 polarizadas; en donde además se menciona tanto al activador AggR y el AAF como necesarios a la inducción de dicha respuesta inflamatoria (**Harrington et al 2005**).

La producción de la quimiocina (IL-8) es responsable del reclutamiento de neutrófilos en la mucosa epitelial y facilita la secreción de fluido intestinal. Además, está demostrado que la bacteria de *E. coli* de la cepa prototipo puede producir una desregulación positiva en ciertos grupo de genes como la IL-6, TNF- α , GRO (factor de crecimiento), moléculas de adhesión intercelular como ICAM y factor estimulador de colonias (GM-CSF). Estas respuestas celulares son primariamente mediadas por la flagelina (Flic C) una proteína de superficie de EAEC (**Harrington et al, 2005**).

A lo largo del tiempo, varios reportes han demostrado dos principales moléculas tipo PAMPs en las células bacterianas de *Escherichia coli*: su lipopolisacarido (LPS) y la proteína del flagelo (flagelina Flic C). El papel inflamatorio del lipopolisacárido ha sido extensamente estudiado en los modelos de sepsis. La molécula de LPS es una molécula anfipática anclada a la membrana interna, acompañada de un lípido A, en donde la acilación de esta molécula ha demostrado ser responsable de su actividad tóxica e inmunoestimulante.

La molécula de LPS es reconocida a través de los PRRs, entre ellos el receptor de TLR4 (toll-like receptor 4). Sin embargo, las diferentes bacterias producen distintos lipopolisacáridos, con variación en su estructura, la cual es caracterizada por la organización de sus fosfatos, el número de cadenas aciladas y la composición de ácidos grasos **(Hajjar et al, 2002)**.

Estas variaciones son el reflejo de la actividad biológica de su lípido A. Los TLRs (toll-like receptors), son capaces de distinguir estas modificaciones estructurales en las diferentes especies de bacteria y un ejemplo que se puede citar es la molécula de LPS que presentan las cepas de *Pseudomona auroginosa* aisladas del pulmón de pacientes con fibrosis quística y el de cepas ambientales.

El LPS de las cepas de origen clínico es hexa-acilado y activa fuertemente al TLR4 humano, mientras que el de las bacterias ambientales penta-acilado no activa a TLR4 **(Hajjar et al, 2002)**.

Otro ejemplo, son los LPSs de *Helicobacter pilori*, *Legionella pneumophila* y *Yersinia pestis*, que activan escasamente a la molécula de TLR4, mostrando un efecto diferencial debido a modificaciones estructurales de los LPS; el cual pudiera estar relacionado con el potencial de los microorganismos para causar enfermedad **(Mandell et al, 2004)**.

Otro miembro de la familia de los TLRs, es el receptor TLR2 humano que reconoce una variedad de componentes microbianos de bacterias Gram positivas como: lipoproteínas, lipopéptidos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos (LTA) **(Miller et al, 2005; Smith et al, 2003)**.

Por otro lado, también las respuestas inflamatorias a la bacteria son mediadas por la flagelina de la EAEC (Flic C). La flagelina (*molécula tipo PAMPs*) causa la liberación de IL-8 en ciertas líneas celulares a través del reconocimiento de la molécula de TLR5.

Posteriormente otros reportes han señalado que una mutación en el gen que codifica a la flagelina (Flic C) limita la producción de la IL-8 implicando a la flagelina como el principal estímulo pro-inflamatorio **(Steiner et al, 2000)**.

La señalización por TLR5 induce la activación de la vía de las MAP cinasas (p38) y la activación del factor nuclear NF- κ B que favorece la síntesis y/o la producción de respuestas inflamatorias tanto en células epiteliales como en monocitos (**Khan et al, 2004**).

MAPK es un miembro de la familia de cinasas relacionadas con el stress que influyen en un amplio espectro de funciones celulares, incluyendo la respuesta inflamatoria a productos microbianos (**Khan et al, 2004**) (**Figura 7**).

En estudios de mutagénesis dirigida a la proteína de flagelina de EAEC se han identificado dos dominios conservados (D1) que son requeridos para la señalización vía la activación por el receptor de TLR5 (**Donnelly et al, 2002**). Además las asociaciones del genotipo de la bacteria y el polimorfismo influyen a la síntesis de esta citocina pro-inflamatoria (**Jiang et al, 2003**).

En otros reportes la susceptibilidad a la toxina de *Clostridium difficile* es asociada a un polimorfismo de un solo nucleótido del gen de IL-8 y también al aumento de la concentración de IL-8 en las heces con sangre (**Jiang et al, 2006**).

Los eventos de la respuesta a la infección por la EAEC se resumen en la **Figura 7**. Esta respuesta inflamatoria se ha analizado en tres principales fases:

- 1) La abundante adherencia que presenta la bacteria a la mucosa y que puede modularse por la presencia de varias adhesinas.
- 2) La elaboración de moléculas con acciones citotóxicas y de efecto citopático.
- 3) La inducción de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal, la cual puede contribuir de forma importante al daño de la mucosa; bajo las condiciones de desordenes inflamatorios del intestino como es la enfermedad de Chron y la colitis ulcerativa (**Navarro et al, 2010**).

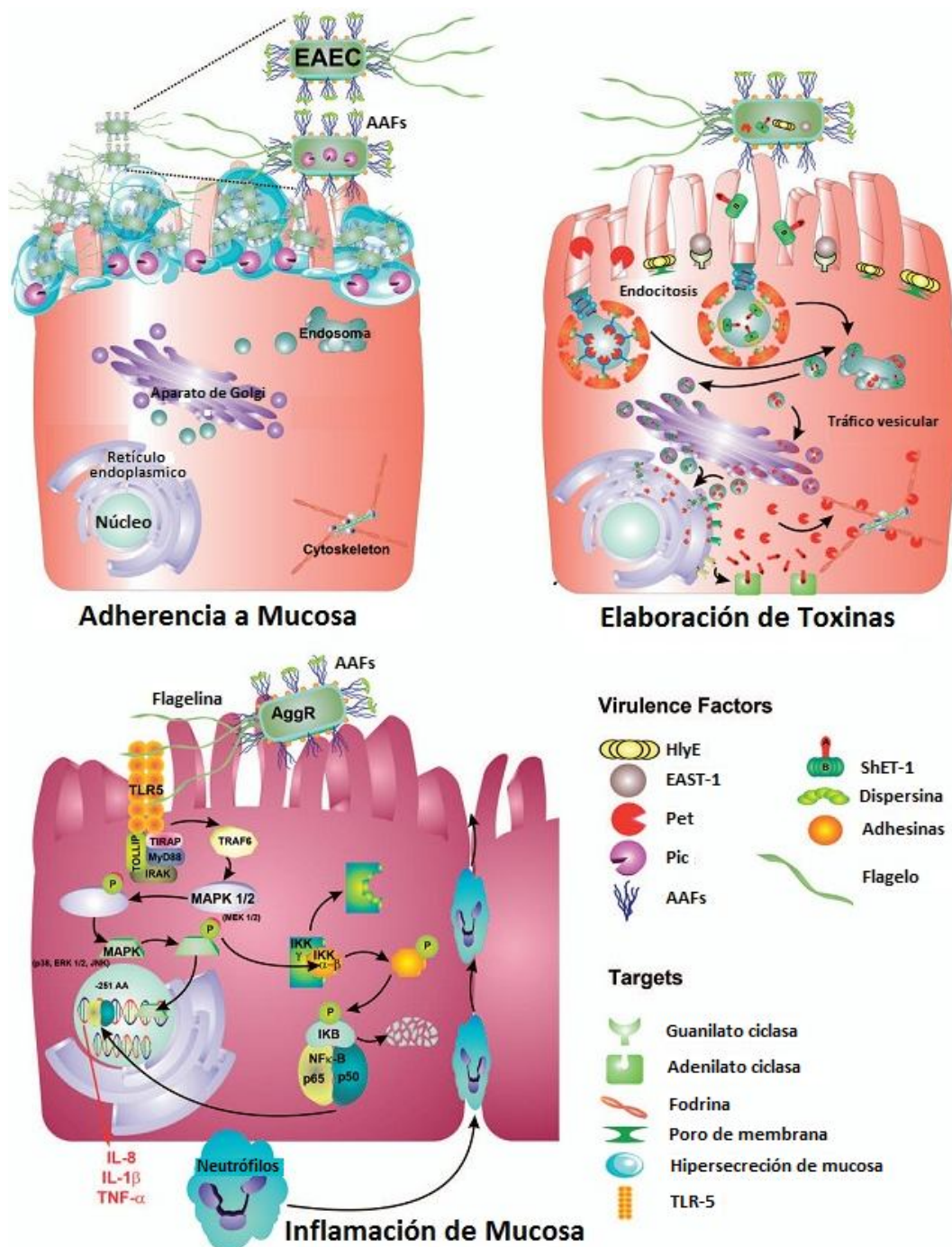


Figura 7. Las vías principales de patogénesis de EAEC

1) La abundante adherencia a la mucosa intestinal, modulada por el AAF con hipersecreción de moco 2) la elaboración de enterotoxinas y citotoxinas, entre ellas la toxina Pet que puede ser internalizada en las células epiteliales por endocitosis mediada por clatrina, y tráfico importante a través de endosomas tempranos, complejo de Golgi y retículo endoplasmico; Pet en el citosol correlaciona con el rompimiento de fodrina y 3) la inducción de inflamación involucra a varios factores de virulencia de la bacteria entre ellos la flagelina que señala por el receptor de TLR5, en asociación río abajo por activación de la MAP cinasa y la translocación del factor nuclear NF- κ B que con lleva a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias.

Tomado de: Navarro-García F, *Gut Microbes*, 2011;2(1); 13-24.

3 ANTECEDENTES

Recientemente diferentes evidencias han demostrado que la adherencia de las bacterias de manera específica e íntima a la mucosa intestinal representa el primer evento que puede desarrollar un papel muy importante en la activación de la respuesta inflamatoria del intestino. En un estudio realizado por Rhodes *et al*, (2007) se observó un incremento de *E. coli*, en cultivos de biopsias de colón de pacientes con enfermedad de Crohn; dicho padecimiento se considera de origen autoinmune; y también se ha relacionado a mediadores inflamatorios del hospedero que contribuyen al daño del tracto gastrointestinal (Barnich N, et al 2007).

En dicha enfermedad se ha identificado un desbalance en la respuesta pro-inflamatoria (niveles elevados de citocinas TH1) y se ha propuesto que las bacterias de *E. coli* contribuyen a la inflamación de estos padecimientos a través de la adherencia inicial de la bacteria a las células epiteliales, la activación de NF- κ B y la síntesis de IL-8 (potente quimiocina de neutrófilos) (Rhodes et al, 2007, Nouguchi M et al 1998).

En otros trabajos, se demuestra que *E. coli* aislada de pacientes con colitis ulcerativa pertenece a los grupos filogenéticos B2 y D (patógenos extraintestinales) y que estas bacterias son portadoras de proteínas del grupo de SPATEs sugiriendo su participación como la causa de la inflamación; y posible actividad reguladora en mecanismos inmunes del hospedero. (Kotlowski et al, 2007)

El proceso de la respuesta inmune innata es iniciado por la estimulación de diferentes receptores PRRs (B Beutler 2003). Dicho proceso es regulado por señales que favorecen la migración y activación de diferentes células. Los macrófagos son células fagocíticas especializadas que intervienen en los procesos inflamatorios para realizar tres funciones principales: fagocitosis, presentación antigénica e inmunomodulación.

En los procesos anteriores, participan también la síntesis de citocinas, grupo de glicoproteínas que tienen la capacidad de mediar la inmunidad natural y activar procesos efectoros que dependen también de las vías de señalización (MAPKS) reguladas por SOCS, JAKs- STAT y el factor transcripcional NF- κ B.

Estos últimos involucrados en el control de diversos procesos como la inmunidad, inflamación y la apoptosis (**Blach Olseewska Z et al, 2005**).

En estudios previos, se analizaron cortes histológicos de intestino de rata inoculados con fracciones purificadas de Pet en modelo de asa-ligada y se observó un infiltrado importante de células fagocíticas, así como el aplanamiento de las vellosidades intestinales (**Eslava et al, 1993**). Estas observaciones sugieren que Pet puede estar participando en el reclutamiento de células inflamatorias principalmente neutrófilos y el sistema monocito-macrófago. Por otro lado, en un estudio reciente, en el que empleando el método de *Phage Display* se identificaron secuencias de péptidos inmunodominantes en las toxinas Pet y Pic de *Escherichia coli*. Y cuyos anticuerpos producidos en ratón (mimotopos PGxILN y CxPDDDSSxC) inhiben la actividad biológica de la toxina Pet (**H. Chiñas et al, 2009**).

Así mismo en un estudio reciente se demostró que Pet, induce la expresión de RNAm de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α , MIF y el receptor antagonista de IL-1 (IL1Ra) en macrófagos murinos de la línea celular J774.A1 (**Benitez-Guzmán et al, 2011**).

En este estudio también, se demostró que la vía IKK α β /NF- κ B está involucrada como principal mediador de estas respuestas y se sugiere a la toxina Pet como un factor inductor de inflamación crónica. Los datos anteriores apoyan el papel relevante que pudiera desarrollar la interacción de la proteína Pet y las células del sistema inmune innato en el control de la inflamación por el patógeno de *Escherichia coli*.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta inflamatoria, es un evento fisiológico del hospedero que se produce en respuesta a la estimulación de las células inflamatorias al iniciarse por varios tipos de estímulos, como la presencia de microorganismos infecciosos. El proceso inflamatorio forma parte de los mecanismos de homeostasis de la respuesta inmune innata del hospedero. La regulación de dicho proceso es modulado por el perfil de citocinas pro-inflamatorias (IL-8, y TNF- α) y las anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4) (contra-regulación) **(Shi-Tahar et al, 2009)**.

El balance de citocinas pro- y anti-inflamatorias en padecimientos inflamatorios gastrointestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Crohn) y la colitis ulcerativa, juegan un papel importante causando daños al epitelio intestinal, debido al acumulo de células inflamatorias, fagocitos polimorfonucleares y monocito-macrófago. Las células fagocíticas al activarse por las citocinas ejercen acciones anti-microbicidas, como la secreción de productos oxidativos (anión superóxido [O⁻²], íon hipoclorito [OCl⁻] y peróxido de hidrógeno [H₂O₂]), que causan daños severos en el epitelio gastrointestinal **(Nathan et al., 2002; Rock et al., 2008)**.

Por otra parte, varios estudios reportan una mayor concentración de *E. coli* en los pacientes con desordenes inflamatorios como la enfermedad de Crohn y donde también se han aislado *E. coli* productoras de SPATEs. Sin embargo, no está definido cual es la participación de estas proteínas durante el proceso inflamatorio y su contribución sobre el sistema inmune innato.

En consecuencia evaluar los posibles componentes de la bacteria; como es la toxina Pet, con las células del sistema inmune innato, permitirá entender mejor la participación de estas moléculas en la regulación y el daño intestinal observado durante la infección por EAEC y otras cepas productoras de SPATEs.

5 JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios han demostrado que la toxina Pet de EAEC purificada induce una serie de eventos que conducen al daño de las células epiteliales. Utilizando sistemas *in vitro* se demostró que la toxina es endocitada e internalizada (**Sanchez Betancourt et al, 2009**), y posteriormente al llegar a su blanco la fodrina, se completa el daño celular. Sin embargo, su actividad no se ha analizado directamente sobre células inmunes. Trabajos de investigación basados en estudios *in vitro* con macrófagos humanos pueden apoyar a entender los mecanismos celulares y moleculares que son activados por la toxina Pet. Por lo anterior, es que en el presente trabajo nos proponemos analizar el papel de esta proteína sobre la función de los macrófagos, para obtener información que aporte evidencias de la función estimulante y reguladora de la respuesta inmune.

6 HIPÓTESIS

La toxina Pet activa a las células fagocíticas monocito-macrófago en dosis dependiente y tiene un efecto biológico sobre la migración dirigida de estas células (quimiotaxis) y la secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias, relacionadas con la activación del factor nuclear NF- κ B.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar mediante ensayos *in vitro*, si Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa activa a las células fagocíticas monocito-macrófago de origen humano, con el propósito de conocer su función biológica en el hospedero y así contar con un sustento científico del papel de Pet en las inflamaciones intestinales de tipo crónico relacionados con la colonización por *E. coli*.

7.2 Objetivos específicos

7.2.1. Evaluar la quimiotaxis de macrófagos en presencia de la toxina Pet de *Escherichia coli* enteroagregativa.

7.2.2. Determinar la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-8 y TNF- α) y anti-inflamatorias como la (IL-10), por estimulación de la toxina Pet en los macrófagos.

7.2.3. Estudiar la translocación del factor nuclear NF- κ B en macrófagos humanos estimulados *in vitro* con toxina Pet.

8 MATERIAL Y METODOS

8.1 Reactivos

Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo de la bacteria *Escherichia coli* fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, N.Y.) y los reactivos para el ensayo de quimiotaxis, zymosan y BSA se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich Corp.

8.1.1 Material Biológico

Cultivo de bacteria de *Escherichia coli* HB101 (pCEF1), clona O42 para la obtención de la toxina Pet.

Obtención de concentrados leucocitarios (Buffy coat) de donadores sanos del Departamento de Medicina Transfusional del Hospital Infantil de México.

Separación de células mononucleares y cultivo de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM).

8.1.2 Medios de cultivo Celular

En el cultivo de células MN y macrófagos derivados de monocito de sangre periférica, se utilizó medio RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO).

8.2 Métodos

8.2.1 Condiciones de crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* HB101 (pCEF1).

Se utilizó la cepa HB101 (pCEF1), la cual fue donada por el Dr. Carlos Eslava y el Dr. Ulises Chiñas (Departamento de Salud Pública). La cepa se conservó en agar luria con 15 % de glicerol, 100 µg/ml de ampicilina a -20 °C.

8.2.2 Extracción de la toxina Pet de *Escherichia coli* HB101 (pCEF1).

Se prepararon tubos con 5 ml de caldo luria (CL) los cuales se inocularon con la clona HB101 (pCEF1), se incubaron por 4 h a 37°C en agitación constante (200 rpm) y se procedió como se muestra en la **(Figura 8)**.

De estos cultivos se tomó 1 ml para inocular 1 L de CL, se incubó durante 18 h a 37°C con agitación constante (200 rpm), posteriormente el cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante del cultivo se precipito son sulfato de amonio, con una saturación de 60 % (361 g de sal/L), dejándolo en reposo incubando a 4°C toda la noche. Las proteínas precipitadas se obtuvieron por centrifugación a 10 000 g, 30 min a 4°C.

El precipitado obtenido (el botón) se resuspendio en buffer de fosfatos de sodio 0.07M pH= 8.2, para eliminar la sal se dializó durante dos días con el mismo buffer, realizando recambios del mismo buffer aproximadamente cada 12 h y un día más con 0.05M Tris-HCl en 0.01M de EDTA pH=8.0, se utilizaron bolsas de diálisis con poro de 12-14 000 Da **(Fig 8)**.

Al precipitado proteico se le realizó una serie de cromatografías; primero con una resina de intercambio aniónico con Q-sepharose (Pharmacia USA), en una columna de 1.5 cm de diámetro por 57 cm de largo, la velocidad de flujo se ajustó a 20 ml/h para obtener fracciones de 5 ml. Como amortiguador se utilizó 0.05M Tris-HCl en 0.01M de EDTA pH=8.0, las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5M de NaCl.

El siguiente paso fue realizar una cromatografía de intercambio catiónico empleando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con una columna Mono S HR 5/5 (Pharmacia USA). La columna se equilibró con 0.05M Tris-HCl en 0.01M de EDTA pH=6.8, seguido de un gradiente salino utilizando 1M de NaCl, el flujo fue de 0.5 ml/min colectando fracciones de 1 ml. El perfil de elución se analizó a una longitud de onda de 280 nm en el espectrofotómetro GeneQuant pro.

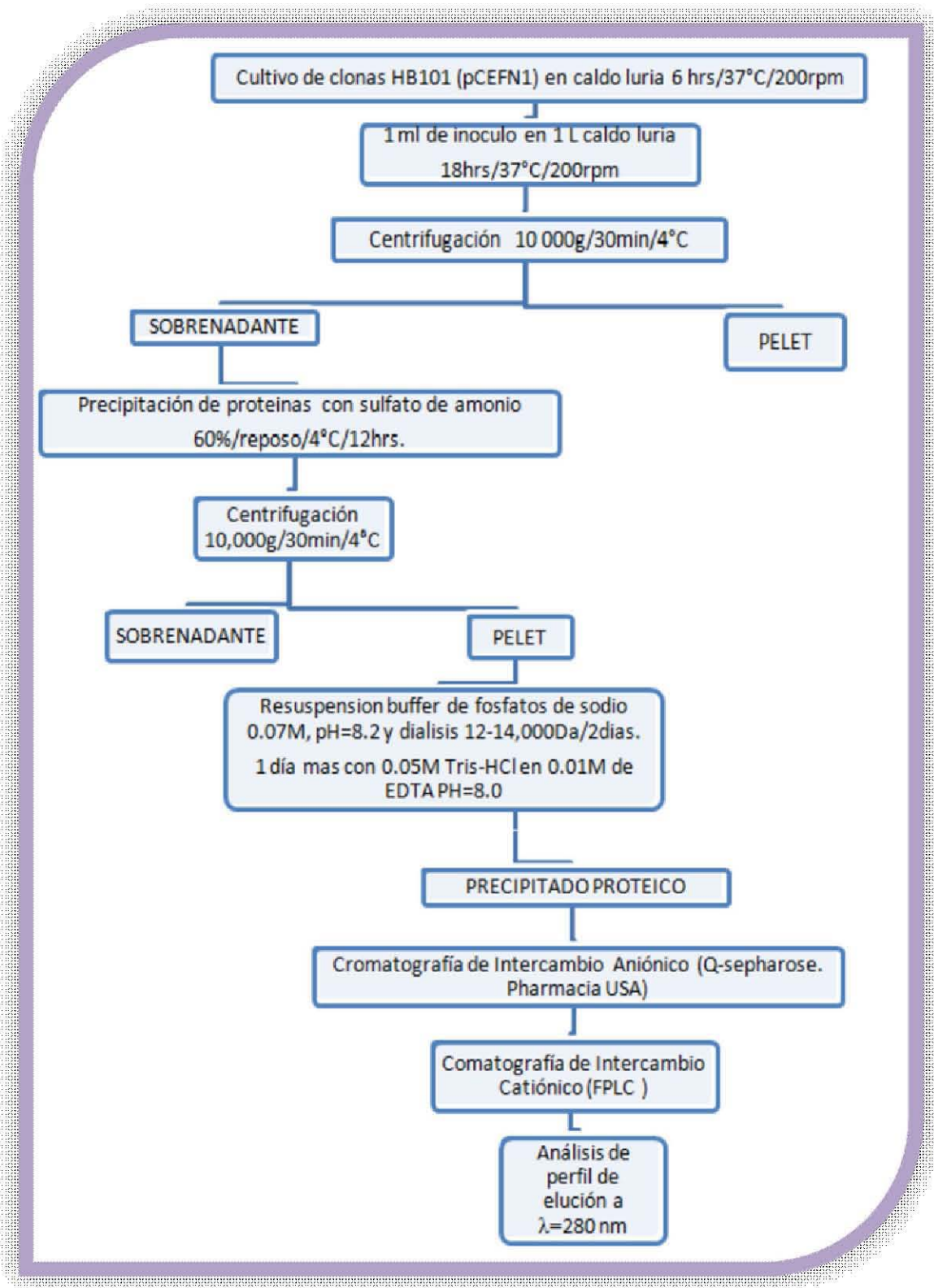


Figura 8. Proceso de extracción de la toxina Pet de *Escherichia coli* clona HB101 (pCEF N1).

8.2.3 Cuantificación de Endotoxina (ensayo de *Limulus*).

Para determinar la presencia de endotoxina (LPS), en la toxina Pet purificada, se realizó la prueba de ensayo de lisado de amebocitos *Limulus polyphemus* (LAL) (CAMBREX). El ensayo se realizó por duplicado, en tubos libres de pirógenos corriendo los controles: control positivo (100 µl de endotoxina (LPS), 100 µl de linfa de amebocitos), control negativo (100 µl de agua libre de pirógenos, 100 µl de linfa de amebocitos) y muestras (100 µl de muestra, 100 µl de linfa de amebocitos (**Tabla 2**). Todos los tubos se incubaron 1 hr a 37 °C y se realizó la lectura de los resultados; la presencia de endotoxina es determinada por la formación de un gel o coágulo insoluble y se evidencia un tubo positivo cuando el gel permanece intacto después de que se invierte cuidadosamente en un ángulo de 180 °, cualquier otra condición es interpretada como negativa.

Tabla 2. Ensayo de *Limulus polyphemus*.

Tubo	Agua Inyectable	Linfa de amebocitos	Endotoxina LPS	Toxina Pet
Control -	100 µl	100 µl	---	---
Control +	---	100 µl	100 µl	---
Muestra	---	100 µl	---	100 µl

8.2.4 Determinación de Proteínas por método de Bradford.

La cuantificación de la concentración de la toxina Pet, se determino por el método de Bradford, para lo cual se elaboró una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Corp), con un intervalo de concentración que va de 0.2 mg/ml a 0.9 mg/ml (**Tabla 3**). Se adicionaron 20 µl del estándar así como de la muestra (por duplicado), posteriormente se adicionaron 980 µl de reactivo (Protein Assay Bio-rad cat. 500-0006) diluido 1:4 con H₂O inyectable (Pisa) en tubos eppendorf, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 575 nm contra un blanco de H₂O inyectable en el espectrofotómetro GeneQuant pro.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por la interpolación en la curva patrón (mg/ml de proteína vs absorbancia). En ciertos experimentos esta concentración se corroboró con la medición de la concentración de proteínas realizada en el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer a una longitud de onda de 280 nm y con la ventaja de utilizar 2 µl de la muestra por duplicado.

Tabla 3. Método de Bradford.

Tubo	Stock BSA 10 mg/ml	Agua Inyectable	Concentración
Blanco	0 µl	1000 µl	-----
1	20 µl	980 µl	0.2 mg/ml
2	40 µl	960 µl	0.4 mg/ml
3	60 µl	940 µl	0.6 mg/ml
4	80 µl	920 µl	0.8 mg/ml
5	90 µl	910 µl	0.9 mg/ml

8.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), tinción de coomassie, tinción de plata y reconocimiento Ag-Ac por Inmunoelotransferencia (Western-Blot) revelado por BCIP/NBT y quimioluminiscencia.

La pureza de la proteína, se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% bajo condiciones desnaturizantes, con 0.1% (w/v) de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en presencia de β-mercaptoetanol. Las características del gel de trabajo fueron: 7 cm x 8 cm con un espesor de 1.0 mm (Mini-PROTEAN Tetra Cell. BioRad). Las proteínas se separaron empleando un voltaje constante de 100 V para el gel concentrador y 150 V para el gel resolutor (PowerPac Basic Power Supply. BioRad).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich Corp) y el desplazamiento de las proteínas se comparó con los desplazamientos que se obtuvieron con un marcador de proteínas (Fermentas. Bio-Rad. Cat.SM1811).

Se realizó también la tinción de plata, fijando las moléculas presentes en el gel con solución fijadora (*ver Apéndice*) durante 30 minutos, se lavo dos veces el gel con agua destilada y se volvió a lavar el gel durante 15 minutos, 3 veces con la solución de lavado y de nuevo con agua destilada. Se adiciono la solución de oxidación (*ver Apéndice*) durante 1 minuto, y se lavo el gel con agua destilada durante 20 segundos 3 veces, se agrego la solución de impregnación(*ver Apéndice*) por 15 minutos, de nuevo se lavo el gel 2 veces durante 20 segundos y se cubrió el gel con solución reveladora (*ver Apéndice*), se dejo en reposo hasta comenzar a observar el perfil de corrimiento, se lavo el gel con agua destilada durante 1 minuto 2 veces y se le adiciono solución de paro (*ver Apéndice*).

Las proteínas separadas por SDS-PAGE que se obtuvieron, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda (Mini Trans-Blot Cell. BioRad). La transferencia se realizó utilizando amortiguador Tris (0.25% w/v), glicina (1.2% w/v) y metanol (16.6 % v/v) a un amperaje constante de 200 mA (PowerPac Basic Power Supply. BioRad) durante 90 min. La eficiencia de la transferencia, se realizó con una tinción reversible utilizando rojo de Ponceau (0.01%) (Micro CT. Cat.1008). Una vez corroborada la presencia de las proteínas, la membrana se destiño con PBS-Tween. Los espacios libres se bloquearon con leche descremada (Svelty) al 5 % en PBS, durante 1 hr mínimo, manteniendo la membrana a 4°C.

Para identificar la proteína se emplearon anticuerpos producidos en conejo, las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS-Tween entre cada lavado y se le adiciono el anticuerpo primario (anti-Pet) a una dilución de 1:500. Se detecto el anticuerpo primario con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed USA) a una dilución 1:5000 en PBS.

La reacción se hizo evidente agregando BCIP/NBT (Sigma-Aldrich Corp) y se detuvo con agua corriente. También se realizo un revelado por quimioluminiscencia en la cual se le adiciono el anticuerpo primario (anti-Pet) a una dilución 1:1000 y posteriormente se adiciono el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (INVITROGEN) a una dilución 1:10 000. La reacción se hizo evidente agregando una mezcla 1:1 de los reactivos del kit de Chemiluminescent HRP Substrate Millipore y las imágenes se obtuvieron con un fotodocumentador DNR (Bioimaging Systems, MF ChemisBIS2.0 con programa predeterminado, Gel Capture).

8.2.6 Obtención y procesamiento de células mononucleares derivadas de sangre periférica.

Las células se obtuvieron de acuerdo al método de Böyum, que consiste en utilizar un gradiente de concentración (Lymphoprep). Las bolsas de concentrado celular (Buffy coat) se homogenizaron y diluyeron 1:2 con SSI, (25 ml de sangre + 25 ml de SSI estéril) en un tubo de 50 ml de fondo cónico (libre de pirógenos) y estéril.

Por otro lado se prepararon dos tubos de 50 ml con 10 ml de gradiente comercial, (Lymphoprep, Nycomed, densidad = $1.077 \pm 0.001 \text{g/ml}$), se colocó sobre el gradiente con una pipeta serológica estéril, 25 ml de sangre diluida lentamente (resbalando la sangre por las paredes para evitar la ruptura del mismo) (**Fig 9**).

Se centrifugaron a 2500 rpm durante 40 minutos a 25°C sin arranque y freno de la centrifuga (mínimas 0 y1) (Centrifuga universal 32R. Hettich Zentrifugen).

La interface de células mononucleares se transfirió con pipeta pasteur estéril a un tubo de 15 ml, se lavo tres ocasiones con 15 ml de SSI 10 minutos/1500 rpm para eliminar el mayor número de plaquetas presentes.

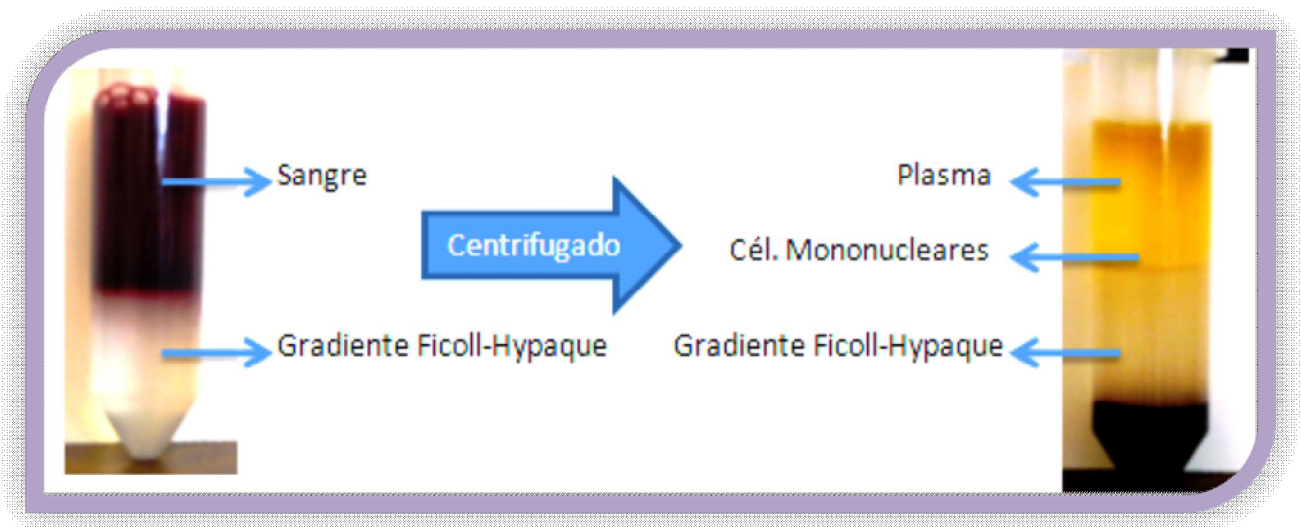


Figura 9. Obtención de células mononucleares.

8.2.7 Determinación de viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano y cuantificación de células en hematocitometro (cámara de neubauer).

Para medir la viabilidad celular se empleo la prueba de exclusión de la tinción de azul de Tripano. El objetivo de esta técnica es determinar el número de células viables en la suspensión celular de estudio.

Por lo tanto el paquete obtenido en el ultimo lavado se resuspendió en 6 ml de SSI; en un tubo eppendorf estéril, realizando una dilución 1:10 de la suspensión celular, es decir 10 µl de células mas 90 µl de Azul de tripano 0.4% (INVITROGEN), para determinar la viabilidad de las células MN y el número total de células por ml, en la cámara de Neubauer. Enseguida, se observaron las células en el microscopio óptico (NOVA) utilizando el objetivo de 10x para la localización de los cuadrantes, después se cambio al objetivo de 40x y se procedió a realizar la determinación de las células viables relacionando las células totales con las células viables. Se contabilizaron 4 cuadrantes para obtener el número de células totales empleando la siguiente fórmula:

$$\left(\begin{array}{l} \text{Número de} \\ \text{células} \\ \text{contadas} \end{array} \right) \left(\begin{array}{l} \text{Factor de} \\ \text{Dilución} \end{array} \right) \left(\begin{array}{l} \text{Número de} \\ \text{cuadrantes} \end{array} \right) \left(\begin{array}{l} \text{Factor de} \\ \text{la cámara} \end{array} \right) \left(\begin{array}{l} \text{Volumen} \\ \text{de la} \\ \text{suspensión} \end{array} \right) = \text{Número de células / ml}$$

8.2.8 Separación de células adherentes (monocitos) por adherencia a vidrio y diferenciación a macrófago.

Ya con las células MN contadas se preparo una suspensión celular ajustada a 15×10^6 cels/ml en medio RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) y 25% de pool de suero humano (PSH). En placas de 24 pozos (Corning Cat. 3524) se colocaron 60 µl de la suspensión celular en el centro de discos de vidrio de 9 mm de diámetro previamente tratados para cultivo de tejidos (*ver Apéndice*). Se incubaron a 37°C con atmosfera de CO₂ al 5% durante 2 h. Después del periodo de incubación, se realizó una serie de 3 lavados a las células con 500 µl de solución de Hank's previamente calentado a 37°C; con la finalidad de retirar todas las células no adherentes al disco de vidrio, posteriormente se colocaron 500 µl de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%.

Los monocitos obtenidos a las 2 hrs de adherencia de las células mononucleares se mantuvieron incubados en atmosfera de CO₂ al 5% (Revco Habitat Cat. RCO3SOOTABB) a 37°C durante 7 días, para su diferenciación a macrófagos (**Figura 10**). Durante este tiempo se realizaron cambios de medio RPMI-1640 nuevo suplementado con SFB al 10% por lo menos cada tercer día. Estas células diferenciadas (macrófagos) se utilizaron en los ensayos inmunológicos como quimiotaxis, producción de citocinas e inmunofluorescencia para NF-κB.

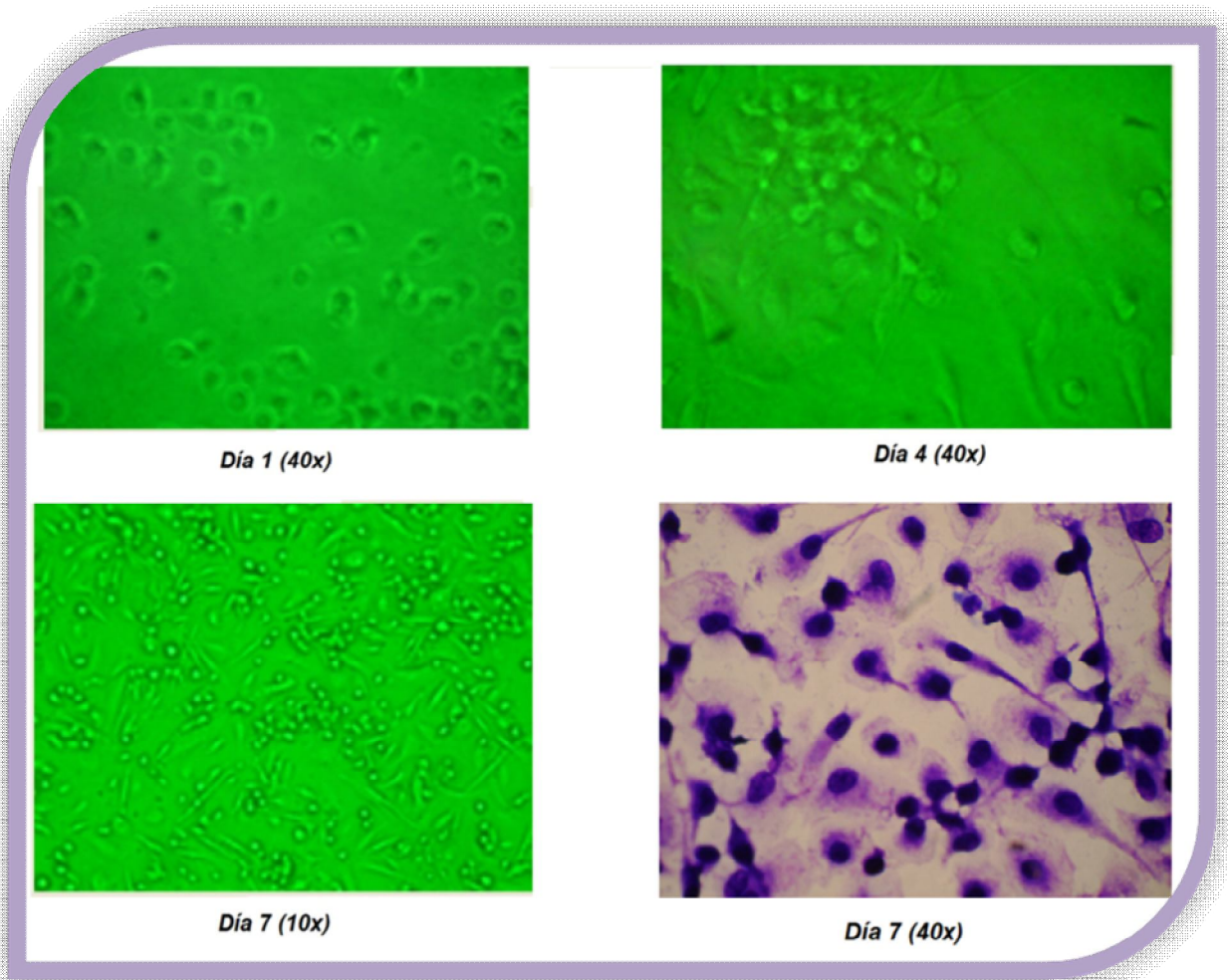


Figura 10. Proceso de diferenciación de monocito a macrófago.

Cambios morfológicos observados durante el cultivo y diferenciación de monocito a macrófagos. Día 1) células redondas características de monocitos, Día 4) aglutinación y aumento del tamaño de las células, Día 7) Forma fusiforme asociada a macrófago y para observar todo el campo se observó en objetivo de 10x, a 40x podemos observar la morfología fusiforme característica, que presentan los macrófagos en el séptimo día de diferenciación (Tinción Diff-Quik).

8.2.9 Ensayo de la migración dirigida (quimiotaxis) en respuesta a la toxina Pet en macrófagos humanos por cámara de Boyden.

Para el ensayo de quimiotaxis se utilizaron cámaras de Boyden de doble filtro (Neuro-probe Inc, Gaithersburg MD, USA), para la cámara superior se utilizo un filtro de policarbonato con un poro de 5 μm y 13 mm de diámetro (Neuro-probe Inc, Gaithersburg MD, USA), una membrana de nitrato de celulosa con poro de 8 μm (Sartorius Stedim biotech. Aubagne Cedex, France), fue colocada en la parte inferior que es la receptora de las células migratorias (**Figura 11**).

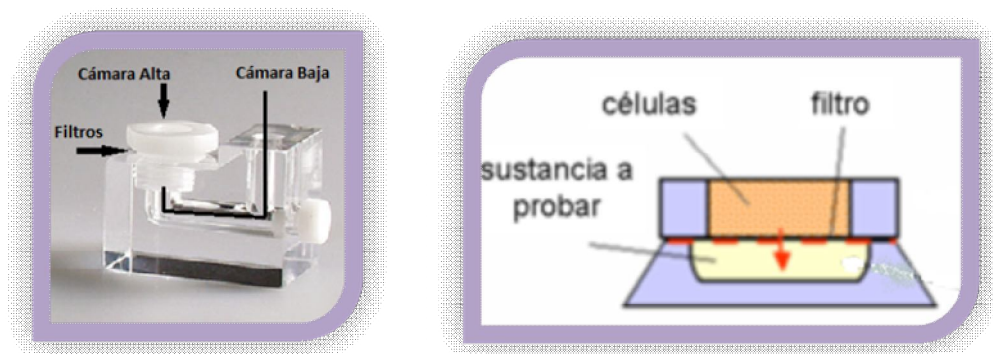


Figura 11. Cámara de Böyden de doble filtro (ensayo de quimiotaxis)

Posteriormente se prepara una suspensión de macrófagos a 2.5×10^6 cels/ml de los cuales se emplean 500 μl que se colocaron en la parte superior de la cámara, en la parte baja de la misma se colocaron 1.7 ml de la toxina Pet a una concentración de 5 μg , 10 μg y 20 μg , preparadas en solución de Hank's + BSA al 0.2 %, por duplicado. Como control positivo se utilizo 1.7 ml de suero activado con zymosan (ZAS, Sigma-Aldrich Corp Cat. 58856-93-2) (*ver Apéndice*) y como control negativo 1.7 ml de la solución de Hank's + BSA 0.2%.

La cámara se incubo 90 min en ambiente húmedo a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%, transcurrido este tiempo se retiro la suspensión celular y se desmontaron los filtros. La membrana que contiene a las células que migraron fueron fijadas en una solución de EtOH al 50% v/v durante 24 hrs.

Después se tiñeron las membranas de acuerdo a los siguientes pasos:

- ④ Un lavado en agua caliente (recién hervida) durante 15 min,
- ④ Sumergirlas en hematoxilina (HYCEL) durante 10 min,
- ④ Realizar nuevamente los lavados a las membranas con agua,
- ④ Sumergir las membranas en HCl al 0.5%, 5 veces de 10 seg cada una.
- ④ Repetir los lavados con agua,
- ④ Sumergir las membranas en una solución de colorante Cromotopo 2R (Sigma-aldrich Corp. Cat.C-3143) durante 30 seg,
- ④ Repetir los lavados a las membranas con agua

Posteriormente se siguió un procedimiento para hidratar las membranas:

- ④ Las membranas se sumergieron en EtOH al 95% durante 10 seg y después una segunda ocasión pero ahora durante 5 min,
- ④ Sumergirlas en 1-propanolol durante 4 min,
- ④ Volver a sumergir las membranas en una solución 1:1 de xilol con 1-propanolol por 3 min,
- ④ Por último colocar las membranas en xilol o xileno al 100% durante 15 min.

Se preparo un portaobjeto con una gota de aceite bálsamo de canada (HYCEL) y la membrana fue colocada en esta preparación, después se cubrió con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Dicha preparación se dejo en reposo de 24 a 72 hrs.

El número de células se conto en 5 campos por membrana (microscopio óptico NOVA) a 40x y la movilidad se cálculo obteniendo el promedio de células visibles en estos campos, comparando el control positivo contra el control negativo. Las lecturas se realizaron entre dos observadores.

8.2.10 Cuantificación de IL-8, TNF- α , e IL-10 humanas por el método de ELISA en macrófagos humanos tratados con Pet.

Los macrófagos purificados fueron tratados con diferentes concentraciones de Pet (0-20 $\mu\text{g/ml}$) durante 6 y 24 hrs, a la par de un control negativo (medio solo) y un control positivo (LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$) después de estas condiciones de cultivo, tratados y no tratados con Pet se analizaron por la técnica de ELISA para cuantificar las citocinas IL-8, TNF- α e IL-10.

Se utilizaron los sistemas de OptEIA (Pharmingen, CA, USA), de acuerdo con el siguiente procedimiento general. A cada pozo de una placa de ELISA de 96 pozos (Corning, de alta adherencia No. catalogo, 3590) se le agregaron 100 μl de anticuerpo de captura diluido en solución reguladora (solución de carbonatos pH 9.5 *ver apendice*) la placa se dejó toda la noche a 4°C y posteriormente se realizaron 3 lavados con la solución de lavado (PBS-0.05% de Tween 20) en lavador de placas para ELISA (Plate Washer Das, bajo programa predeterminado).

Después se adicionaron 200 μl de solución reguladora de bloqueo (PBS con 10% de suero fetal bovino) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se repitió el proceso de lavado (3 lavados de 300 μl /pozo). Se colocaron 100 μl de cada muestra y cada dilución del estándar correspondiente, por duplicado; después de 2 h se lavaron cinco veces y se añadieron 100 μl de una solución reguladora que contenía el anticuerpo de detección biotinilado y estreptavidina-peroxidasa.

Tras 1h de incubación con la solución reguladora, se realizaron 15 lavados, se añadieron 100 μl de la solución de sustrato preparada al momento (solución A más Solución B v/v) y se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz; tras lo cual se añadieron 50 μl de solución de ácido sulfúrico 2.5 N.

La absorbancia se determinó a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Marca Thermo Scientific Multiskan FC, bajo el programa SkanItfor Multiskan FC3.0) y la concentración de la citocina en las muestras se obtuvo por interpolación de las lecturas correspondientes en una curva tipo.

8.2.11 Activación de NF-κB (p65) por inmunofluorescencia indirecta.

Para caracterizar la vía de señalización a la toxina Pet, se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la proteína p65 de NF-κB (Cellomics HCS. Thermo Scientific. Prod #1811301). Los macrófagos adherentes se colocaron en cubreobjetos de 12mm de diámetro colocados en placas de cultivo de 24 pozos, en medio RPMI-1640/10% de SFB a una concentración de 2×10^4 células/ml.

Después se estimularon con la toxina Pet a $10 \mu\text{g/ml}$; al mismo tiempo se ensayaron los controles negativo (células sin estímulo) y control positivo (LPS $0.1 \mu\text{g/ml}$) y las células se incubaron por 30 minutos en atmosfera de CO₂ al 5%; al término de esta incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en amortiguador Dulbecco-PBS modificado (Cellomics HCS. Thermo Scientific) por 10 minutos a temperatura ambiente.

Enseguida se lavaron dos veces en Dulbecco-PBS (Cellomics HCS. Thermo Scientific) y se incubaron con anticuerpo primario (polyclonal anti- conejo pp65, NF-κB cellomic Kit) en solución de permeabilización (Dulbecco-PBS/0.1% de tritón X-100)(Cellomics HCS. Thermo Scientific), por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se lavo 3 veces por 5 minutos cada lavado y se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa488- anti-IgG de conejo preparado en cabra) por 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Se repitió el mismo lavado (3 veces con Dulbecco-PBS) y se contrastó el núcleo con colorante de Hoescht) (Cellomics HCS. Thermo Scientific. Prod #1860101).

Las células se prepararon en líquido de montaje para conservación de fluorescencia (Vecta shield) y se sellaron con barniz para su posterior lectura en Microscopio (AXIO Imager M.2 Marca Carl Zeiss). La adquisición de imágenes se obtuvo de acuerdo al programa pre-establecido Axion Vision Rel 4.8 y a la par se cuantifico el porcentaje de células positivas a pp65 en un campo de 200 células para cada uno de los estímulos empleados en este ensayo.

8.2.12 Análisis estadístico.

Para determinar las diferencias significativas entre las células tratadas con Pet y las no tratadas, se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon en las mediciones de producción de citocinas. Las diferencias se consideraron significativas a una $p < 0.05$.

9 RESULTADOS

9.1 Determinación de Endotoxina (ensayo de *Limulus*).

El resultado obtenido de la cuantificación de endotoxina nos dice que el lote de toxina Pet utilizada contenía <0.125 EU/ml endotoxina/LPS (**Figura 12**).

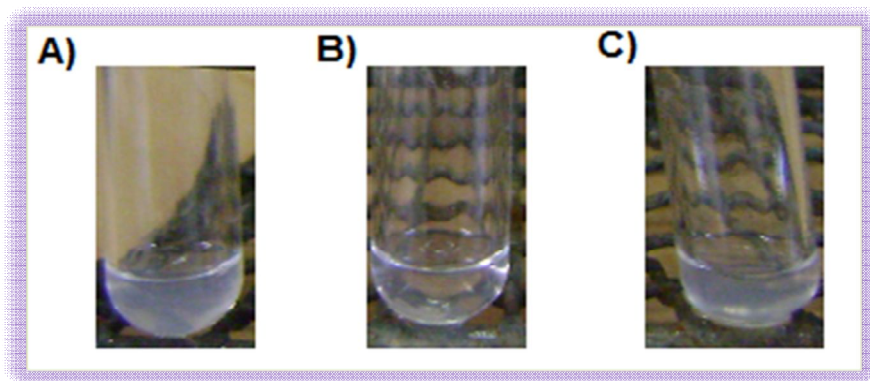


Figura 12. Ensayo de lisado de amebocitos de *limulus* (LAL). La presencia de endotoxina es determinada por la formación de un gel o coágulo insoluble. **A)** Control positivo (*E. coli* 055:B5), se puede apreciar la formación del coágulo insoluble; **B)** Control negativo (Agua libre de pirógenos), no hay formación de coágulo; **C)** Muestra (Toxina Pet), no se observa la formación de coágulo, por lo tanto la muestra es adecuada para continuar realizando nuestros ensayos propuestos.

9.2 Cuantificación de la concentración de proteínas en la toxina Pet.

Para la determinación de la concentración de proteína presente, se hizo el corrimiento por duplicado de la curva estándar así como de las muestras analizadas. Por extrapolación de las lecturas de absorbancias en las muestras, se determinó su concentración expresada en mg/ml. El comportamiento lineal de los estándares de BSA, mostró un coeficiente de correlación $r = 0.9987$ (**Figura13**).

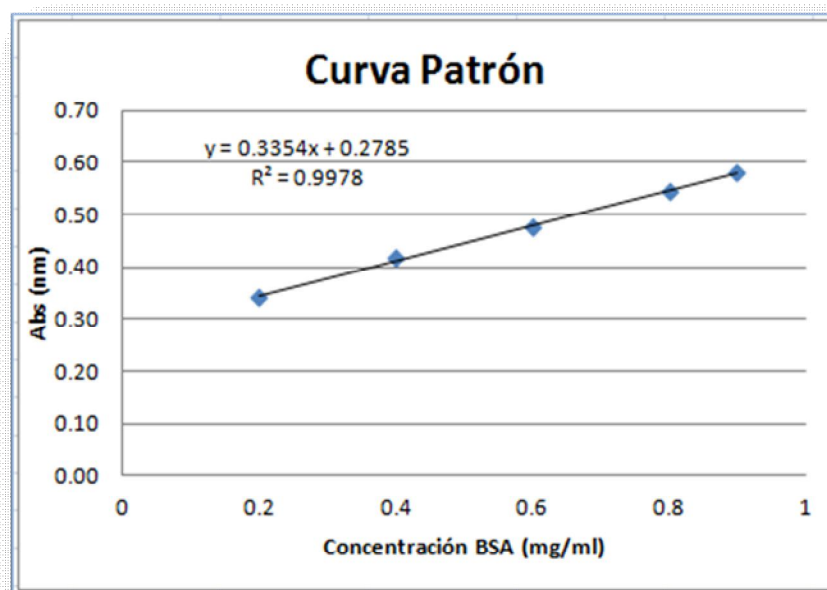


Figura 13. Curva estándar de BSA. Se observa el comportamiento lineal de los estándares de BSA la cual mostro un coeficiente de correlación de $r=0.9987$.

En la **tabla 4** se muestra la concentración de la toxina Pet a la par de la concentración determinada a 280 nm en el equipo NanoDrop, como se puede observar existe similitud en las concentraciones.

Tabla 4. Determinación de la concentración de proteínas en la toxina Pet. Analisis comparativo del método de Bradford y lecturas realizadas a 280 nm.

Toxina Pet	
Método	
Bradford	NanoDrop
0.146 mg/ml	0.095 mg/ml
Promedio	0.120 mg/ml

9.3 Caracterización inmunoquímica de la toxina Pet de *Escherichia coli*.

Una vez determinada la concentración de proteínas, se procedió a identificar la pureza de la toxina por diferentes ensayos inmunológicos. Uno de los primeros resultados fue el gel revelado con tinción de coomasie en donde se observó la presencia de una sola banda correspondiente a la toxina Pet (**Figura 14 A**) con un peso molecular de 108 KDa. Así también su comparación a otro antígeno no relacionado, antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS (seis bandas). Otro resultado también se obtuvo, empleando la tinción de plata, con la cual se muestra la banda bien definida que evidencia la presencia de la toxina (**Figura 14 B**).

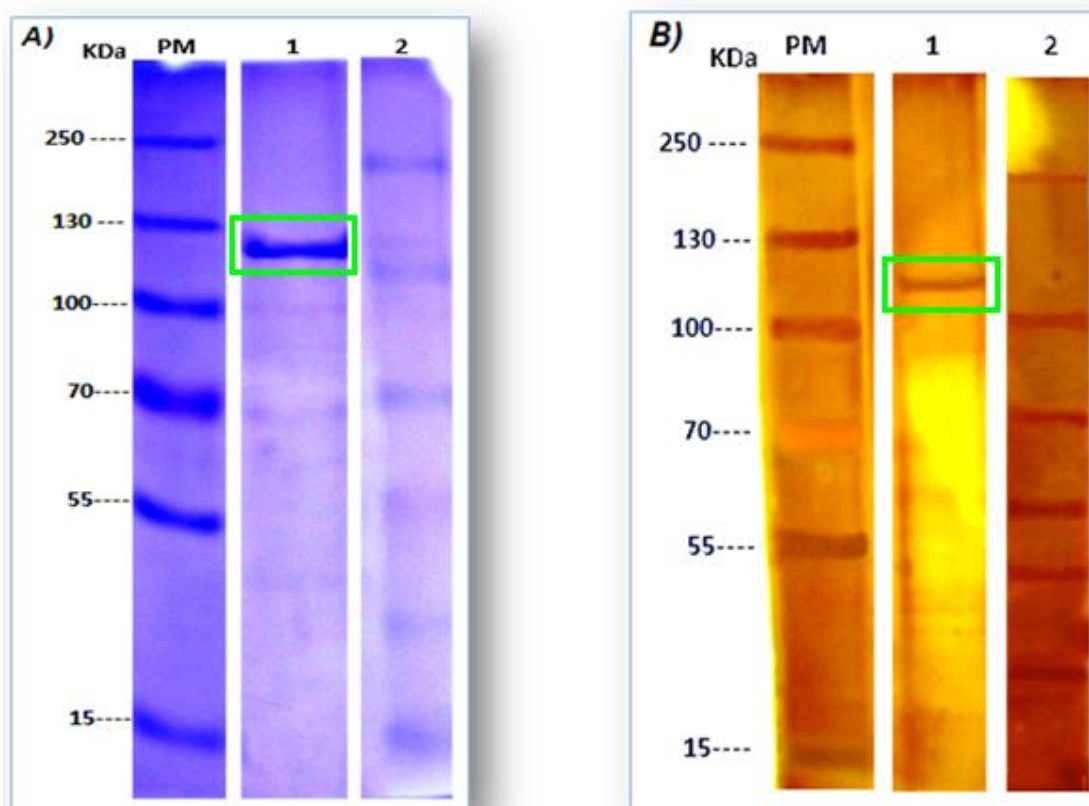


Figura 14. Perfil electroforético revelado con azul de coomasie y tinción de plata.

- A)** Perfil electroforético de la toxina Pet, revelado con tinción de Azul de Coomassie. **PM:** pesos moleculares; **1.** Toxina Pet; **2.** Antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS (antígeno no relacionado).
- B)** Perfil electroforético de la toxina Pet, revelado con tinción de Plata. **PM:** pesos moleculares; **1.** Toxina Pet; **2.** Antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS (antígeno no relacionado).

Para confirmar la identidad de la proteína se realizó un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal de conejo (anti-Pet), y el resultado mostró una reacción específica con la fracción de 108 KDa correspondiente a la proteína Pet revelado con BCIP/NBT (**Figura 15 A**).

Así mismo se realizó un revelado por quimioluminiscencia, observándose resultados similares (**Figura 15 B**).

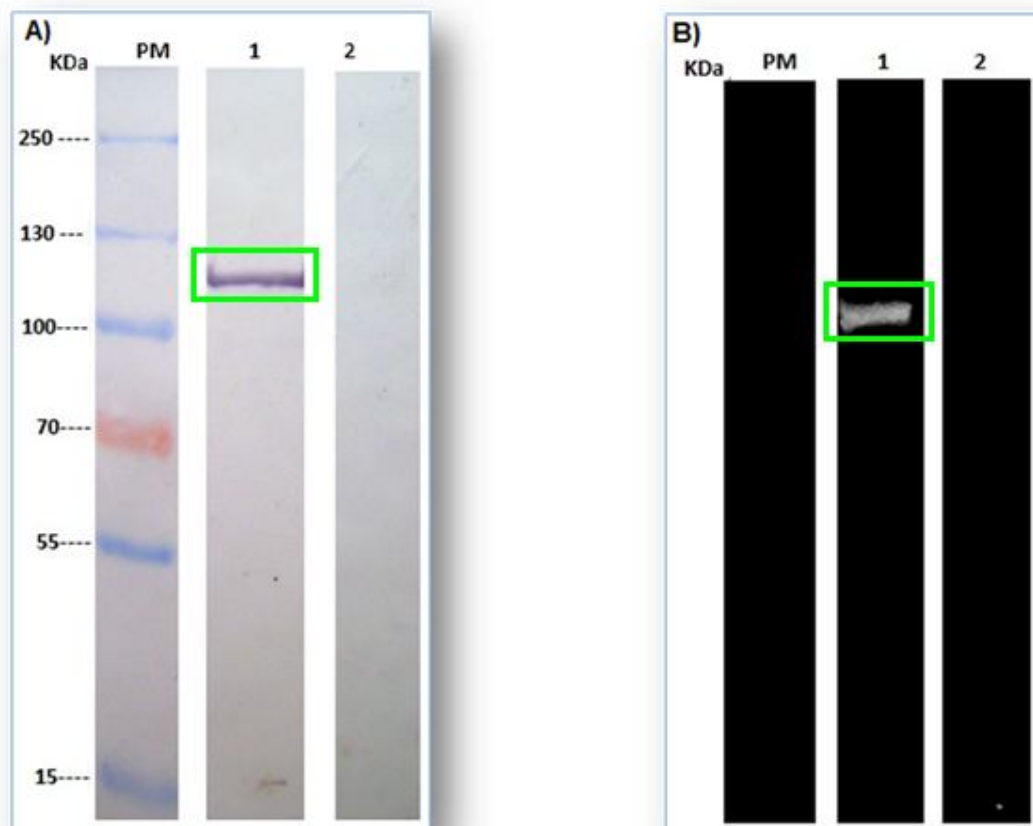


Figura 15. Caracterización de la toxina Pet por inmunotransferencia (Western-blot).

- A)** Identificación específica de la toxina Pet, con anticuerpo primario (anti-Pet) a una dilución 1:500, detectado con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 en PBS. La reacción se evidenció agregando BCIP/NBT. **PM:** pesos moleculares; **1.** Toxina Pet; **2.** Antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.
- B)** Identificación de la toxina Pet, revelado por quimioluminiscencia con anticuerpo primario (anti-Pet) a una dilución 1:1000 y posteriormente se adiciono un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a una dilución 1:10 000. La reacción se hizo evidente agregando una mezcla 1:1 de los reactivos del kit de Chemiluminescent HRP Substrate Millipore (*ver apéndice*). **PM:** pesos moleculares; **1.** Toxina Pet; **2.** Antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS.

9.4 Efecto de la toxina Pet sobre la migración dirigida (quimiotaxis) de macrófagos humanos.

Como parte del análisis de la respuesta inmune a Pet, se investigó su función quimiotáctica de macrófagos a través del conteo manual en cámara de Boyden. La respuesta migratoria de los macrófagos al estímulo de Pet fue observada con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la toxina después de 90 min (**Figura 16 C**). El número de células obtenidas se comparó a un quimioatrayente conocido (control positivo Zymosan opsonizado) (**Figura 16 B**), este último incluyó la máxima migración (**Figura 16 D**), sin embargo; es notorio el efecto quimioatrayente de Pet sobre la población de estudio (Zymosan 25 vs 15 Pet). Estos resultados demuestran que la toxina Pet, puede reclutar a macrófagos.

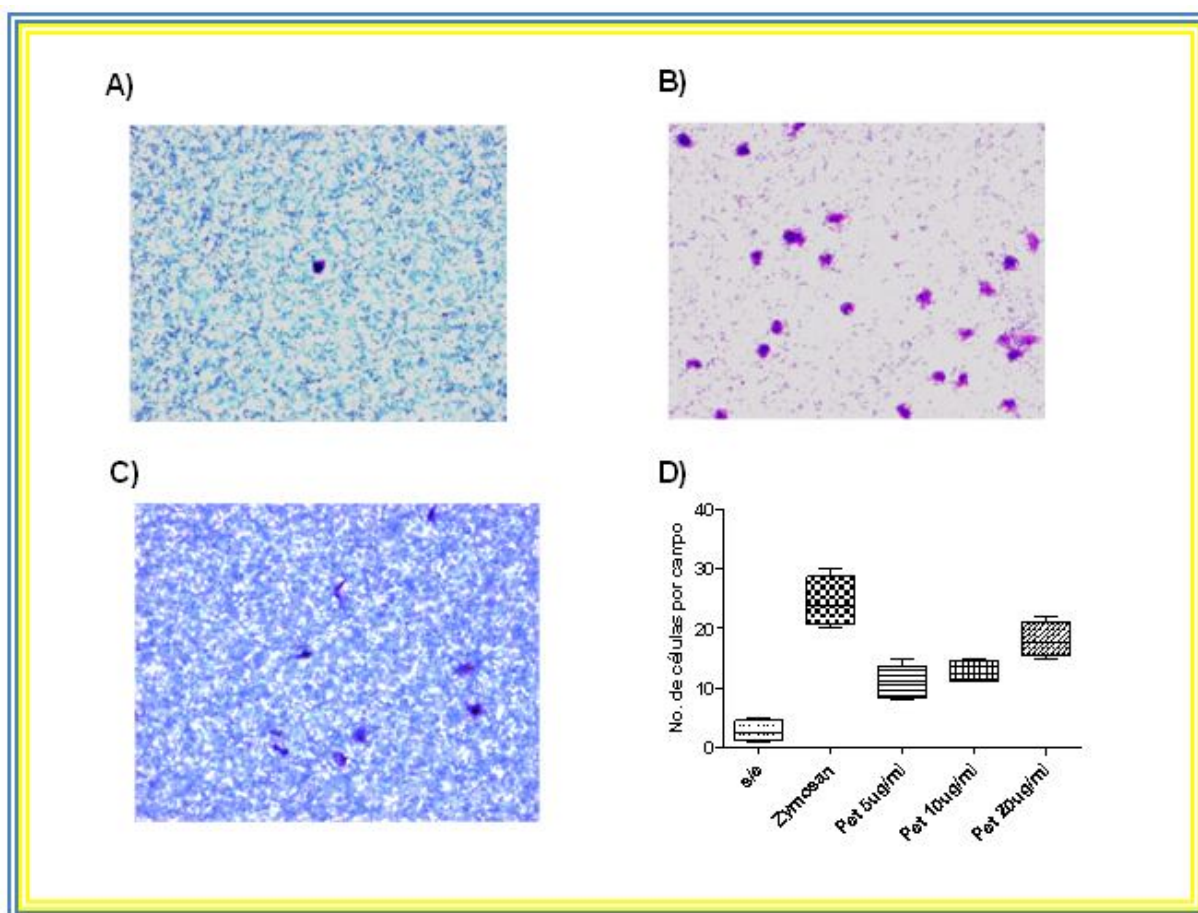


Figura 16. Efecto de la toxina Pet sobre la migración dirigida (quimiotaxis) en MDM. a) Sin estímulo (BSA/0.5% en solución de balanceada de Hanks. **b)** Zymosan opsonizado con suero AB al 20% (control positivo) y **c)** Pet a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, **d)** porcentaje de células positivas a p65. Las imágenes son representativas de 3 experimentos.

9.5 Producción de IL-8, TNF- α e IL-10 por macrófagos humanos tratados con proteína Pet de *Escherichia coli*.

Para caracterizar el efecto de la toxina Pet sobre la respuesta inmune innata en el hospedero, se analizó la secreción de citocinas de respuesta pro y anti-inflamatoria en un modelo *in vitro* utilizando a macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (MDM). Los MDM fueron tratados durante 6 y 24 horas con diferentes concentraciones de Pet (0 a 20 $\mu\text{g/ml}$). De forma muy importante se observó que la toxina Pet indujo la producción de interleucina-8 (IL-8) en los MDM tratados. La máxima concentración de IL-8 fue producida a las 6 h cuando se trató con 10 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína Pet (7,247.5 pcg/ml) (más de 10 veces de incremento) en comparación a las células sin tratamiento (523.97 pcg/ml) (Figura 17).

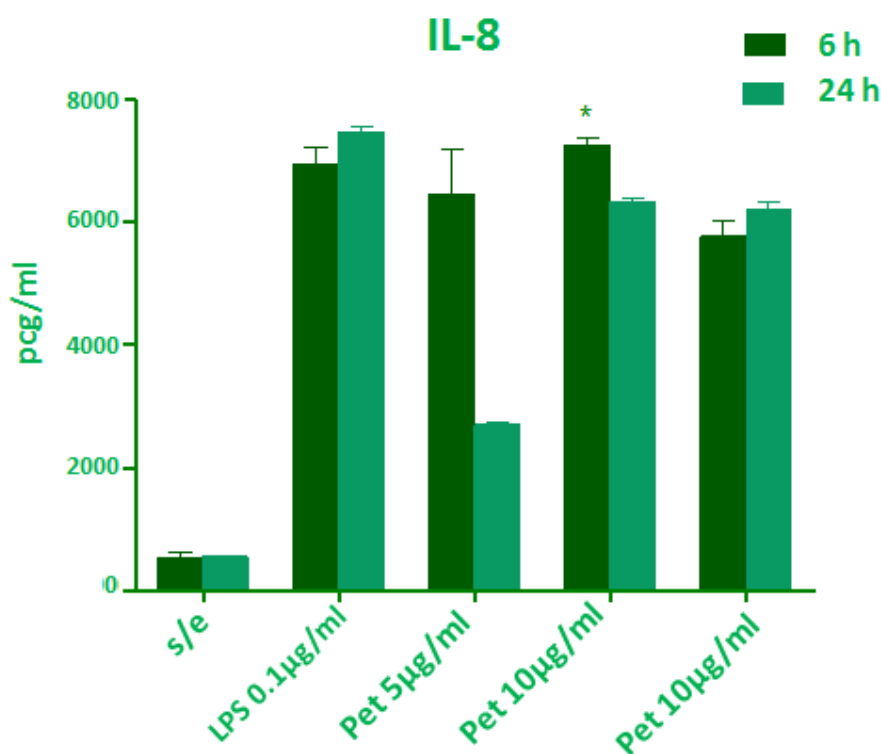


Figura 17. Evaluación de la síntesis de IL-8 inducida por la proteína Pet en MDM durante 6 y 24 horas de estimulación. Los MDM se trataron con diferentes concentraciones de Pet y tiempo de estimulación. Los sobrenadantes se recolectaron y la determinación de la IL-8 se llevo a cabo por método de ELISA. En este caso, para la cuantificación de la producción de esta citocina fue necesario realizar una dilución 1:10 de los sobrenadantes de cultivo debido a que la concentración de la misma estuvo por arriba del límite máximo de detección. Las concentraciones son el resultado de muestras por duplicado \pm desviación. En un total de 4 experimentos realizados.

*[($p < 0.05$) Células MDM tratadas con Pet vs células sin tratamiento]

La estimulación con Pet a las otras concentraciones utilizadas en este estudio (20 y 5 $\mu\text{g/ml}$) se observaron niveles importantes de esta citocina inflamatoria 5,785.68 pcg/ml y 6,481.25 respectivamente (**Figura 17**). La producción de esta citocina en comparación a un estímulo conocido LPS de *Escherichia coli* (molécula tipo PAMPs), se observa la inducción de esta citocina ya referida en la literatura; en este estudio utilizada como un control positivo de activación de los MDM analizados (**Figura 17**).

La concentración de IL-8, por la estimulación de LPS es similar a la toxina Pet a 10 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo es importante observar que en el caso de LPS, la concentración es 50 veces menor comparada a dicha proteína; es decir bajo la condiciones de este ensayo requerimos de una concentración mayor de la proteína Pet para inducir valores similares a la estimulación con LPS.

De forma similar la respuesta de TNF- α (otra citocina pro-inflamatoria), se observó la inducción de forma temprana (6 horas) en los MDM tratadas con Pet. Su producción alcanza valores de alrededor de 400 pcg/ml cuando las células se trataron con concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de la toxina Pet respectivamente. (**Figura 18**).

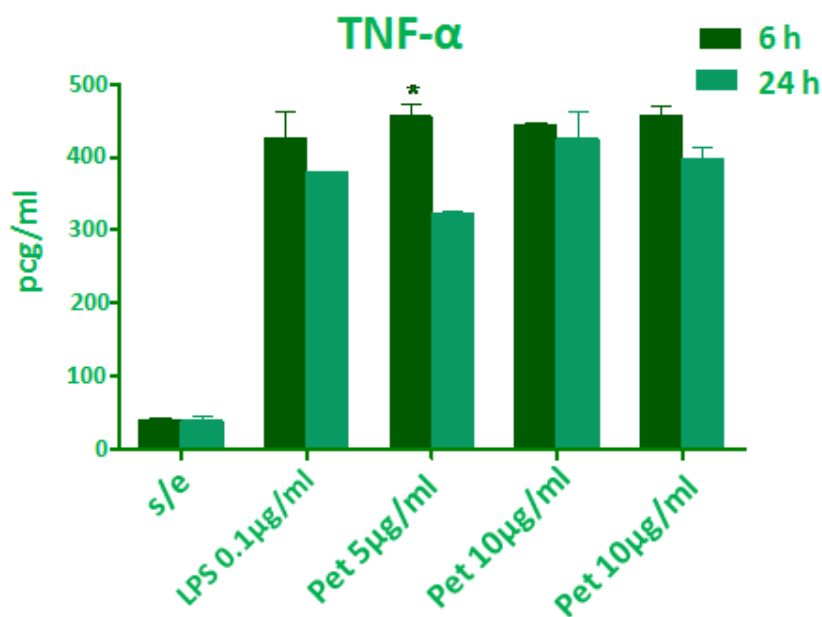


Figura 18. Efecto de Pet sobre la producción de TNF- α en MDM. Las células fueron tratadas con Pet durante 6 y 24 horas. Posteriormente se recolectaron los sobrenadantes de las células estimuladas y no estimuladas con la toxina Pet y la cuantificación de TNF- α se realizó por método de ELISA. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar en muestras por duplicado de cuatro experimentos.

*[($p < 0.05$) Células MDM tratadas con Pet (5 $\mu\text{g/ml}$) vs células sin tratamiento]

Sin embargo, el efecto de Pet sobre la producción de TNF- α se mantiene por más tiempo (24h) no observando una reducción significativa después de las 24 horas (457.145 vs 397.17 pcg/ml; 444,03 vs 425.9 pcg/ml). Solamente cuando las células fueron tratadas con 5ug/ml de la toxina (455.705 vs 323,9 pcg/ml). **(Figura 18).**

Para eliminar la posibilidad de que la activación de macrófagos fuera asociado al LPS residual a pesar de los ensayos de detección de endotoxina se analizo el efecto de la polimixina B sobre la activación inducida por Pet (PMB) (10 μ g/ml, 1 hora previa al tratamiento con el estímulo respectivo) **(Figura 19).** Un control interno en la secreción de la producción de citocinas fue el utilizar la estimulación con 0.1 μ g/ml de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 el cual indujo alrededor de (6,946.5 pcg/ml) en los macrófagos **(Figura 19).**

Como se puede observar la respuesta se reduce alrededor del 100% cuando los MDM fueron tratados con PMB en presencia de la estimulación con LPS. En el caso de la toxina Pet no se observó efecto del tratamiento de PMB en los MDM tratados en la concentración de 20 μ g/ml de la toxina, sin embargo de acuerdo a lo esperado, la misma cantidad de PMB (un inhibidor al efecto biológico del lípido A del LPS) redujo considerablemente el efecto de la estimulación con LPS de *E. coli*.

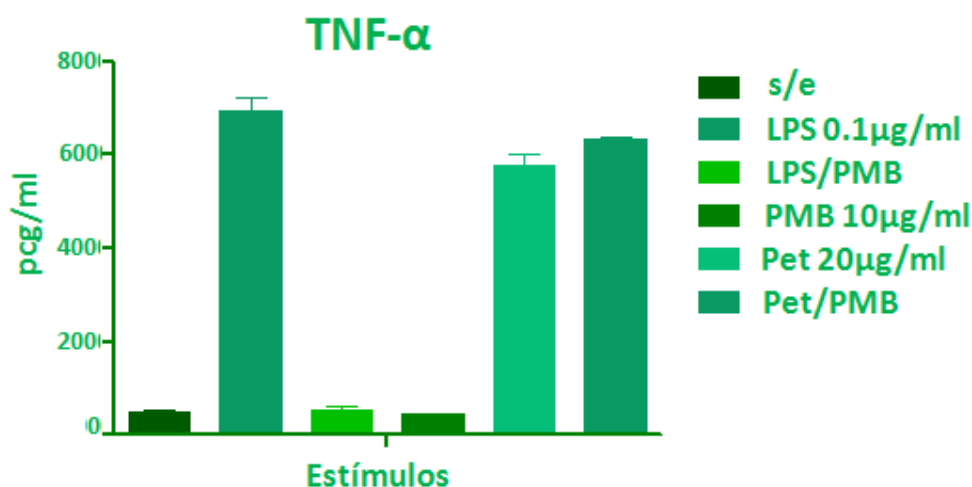


Figura 19. La síntesis de TNF- α inducida por la toxina Pet en los MDM no se inhibe al tratamiento de polimixina B. La toxina pet (20 μ g/ml) fue incubada con 10 μ g/ml de polimixina B (PMB) durante 1 hora antes de la estimulación con los MMD (1x10⁵ células/ml). Como control interno se utilizó el LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 que fue tratado de misma forma que la toxina Pet. Después de 6 horas de activación se determinó la concentración de TNF- α en los MDM tratados y sin tratar.

Estos resultados indican que el efecto biológico en los macrófagos es debido a la toxina Pet y no a al LPS residual y esta situación se evaluó para la producción de TNF- α como se puede observar en la **(Figura 19)**. En este caso se evaluó el efecto de PMB sobre la concentración de 20 μ g/ml de la toxina Pet, considerando que fue la máxima concentración de toxina utilizada en este trabajo.

Por otra parte, la síntesis de citocina anti-inflamatoria (IL-10), que se indujo en los MDM tratados con Pet fue máxima a las 6 horas; e independientes de la concentraciones de Pet (484.12, 434.96 vs 452.98 pcg/ml) utilizadas en esta tesis **(Figura 20)**. No obstante, después de las 24 horas se observó una reducción de más del 60% en la producción de la IL-10 (199.147 vs 86.21 pcg/ml) a concentraciones de 20 y 10 μ g/ml y cerca del 100% cuando se trató con 5 μ g/ml (452.984 vs 14.8 pcg/ml) **(Figura 20)**.

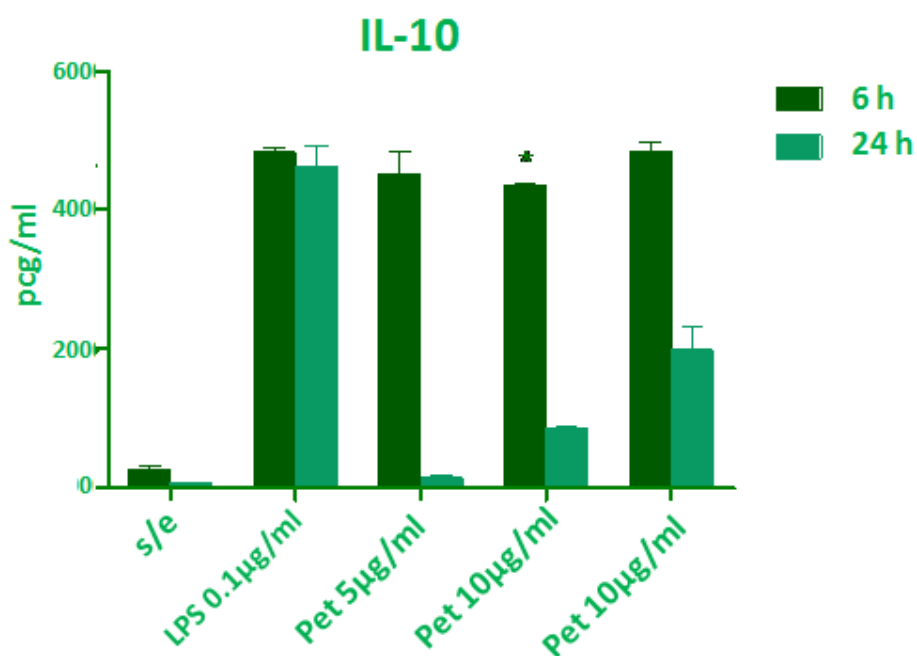


Figura 20. Secreción de IL-10 en MDM tratados con toxina Pet de *Escherichia coli*. La síntesis de la IL-10 se evaluó en sobrenadantes de MDM tratados con concentraciones de Pet, después de 6 y 24 horas de estimulación. La cuantificación de la citocina se comparó a una curva estándar utilizando el método de ELISA. A la par se preparó un control interno del ensayo de la estimulación con LPS de *Escherichia coli*, 0111:B4 a 0.1 μ g/ml. Los resultados son representados por el promedio en muestras por duplicado \pm la desviación estándar.

*[($p < 0.05$) Células MDM tratadas con Pet vs células sin tratamiento]

Este resultado nos llama la atención por el hecho de que la secreción de IL-10 se produce en fases tardías, sin embargo, bajo estas condiciones experimentales el tratamiento con Pet produce IL-10 en valores significativos comparado a las 6 horas de estimulación, disminuyendo significativamente a las 24 horas.

9.6 Evaluación de toxina Pet en la translocación del factor nuclear NF- κ B.

Para observar parte de la señalización a la activación de macrófagos por la toxina Pet extraída de *Escherichia coli*, se analizó la translocación de la proteína p65 por inmunofluorescencia indirecta.

El tratamiento con la toxina Pet a 10 μ g/ml induce la translocación de esta proteína del citoplasma al núcleo. Asimismo, observamos colo-localización de p65 (NF- κ B) en las células contrastadas con tinción nuclear (Hoescht) (**Figura 21**).

Los macrófagos estimulados con la toxina Pet muestran localización nuclear a la proteína p65 de NF- κ B. Como se puede observar en las células tratadas con toxina Pet que exhiben tinción al anticuerpo de p65 demostrado por la presencia de fluorescencia positiva. Así también, se observó la positividad a p65 cuando las células se trataron con LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (control positivo) (**Figura 21**).

Para confirmar la activación de Pet de forma cuantitativa, se determinó el porcentaje de células positivas a p65 (**Figura 22**), en donde la Pet induce un porcentaje significativo de p65 casi del 60%, comparado al 90% inducido por LPS (control positivo).

Este efecto fue observado en forma temprana después de 30 min de adicionar los estímulos. Estos resultados también muestran que Pet induce activación y translocación de NF- κ B.

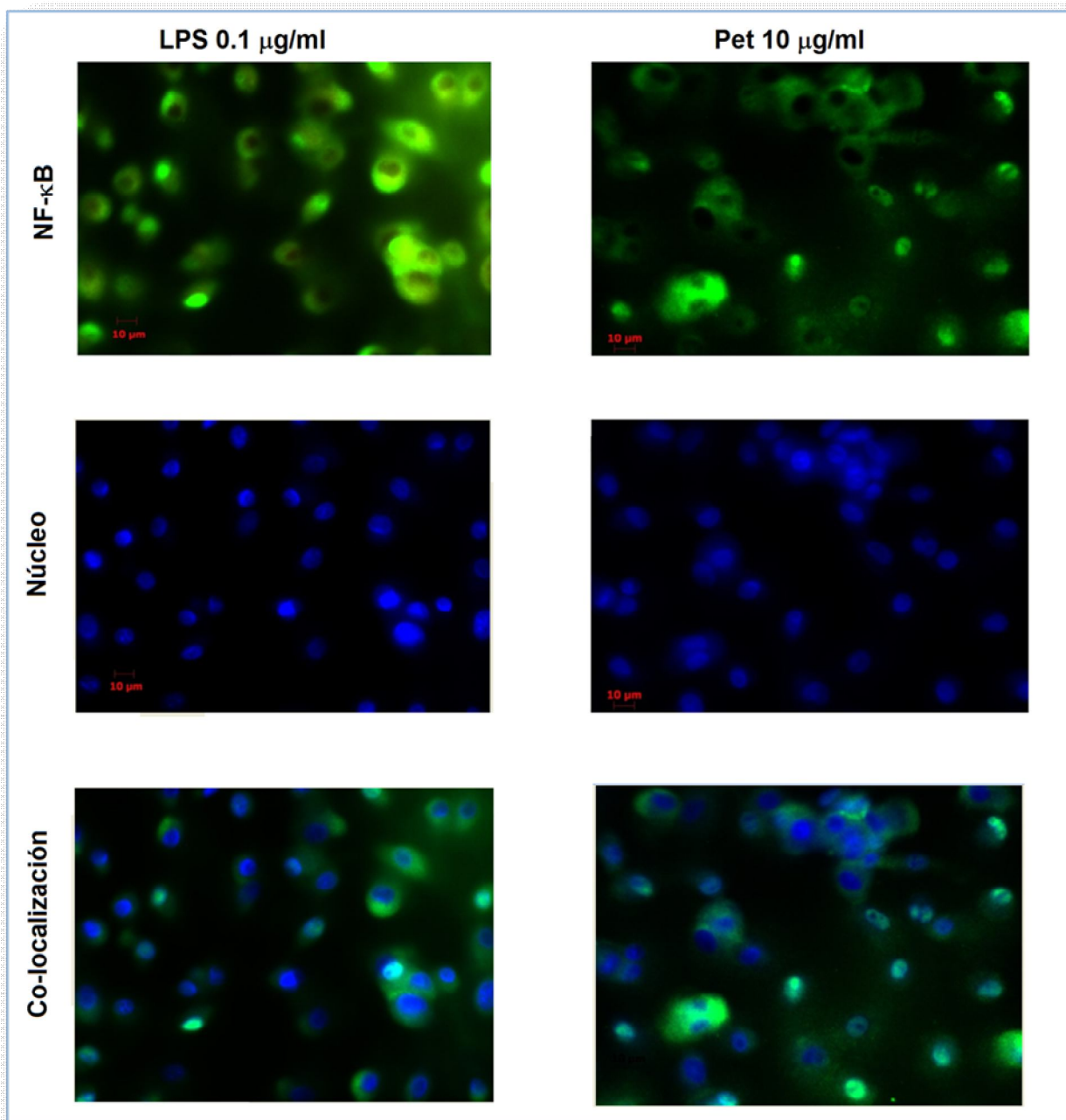


Figura 21. Microscopia confocal a la activación de NF- κ B . MDM se trataron *in vitro* por 30 minutos con Pet (10 μ g/ml) o LPS 0.1 μ g/ml (control positivo). La morfología nuclear identificada por Hoescht (fluorescencia azul) y MDM con positividad a p65 (fluorescencia verde). La translocación es confirmada por la colo-localización. Las imágenes fueron analizadas en Microscopio AXIO Imager M.2 Marca Carl Zeiss y de acuerdo al programa pre-establecido Axion Vision Rel 4.8.

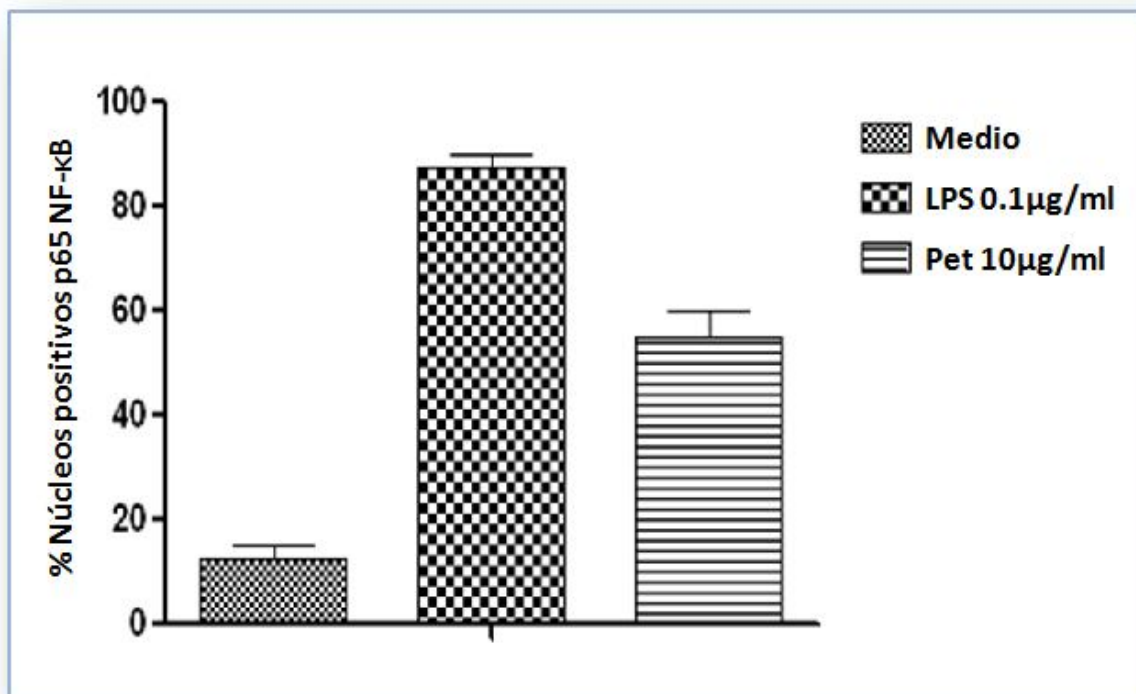


Figura 22. Activación de NF-κB por inmunofluorescencia.

Porcentaje de células positivas a p65. Los resultados son representativos de 3 experimentos. las imágenes fueron analizadas en Microscopio AXIO Imager M.2 Marca Carl Zeiss y de acuerdo al programa pre-establecido Axion Vision Rel 4.8.

*[($p < 0.05$) Células MDM tratadas con Pet (10 µg/ml vs células sin tratamiento)]

10 DISCUSIÓN

El autotransporte (AT) es una vía de secreción de proteínas que se encuentra en las bacterias gram-negativas (**Jacob-Dubuisson et al, 2004**). Desde el punto de vista médico, el AT es un evento importante, debido a que por esta vía las proteínas son secretadas al espacio extracelular y puede interaccionar de manera directa con las células-blancas del hospedero (**Tsang et al, 2010**). Una subfamilia importante de proteínas AT son las serinas-proteasas-autotransportadoras de la familia Enterobacteriaceae (SPATEs). Las SPATEs son factores de patogenicidad importantes que causan daño severo a la mucosa intestinal de distintos hospederos entre ellos, el humano (**Herdenson IR et al, 2004**).

La proteína Pet, es un miembro de este grupo de proteínas autotransportadas (**Eslava et al, 1998**) y su actividad citotóxica fue identificada sobre tejido yeyunal de ratas (**Navarro-García et al, 1998**). Posteriormente por estudios *in vitro* se observó el mismo efecto en células epiteliales de intestino (**Herdenson IR et al, 2004**).

La proteína Pet de *Escherichia coli* es multifuncional (adhesina, toxina, y enzima). Por estudios de microscopía confocal y técnicas inmunológicas, se ha demostrado tráfico intracelular importante de la proteína Pet en modelo de células epiteliales; así también una función significativa sobre la modulación de motilidad intracelular, procesamiento y maduración de otras proteínas de AT (**Maroncle NM et al, 2006**).

Si bien, diversos autores han definido, a Pet como enterotoxina en el modelo *in vitro* de células epiteliales; su participación en la respuesta inmune innata del hospedero, no es contundente. En este trabajo, se observó que la toxina Pet induce actividad quimiotáctica significativa sobre los macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica humana.

Al respecto, la función quimiotáctica, es un evento molecular de la inmunidad innata, que forma parte de los procesos de activación de la respuesta inflamatoria del hospedero.

La migración dirigida (quimiotaxis) está modulada por gradientes de moléculas quimiotácticas; la más estudiada, (la quimiocina IL-8) secretada por diferentes células

inmunes (principalmente leucocitos polimorfonucleares y macrófagos). Otras moléculas con propiedades quimioatrayentes incluyen a péptidos formilados (FMLP), moléculas PAMPs (Zymosán), componentes del sistema de complemento (C5a) y mediadores inflamatorios (leucotrienos) **(Phillipson M et al, 2011)**.

En apoyo al efecto quimiotactico inducido por Pet, otros autores han demostrado resultados similares en los macrófagos de la línea celular J774 (clona A1). En donde el efecto de migración dirigido por la toxina se observó a los 90 minutos de incubación *in vitro*. **(Benitez-Guzmán et al, 2011)**.

En contraste, otros trabajos utilizando una toxina SPATEs distinta, como la toxina Pic (de colonización) no observaron efecto sobre la migración de células inflamatorias (principalmente PMN). Sin embargo Pic es capaz de aumentar la producción del estallido respiratorio en estas células, dependiente de la concentración y del dominio de proteasa. Así mismo, Pic mutada ejerce una fuerte respuesta inflamatoria en comparación a la proteína no mutada. **(Ruiz-Pérez et al, 2011)**.

El balance pro-y anti-inflamatorio de estas proteínas SPATEs (Pet y Pic) podría representar mecanismos de inmunomodulación importantes al reclutamiento o no de células inmunes. Además la secreción de estas proteasas podría explicar parte de los eventos inflamatorios observados en la infección natural por *E. coli* patógena.

Aunado a lo anterior, las proteasas bacterianas de ciertos grupos de patógenos ejercen acciones de estimulación o inhibición de funciones biológicas específicas. Por ejemplo, la proteasa de 56 KDa reportada en *Serratia marcescens* tiene la capacidad de inhibir la actividad quimiotactica a la molécula de C5a **(Oda et al, 1990)**.

De forma similar, a la proteasa de *Serratia*, otra proteasa (del grupo metal-proteasas tipo mucinas (STcE)) inhibe la activación de leucocitos humanos vía glicoproteínas presentes en la superficie de la membrana de los neutrófilos **(Grys et al, 2005)**.

Esta proteasa (STcE) también es promotora de adhesión y se asocia a las lesiones inducidas por la cepa de *E. coli* 0157:H7 en el síndrome urémico hemolítico (**Orth et al, 2010**).

El papel inmunomodulador de la proteína STcE sobre estas células explica parte de fenotipos alterados de neutrófilos que son observados durante la enfermedad inducida por este patotipo de *Escherichia coli* 0157:H7 (**Szabady RL et al, 2009**).

La interacción de mucinas expresadas en *E. coli* y las glicoproteínas homologas a mucinas presentes en la superficie de células blanco (neutrófilos) es un mecanismo recientemente descrito y el cual involucra a proteasas, como la toxina Pic (**Ruiz-Pérez et al, 2011**). Así también, se ha hipotetizado que dicha toxina podría interferir en la activación de los neutrófilos por bloqueo de ligandos específicos a estas moléculas de superficie, siendo un blanco probable de las mismas (**Ruiz-Pérez et al, 2011**).

Glicoproteínas como CD43, CD44, CD45 CD93 y el grupo de las selectinas, son moléculas similares a mucina expresadas en forma abundante y exclusiva sobre la superficie de células hematopoyéticas (neutrófilos y otras células inflamatorias). Estas glicoproteínas unen moléculas-ligando tipo glicana (oligosacaridos) y presentan función importante para la adhesión de los leucocitos al endotelio, la migración y el trafico celular (**Woermans et al, 2000**).

La inducción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en los macrófagos es un fenómeno involucrado en la regulación de la respuesta inmune innata. Nuestros resultados muestran que Pet induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias, entre ellas, la producción de IL-8.

Esta quimiocina fue sintetizada por los macrófagos desde etapas tempranas de interacción con la toxina Pet (6 horas). La estimulación de macrófagos, a las diferentes concentraciones de Pet utilizada produjo cantidades similares de IL-8. Sin embargo, es importante mencionar que las concentraciones de Pet utilizadas en este trabajo resultan menores a las reportadas en otros eventos biológicos (37µg/ml para el análisis del trafico intra-celular y endocitosis) (**Navarro-García et al, 2007**).

La quimiocina (IL-8) detectada en el presente trabajo fue significativamente elevada comparada a la evaluación de otras citocinas (TNF- α e IL-10). La inducción de IL-8, ha sido previamente reportada en respuesta a la bacteria completa, y en el análisis de moléculas tipo PAMPs (LPS, flagelina) **(Edward et al, 2011)**.

De acuerdo a las condiciones experimentales de este trabajo, la respuesta de IL-8 por la proteína Pet fue similar a la inducida por LPS; sin embargo tenemos que la secreción máxima se alcanza con 50 veces más la concentración de Pet, con respecto a la molécula de LPS (5 μ g/ml vs 0.1 μ g/ml). Este dato sugiere que la toxina Pet es un estímulo pro-inflamatorio menos potente que el lipopolisacárido.

Nuestros resultados también demuestran, la síntesis de TNF- α . Ambas citocinas, IL-8 y TNF- α se mantienen en niveles significativos aún después de 24 horas. Así mismo, IL-8 y TNF- α son citocinas que tienen efectos biológicos muy importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la activación de los macrófagos **(Clark et al, 2007)**.

Estudios previos han destacado, a IL-8 y TNF- α como las primeras citocinas detectables en la fase temprana de los procesos inflamatorios **(Narayan Parameswaran et al, 2011)**. La citocina de TNF- α además regula muchas de las facetas de función inmune de los macrófagos y también es liberado rápidamente después de traumas infección o exposición a LPS derivado de bacterias; su papel es central a la activación y al reclutamiento celular de macrófagos, y el cual ha sido observado en varias infecciones inflamatorias crónicas **(Narayan Parameswaran et al, 2011)**.

La premisa al análisis de citocinas inflamatorias por la toxina Pet, parte de estudios previos *in vivo*, en donde se observa un infiltrado importante de las células mononucleares previo a la inoculación de la toxina Pet. Apoyado en modelo de asas intestinales de rata; este hallazgo preliminar asociado a los nuevos datos obtenidos en esta trabajo refuerzan la hipótesis de que la toxina Pet favorece el reclutamiento de células inflamatorias y una significativa respuesta inflamatoria.

Ensayos previos con la toxina purificada utilizando el modelo de asas ligadas en intestinos de rata, mostraron un reclutamiento importante de células en el tejido con la aparición de necrosis y daño del epitelio intestinal severo. Los datos obtenidos en nuestro trabajo, son relevantes para asegurar la participación de Pet en las alteraciones observadas en el modelo animal y sugieren de manera importante la participación de proteínas parecidas a Pet en las alteraciones observadas en los cuadros de enfermedad inflamatoria crónica (Crohn) y colitis ulcerativa (**Eslava et al; 1993**).

Al contrario de la producción de IL-8 y TNF- α , la citocina IL-10 tiene propiedades anti-inflamatorias, inmunosupresoras y controla además funciones efectoras de los macrófagos (**Sabat et al, 2010**). La producción de IL-10 inducida por Pet fue detectable en mayor concentración a las 6 horas. Sin embargo, se observó una disminución de alrededor del 50% después de las 24 horas. Este resultado llama la atención, porque la síntesis y cinética de la producción de la IL-10 es un evento tardío y bajo las condiciones experimentales de estudio, los niveles de IL-10 disminuyeron significativamente a las 24 horas, comparado al efecto de LPS.

Este resultado sugiere:

- Un efecto de polarización de respuesta inmune TH1 por la proteína Pet debido a la elevada concentración de TNF- α observada a las 24 horas,
- La inducción transitoria de IL-10 por Pet a las 6 horas, podría promover un mecanismo de inmunosupresión transitoria que permita la sobrevivencia de *E. coli* en el intestino, o bien su adaptación a nuevos nichos.

Este efecto transitorio se ha observado en el reto a otros patógenos que muestran que la IL-10 media la regulación negativa de la respuesta inmune innata, lo que podría representar un riesgo para el hospedero (**Sing A et al, 2001**).

Por otro lado, la inducción de citocinas pro y anti-inflamatorias mantienen un estado de alerta en los macrófagos, su síntesis, al igual que muchas otras moléculas requieren de una o más cascadas de señalización para activar la transcripción de genes específicos en las células (**Rahman MM et al, 2011**).

Los receptores tipo toll (TLRs) expresados también en los macrófagos activan cascadas de señalización extracelular después de reconocer moléculas tipo PAMPs, lo cual conduce a la liberación de NF- κ B y translocación al núcleo. Los resultados de nuestro trabajo muestran que la toxina Pet induce la translocación de la proteína p65 en forma significativa después de 30 minutos de estimulación. Así mismo, se observó 60% de positividad a la p65, a diferencia del 90% observado en las células tratadas con LPS en las mismas condiciones.

Varios reportes señalan que la activación del factor de transcripción NF- κ B puede darse, en respuesta de la estimulación de células por diversos estímulos como patógenos y/o moléculas bacterianas (**Masmudur M et al, 2011**), su translocación del citoplasma al núcleo es un evento involucrado en la cascada de señalización a la síntesis de diferentes citocinas, siendo un resultado esperado en nuestro trabajo debido a la producción de citocinas observada a la toxina Pet, en la población celular de estudio.

Esta información es acorde a trabajos previos de (**Benitez-Guzman et al, 2011**) que demuestran la expresión temprana de RNAm de varios mediadores inflamatorios la IL-1, TNF- α , MIF, receptor antagonista de IL-1 (LTRA) en macrófagos peritoneales activados por la proteína Pet. Además, involucra la participación de las proteínas iKK α β /NF- κ B y las MAPs cinasas sobre la síntesis de estos mediadores y sugiere a la toxina Pet como un importante factor a la respuesta inflamatoria de tipo crónica (**Benitez- Guzman et al, 2011**)

Por otra parte, en la evaluación de la respuesta inmune innata a Pet, no se ha determinado cuales serían los blancos receptores de la molécula Pet, en su efecto sobre las células inmunes del hospedero. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo (perfil pro-inflamatorio) más significativo, existe la posibilidad de asociación a respuestas inmunes TH1. Así mismo, la información de este trabajo, abre nuevos caminos de investigación al análisis de las moléculas tipo PRRs involucradas en la síntesis de mediadores pro y anti-inflamatorios inducidos por la toxina Pet de *Escherichia coli* en los macrófagos humanos.

En resumen el conocimiento de la respuesta inmune innata a la toxina Pet hasta el momento se integra en la **Figura 23**. En donde se muestran parte de los eventos propuestos a Pet, sobre la activación de macrófagos basados en los resultados de este trabajo. Es importante mencionar que se aporta el efecto quimioatrayente a dicha activación, de Pet en la cual incluye la secreción de citocinas (pro- y anti-inflamatorias) asociadas a la señalización del factor NF- κ B.

Finalmente, los efectos biológicos de la toxina Pet en asociación a los reportes recientes de la toxina Pic miembro de las SPATEs, sugieren que pueden representar estrategias de inmunomodulación de la bacteria al sistema inmune innato y ser empleados como blancos probables de terapia (Pet-estimulación) con posibilidad de adyuvante a otros antígenos y (Pic-inhibición).

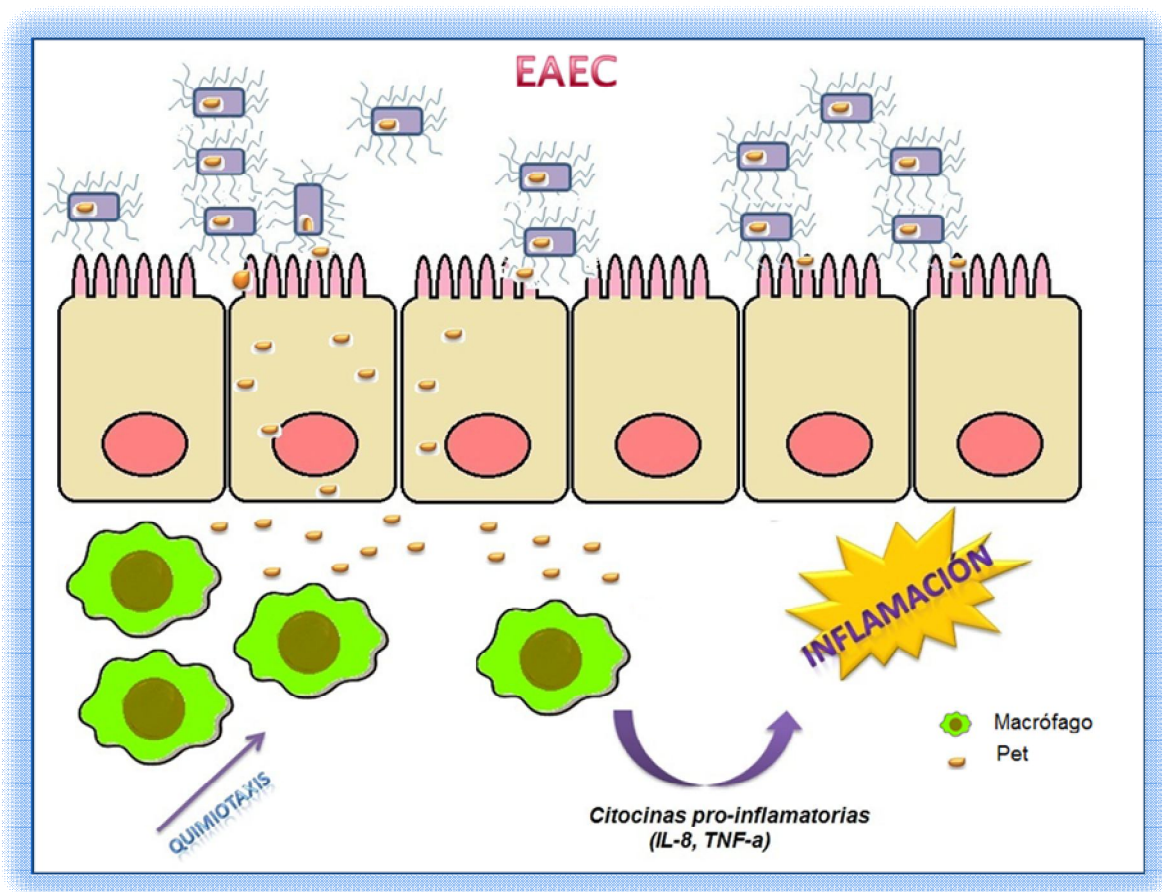


Figura 23. Respuesta inmune innata a la toxina Pet de *Escherichia coli*. La EAEC expresa a la toxina Pet liberándola al espacio extracelular. Esta toxina (Pet) induce la migración de macrófagos (células inflamatorias) y la síntesis de Citocinas IL-8 y TNF- α , favoreciendo el proceso inflamatorio inducido por la bacteria.

11 CONCLUSIONES

- 1.- La proteína Pet de *Escherichia coli* HB101 (pCEF1), miembro importante de las SPATEs induce migración dirigida sobre macrófagos humanos y la señala como una molécula quimioatrayente a estas células.
- 2.- Pet induce respuesta inflamatoria significativa asociada a la producción de IL-8 y TNF- α .
- 3.- Pet, también tiene la capacidad de producir respuesta anti-inflamatoria, a través de la síntesis de IL-10 en forma temprana y transitoria.
- 4.- La activación de los mediadores pro- y anti-inflamatorios evaluados en los macrófagos estimulados con Pet involucra a la activación y translocación del factor NF- κ B.
- 5.- De acuerdo al perfil pro-inflamatorio inducido por la toxina Pet, sugiere la participación de posibles grupos de moléculas PRRs asociados a su reconocimiento y activación de la respuesta inmune innata.

12 PERSPECTIVAS

- ☉ Con base en la información obtenida en este trabajo se abren nuevas posibilidades de investigación a futuro.
- ☉ Analizar si existe la participación de moléculas PRRs a la activación por la toxina Pet para comprender y explicar la participación del sistema inmune innato a nivel molecular.
- ☉ Es recomendable investigar si los toll-like receptors (TLRs) están involucrados en la señalización por Pet.
- ☉ Evaluar a otros mediadores inflamatorios, por ejemplo la producción de óxido nítrico y de otras citocinas anti- inflamatorias, por ejemplo TGF- β .
- ☉ Evaluar el efecto de la toxina Pet sobre la función fagocítica de los macrófagos en respuesta a otras bacterias.
- ☉ Estudiar el papel de la toxina Pet en otras funciones efectoras de los macrófagos (función fagocítica en respuesta a otras bacterias)
- ☉ Analizar la posible respuesta adyuvante de Pet a otros antígenos
- ☉ En la actualidad, parte del grupo de esta línea investigación tiene disponibles péptidos inmunodominantes a la proteína Pet de *Escherichia coli*, por lo que sería importante investigar si estos péptidos tienen los mismos efectos biológicos de la toxina.
- ☉ Evaluar la importancia de los sitios de reconocimiento importantes de la toxina Pet a través de emplear toxina Pet mutada, y observar si se presentan los mismos efectos que la toxina no mutada.

13 BIBLIOGRAFÍA

Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **2009**;4:143-156

Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*, **2007**;23(1): 16-20.

Barton GM. A calculated response: control inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, **2008**; 118:413-20.

Benítez-Guzmán Alejandro, Carlos Eslava, Claudia González-Espinosa y M.Eugenia Torres-Márquez. Pet Induces IL1, TNF α , MIF and IL1Ra Through the IKK $\alpha\beta$ /NF κ B Pathway. *The Open Immunology Journal*, **2011**;4:16-21.

Bennett V, Gilligan DM. The spectrin-based membrane skeleton and micrón-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol*, **1993**;9:27-66.

Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol and Molecular Biology Reviews*, **1982**;46(3):241-280.

Betancourt-Sanchez M, Navarro-Garcia F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology*, **2009**;155(9): 2895-906.

Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukocyte Biology*, **2003**;74(4):479-485.

Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukocyte Biology*, **2007**;81:1-5.

Blach-Olszewska Z. Innate Immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Ex*, **2005**;53:245-253.

Boisen N, Ruiz-Perez F, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg*, **2009**; 80:294-301.

Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt Ka, NataroJP. New adhesion of enteeroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun*, **2008**; 76:3281-92.

Brunder W, H. Schmidt, and H. Karch. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol*, **1997**; 24(4):767–778.

Chaudhuri Roy R, Mohammed Sebahia, John L. Hobman. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain O42. *PLoS One*, **2010**; 5(1):1-19.

Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol*, **2007**; 15;275(1-2):79-97.

Debroy, C., Yealy, J., Wilson, R. A., Bhan, M. K. & Kumar, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **1995**; 63:2873–2879.

Djabali K. Cytoskeletal proteins connecting intermédiaire filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. *Histol Histopathol*, **1999**; 14(2): 501-9.

Donnelly MA, Steiner TS. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J Biol Chem*, **2002**; 277: 40456-61.

Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, Latour-Lambert P, Hormazabal JC, Nataro JP. An Incl1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun*, **2006**; 74: 2102-14.

Dutta P. R, R. Cappello, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun*, **2002**; 70:7105–13.

Edwards LA, Bajaj-Elliott M, Klein NJ, Murch SH, Phillips AD. Bacterial-Epithelial Contact Is a Key Determinant of Host Innate Immune Responses to Enteropathogenic and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS One*, **2011**; 6(10):1-15.

Eslava C, J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro and A. Cravioto. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. In *Abstracts of the 93rd General Meeting of for Microbiology, Washington, D.C. 1993*; abstr. B-105: 44.

Eslava C, Navarro- García F., Czczulin JR., Henderson I.R., Cravioto A & Nataro JP. Pet an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **1998**; 21:3155-3163.

Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun*, **2005**; 73(3):1295-303.

Guyer D. M, S. Radulovic, F. E. Jones, and H. L. Mobley. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun*, **2002**; 70:4539–46.

Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol*, **2002**; 3(4) 354-9.

Harrington SM, Strauman, M. C., Abe, C. M. & Nataro, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, **2005**; 7:1565–78.

Harrington SM, Duley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Letters*, **2006**; 254:12-8.

Harrington SM, Sheikh J, Henderson IR, Ruiz-Perez F, Cohen PS, Nataro JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun*, **2009**; 77(6):2465-73.

Henderson IR, Fernando Navarro-Garcia, Mickaël Desvaux, Rachel C. Fernandez, Dlawer Ala'Aldeen, Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story, *Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**; 68(4): 692–744.

Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, y Nataro, JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **1999**; 67:5587–96.

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2004**; 68(4): 692-744.

Hernández-Chiñas U, Tatiana G, Karlen G, Guillermo MH, Juan XC, Carlos E. Peptide sequences identified by phage display are immunodominant functional motifs of Pet and Pic serine proteases secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Peptides*, **2009**; 30:2127-35.

Hicks S, Candy, DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect Immun*, **1996**; 64(11):4751–4760.

Huang DB, Dupont, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging pathogen in children. *Semin Pediatr Infect Dis*, **2004**; 15:266–71.

Huang DB, DuPont HL, Jiang ZD, Carlin L, Okhuysen PC. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2004**; 11(3):548-51.

Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta*, **2004**; 1694:235-57.

Jiang ZD, DuPont HL, Garey K, Price M, Graham G, Okhuysen P, Dao-Tran T, LaRocco M. A common polymorphism in the interleukin 8 gene promoter is associated with *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol*, **2006**; 101(5):1112-6.

Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, DuPont HL. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol*, **2002**;40:4185-90.

Jiang ZD, Okhuysen, P. C., Guo, D. C., He, R., King, T. M., DuPont, H. L. & Milewicz, D. M. Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promotor region. *J Infect Dis*, **2003**;188:506–11.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, **2004**;2(2):123-140.

Khan M. A, Kang, J. & Steiner, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology*, **2004**;112: 651–660.

Knutton S, R K Shaw, M K Bhan, H R Smith, M M McConnell, T Cheasty, P H Williams, T J Baldwin. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infect Immun*, **1992**;60 (5): 2083–2091.

Kotlowski R, Bernstein CN, Sepeshri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, **2007**;56 669-75.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**; 388(4):621-5.

Lippolis JD. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J. Anim Sci*, **2008**;86: 53-63.

Mandell L, Moran, A.P., Cocchiarella, A., Houghton, J.M., Taylor, N., et al. Intact Gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via Toll-like receptor 2 not Toll-like receptor 4. *Infect. Immun*, **2004**; 72(11):6446-6454.

Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **2006**;74(11):6124-34.

Matthew A, Croxen y Findaly Brett. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, **2010**;8:26-38.

Medzhitov Ruslan. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *J.Cell*, **2010**;140(6):771-76.

Medzhitov Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **2008**;454(7203): 428-35.

Mellies Jay L, Fernando Navarro-Garcia, Iruka Okeke, Julie Frederickson, James P. Nataro. James B. Kaper. esp C Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes an Enterotoxin. *Infect Immun*, **2001**; 69(1):315-24.

Miller SI, Ernest RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*, **2005**;3:36-46.

Monteiro BT, Campos LC, Sircili MP, Franzolin MR, Bevilacqua LF, Nataro JP, et al. The dispersin encoding gene (aap) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2009**;65(1): 81-4.

Montero Vega M.T, De Andrés Martín, A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol Immunopathol*, **2008**;36(6):347-57.

Narayan P, Rogers CA, Bayliss KM, Rahaman NC, Panayiotou N, Angelini GD, Ascione R. On-pump coronary surgery with and without cardioplegic arrest: comparison of inflammation, myocardial, cerebral and renal injury and early and late health outcome in a single-centre randomised controlled trial. *Eur J Cardiothorac Surg*, **2011**;39(5):675-83.

Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, Levine MM y Tackett, CO. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis*, **1995**;171:465-68.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, **1998**;11:142 – 201.

Nataro, JP, Mai V, Johnson J, Blackwelder WC; Heimer R, Tirrell S, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore. *Clin Infect Dis*, **2006**;43:402-7.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)*, **2000**;97(16):8841-8.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, **2006**;6(3): 173-82.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*, **2002**; 420: 846-52.

Navarro- García F y Waldir Elias P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes*, **2010**;2 (1):13-24.

Navarro-García F, A. Canizalez-Roman, K. E. Burlingame, K. Teter, and J. E. Vidal. 2007. Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. *Infect Immun*, **2007**;75:2101-9.

Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*, **1998**;144 (2):411-24.

Navarro-García F, C. Sears, C. Eslava, A. Cravioto, and J. P. Nataro. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **1999**;67:2184–92.

Navarro-García F, Enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin. *Future Microbiol*, **2010**;5(7): 1005-13.

Navarro-García F, Sonnested M, Teter K. Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae*. *Toxins (Basel)*, **2010**;2(5):1134-47.

Netea MG, Vonk AG, van den Hoven M, et al. Differential role of IL-8 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Immunol*, **2003**;33(12): 3409-17.

Nishi J, Sheikh, J., Mizuguchi, K., Luisi, B., Burland, V., Boutin, A., Rose, D. J., Blattner, F. R. & Nataro, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *J Biol Chem*, **2003**;278:45680–89.

Noguchi N, Hiwatashi N, Hayakawa T, Toyota T. Leukocyte removal filter-passed lymphocytes produce large amounts of interleukin-4 in immunotherapy for inflammatory bowel disease: role of bystander suppression. *Ther Apher*, **1998**;2:109-114.

Oda T, Kojima Y, Akaike T, Ijiri S, Molla A, Maeda H. Inactivation of chemotactic activity of C5a by the serratial 56-kilodalton protease. *Infect Immun*, **1990**;58(5):1269-72.

Orth D, Würzner R. Complement in typical hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*, **2010**;36(6):620-4.

Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-reviews series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol*, **2007**;147(2): 199-207.

Pereira AC, Britto-Filho JD, Jose de Carvalho J, de Luna MG, Rosa AC. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*, **2008**;45:310-4.

Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, **2011**;17(11):1381-90.

Rahman MM, McFadden G. Myxoma virus lacking the pyrin-like protein M013 is sensed in human myeloid cells by both NLRP3 and multiple Toll-like receptors, which independently activate the inflammasome and NF- κ B innate response pathways. *J Virol*, **2011**;85(23):12505-17.

Rhodes JM. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, **2007**;56(5): 610-2.

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*, **2008**;3:99-126.

Ruiz-Perez F, Rezwanul Wahid, Christina S Faherty, Krishnan Kolappaswamy, Liliana Rodriguez. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)*, **2011**;108(31):12881-6.

Russo TA, Johnson JR. A proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect. Dis*, **2000**;181:1753-1754.

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2010**;21(5):331-44.

Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*, **2004**;4(12): 953-64.

Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin B M, Levine M M, Guandalini S, and Guerry P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)*, **1993**;90:3093-97.

Segal BH, Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine*, **2000**; 79(3):170-200.

Serhan CN, and Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol*, **2005**;6:1191-97.

Serhan, CN, Brain Sue D, Buckley Christopher D., et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB Journal*, **2007**;21:325-332.

Sheikh J, Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., Le Bouguenec, C., Gounon, P., Phillips, A. & Nataro, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, **2002**;110:1329–1337.

Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M, Heesemann J. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp med*, **2002**;196(8):1017-24.

Si-Tahar M, Touqui L. Chignard M. Innate immunity and inflammation-two facets of the same anti-infectious reaction. *Clin Exp Immunol*, **2009**;156(2):194-8.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*, **2003**;4:1247-53.

Stein M, Kenny, B., Stein, M.A., Finlay, B.B. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J. Bacteriol*, **1996**;178(22):6546-54.

Steiner TS, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*, **1998**;177:88-96.

Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*, **2000**;105:1769-77.

Suzart S, Guth BE, Pedroso MZ, Okafor UM, Gomes TA. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. *FEMS Microbiol Lett*, **2001**;201:163-8.

Szabady RL, Lokuta MA, Walters KB, Huttenlocher A, Welch RA. Modulation of Neutrophil Function by a Secreted Mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS Pathog*, **2009**; 5(2): 1-13.

Tsang KY, Cheung MC, Chan D, Cheah KS. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res*, **2010**;339(1):93-110.

Tzipori, S., J Montanaro, R. M. Robins-Browne, P Vial, R Gibson, M M Levine. Studies with Enteroaggregative *Escherichia coli* in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model. *Infect Immun*, **1992**;60:5302-06.

Velarde JJ, Varney KM, Inman KG, Farfan M, Dudley E, Fletcher J, et al. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **2007**;66:1123-35.

Vidal JE, Navarro-García F. EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell Microbiol*, **2008**;10(10):1975-86.

Villaseca JM, Navarro-García F, Mendoza-Hernández G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun*, **2000**; 68 (10):5920-7.

Voermans C, Rood PM, Hordijk PL, Gerritsen WR, van der Schoot CE. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, **2000**;18(6):435-43.

Wang JS, Lin HY, Cheng ML, Wong MK. Chronic intermittent hypoxia modulates eosinophil- and neutrophil-platelet aggregation and inflammatory cytokine secretion caused by strenuous exercise in men. *J Appl Physiol*, **2007**;103(1):305-14.

Weintraub Andrej. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology virulence and detection. *J Medical Microbiol*, **2007**;56:4-8.

Yen YT, Kostakioti M, Henderson IR, Stathopoulos C. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol*, **2008**;16:370-9.

14 APENDICE

Medios de cultivo bacterianos

☉ Caldo luria

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1000 ml
Ampicilina	100 µg/ml

Disolver los reactivos, esterilizar en autoclave 121°C/30 min y adicionar el antibiótico (ampicilina) a una concentración final de 100 µg/ml.

☉ Agar luria

Agar	15 g
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	1000 ml
Ampicilina	100 µg/ml

Calentar hasta disolver los reactivos, esterilizar en autoclave 121°C/30 min y adicionar el antibiótico (ampicilina) a una concentración final de 100 µg/ml y vaciar en cajas petri.

Medios de cultivo celular

☉ RPMI -1640 + SFB 10% + PSH 25% (1 ml).

RPMI-1640	650 µl
PSH	250 µl
SFB	100 µl

Realizar la preparación en la campana bajo condiciones de esterilidad y en un tubo eppendorf.

☉ RPMI + SFB 10% (50 ml).

RPMI-1640	45 ml
SFB	5 ml

Realizar la preparación en la campana, bajo condiciones de esterilidad, en un tubo Corning, estéril de 50 ml.

Soluciones

☉ Buffer de gel separador pH=8.8

Tris-base	90.825 g
Agua destilada	500 ml

☉ Buffer de gel apilador (stacking) pH=6.8

Tris-HCl	19.7 g
Agua destilada	250 ml

☉ Gel separador (Tris/Glicina/SDS/Poliacrilamida 8%)

Agua destilada	4.6 ml
Acrilamida 30%	2.7 ml
1.5 M Tris (pH=8.8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	6 µl

☉ Gel concentrador

Agua destilada	680 µl
Acrilamida 30%	170 µl
1.5 M Tris (pH=8.8)	130 µl
10% SDS	10 µl
10% APS	10 µl
TEMED	1 µl

☉ **Solución de tinción azul de coomasie 0.2%**

Azul de Coomassie	2 gr
Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Agua destilada	400 ml

Agitar durante 30 min, filtrar en papel Whatman No.1 y conservar en un frasco oscuro.

☉ **Solución desteñidora (Tinción con azul de coomasie)**

Metanol	25 ml
Ácido acético	45 ml
Agua destilada	430 ml

☉ **Solución acrilamida 30% (m/v)**

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua destilada	100 ml

Disolver, filtrar con papel filtro #1 y conservar en botella ámbar de vidrio a 4 °C.

☉ **Solución Reguladora TRIS pH=8.8**

Tris (hidroximetil)metilamina	45.5 g
Dodecilsulfato de sodio	1.0 g
Agua destilada	250 ml

☉ **Solución Reguladora TRIS pH=6.8**

Tris (hidroximetil)metilamina	15.1 g
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	1.0 g
Agua destilada	250 ml

☉ **Solución reguladora de corrimiento pH=8.3**

Glicina	14.4 g
Tris (hidroximetil)metilamina	3.0 g
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

☉ **Persulfato de amonio (APS 10%)**

Persulfato de amonio	100 mg
Agua destilada	1 ml

📌 **Rojo de Ponceau 0.01%**

Rojo de Ponceau	100 mg
Ácido acético	1.0 ml
Agua destilada	100 ml

Se decolora con agua destilada

📌 **PBS + 0.1%Tween-20**

PBS	250 ml
Twen-20	250 µl

Usando la técnica de pipeteo reverso tomar 250 µl de Tween-20 y mezclarlo perfectamente con los 500 ml de PBS en un recipiente de vidrio.

📌 **Solución fijadora (Tinción de Plata)**

Agua destilada	17.7 ml
Metanol 99%	26.0 ml
Ácido acético 99%	6.3 ml
Formaldehido 37%	25 ml

Mezclar perfectamente los reactivos.

📌 **Solución de lavado (Tinción de Plata)**

Agua destilada	25.0 ml
Metanol 99%	25.0 ml

Mezclar perfectamente los reactivos.

📌 **Solución de oxidación (Tinción de Plata)**

Tiosulfato de sodio	10.0 mg
Agua destilada	50.0 ml

Mezclar perfectamente los reactivos.

☉ **Solución de impregnación (Tinción de Plata)**

Nitrato de Plata	0.1 g
Formaldehido	38 µl
Agua destilada	50.0 ml

Mezclar todos los reactivos y almacenar protegida de la luz.

☉ **Solución reveladora (Tinción de Plata)**

Agua destilada	50.0 ml
Carbonato de sodio	0.2 mg
Tiosulfato de sodio	6.3 ml
Formaldehido 37%	25 µl

Mezclar perfectamente los reactivos.

☉ **Solución de paro (Tinción de Plata)**

Metanol 99%	800 µl
Ácido acético 99%	13 ml
Formaldehido	50 µl
Agua destilada	36 ml

Mezclar perfectamente los reactivos.

☉ **Solución Salina Isotónica SSI 0.9% (1 L) pH= 7.2**

NaCl	9 g
------	-----

Mezclar con 500 ml de agua destilada y ajustar a pH=7.2 con NaOH 1M ó HCl 1M, después aforar a 1000 ml. Esterilizar en autoclave 121°C/20 min.

☉ **Discos de vidrio preparados para cultivo de tejidos.**

Los discos se cortan con una plantilla a un diámetro de 9 mm, se colocan en una caja petri cubiertos con etanol al 70% durante 3 días en agitación constante, se lavan los discos con agua destilada 7 veces, y un último lavado de 15 min en agitación. Posteriormente se cubren con HCl 1M 30 min con agitación constante, se enjuagan nuevamente con agua destilada y se dejan secar al aire.

Ya secos, se acomodan dentro de una caja petri separados por papel filtro y se esterilizan en autoclave.

📌 **Solución Hank's pH=7.2 1 L**

Dextrosa (D-glucosa anhidra en polvo)	1.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.4 g
Cloruro de calcio	0.14 g
Cloruro de magnesio	0.10 g
Sulfato de magnesio	0.10 g
Bicarbonato de sodio	0.35 g
Fosfato de potasio monobásico	0.06 g
Fosfato de sodio dibásico	0.06 g

Pesar todos los reactivos en balanza analítica o granataria según sea el caso, y mezclar en el **orden indicado** con 500 ml de agua destilada; ajustando el pH a 7.2 con NaOH 1M ó HCl 1M, después aforar a 1000 ml. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.

📌 **Zymosan**

Zymosan	200 mg
Agua destilada	20 ml

Mezclar los reactivos y calentar a baño maría 30 min, centrifugar a 5000 rpm/10 min. Lavar dos veces con SSI. Hacer alícuotas de 1 ml y mantener en refrigeración a -20°C.

📌 **Opsonización de Zymosan**

Zymosan	1 ml
Suero AB	200 µl
Sol. Hank's	800 µl

Al momento de ser utilizado el zymosan, descongelarlo a temperatura ambiente, centrifugar a 5500 rpm por 5 min, eliminar el sobrenadante y adicionar 200 µl de suero mas 800 µl de solución de Hank's. Incubar 30 min/37°C, centrifugar a 5500 rpm por 5 min (conservar el sobrenadante), lavar el botón 2 veces y resuspender en 1000 µl de solución de Hank's.

📌 **ZAS**

El sobrenadante que se conservo de la opsonización de Zymosan, se inactiva a 56 °C durante 30 min en baño maría.

☉ **Solución EtOH 50% 50 ml**

Etanol absoluto	25 ml
Agua destilada	25 ml

Mezclar los dos reactivos en un tubo cónico de 50 ml.

☉ **Hematoxilina de Harris (HYCEL)**

La hematoxilina es un colorante empleado para la tinción del núcleo celular, para mejorar la calidad de la tinción es necesario filtrar antes de su uso y adicionar unas gotas de ácido acético.

☉ **Solución HCl 0.5% 100ml**

HCl	13.75 ml
Agua destilada	86.28 ml

Mezclar los dos reactivos en un frasco de vidrio con capacidad de 150 ml.

☉ **Colorante cromotopo 2R**

Colorante cronotopo	1.0 g
Agua destilada	50 ml

Mezclar hasta disolver el colorante.

☉ **Solución EtOH 95% 50 ml**

Etanol absoluto	47.5 ml
Agua destilada	2.5 ml

Mezclar los dos reactivos en un tubo cónico de 50 ml.

☉ **Solución 1:1 Xilol-Isopropanol 50 ml**

Xilol	25 ml
Isopropanol	25 ml

Mezclar los dos reactivos en un tubo cónico de 50 ml.

☉ **Aceite bálsamo de canada (HYCEL)**

Al ser un reactivo comercial, el aceite bálsamo de canada puede estar demasiado espeso o durante su uso secarse un poco, estas situaciones las podemos revertir, empleando un poco de xilol absoluto.

☉ **Buffer de carbonatos 0.1 M pH=9.5**

Bicarbonato de sodio	0.713 g
Carbonato de sodio	0.159 g
Agua destilada	100 ml

☉ **PBS + 0.05%Tween-20**

PBS	500 ml
Twen-20	250 µl

Usando la técnica de pipeteo reverso, tomar 250 µl de Tween-20 y mezclarlo perfectamente con los 500 ml de PBS en un recipiente de vidrio.

☉ **Solución reguladora de bloqueo (PBS+10% SFB)**

PBS	30 ml
SFB	3 ml

☉ **Ácido sulfúrico 2.0 N**

H ₂ SO ₄	10.65 ml
Agua destilada	100 ml

☉ **Solución buffer de fosfatos PBS pH=7.0**

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio dibasico anhidro	1.16 g
Fosfato de potasio monobásico	200 mg
Cloruro de potasio	200 mg
Agua destilada	1000 ml

☉ **Buffer de lavado 1X.**

Buffer de lavado 10X	20 ml
Agua milli-Q	180 ml

El buffer se almacena a 4°C durante 7 días máximo.

☉ **Buffer de permeabilización**

Buffer de lavado 10X	2 ml
Agua milli-Q	18 ml

El buffer se almacena a 4°C durante 7 días máximo.

📌 **Buffer de lavado II 1X.**

Buffer de lavado 10X	20 ml
Agua milli-Q	180 ml

El buffer se almacena a 4°C durante 7 días máximo.

📌 **Solución de fijación.**

Parafolmaldehido 16%	3.0 ml
Buffer de lavado 1X	9.0 ml

Preparar y calentar a 37 ° C antes de su uso.

📌 **Anticuerpo primario**

Anticuerpo primario NF-κB	24 μl
Buffer de lavado 1X	6.0 ml

📌 **Anticuerpo secundario**

Reactivo de Hoechst	3.0 μl
DyLight 488	12.0 μl
Buffer de lavado 1X	6.0 ml

Preparar la solución antes de su uso.

*“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano”*