



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

Análisis de la expresión de APRIL y TGF- β en el intestino de los ratones C57BL/6 inoculados con *Escherichia coli* enteroagregativa o *Citrobacter rodentium*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JAIR GUERRERO BAEZ



México, CDMX, SEPTIEMBRE 2017



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: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ
VOCAL: ENRIQUE DE LEÓN LARA
SECRETARIO: MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA
1er. SUPLENTE: LUIS ANGEL FLORES MEJÍA
2° SUPLENTE: GABRIELA LÓPEZ HERRERA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV-IPN).

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO:

CATALINA LÓPEZ SAUCEDO

SUSTENTANTE:

JAIR GUERRERO BAEZ

Resumen

La mucosa intestinal es la superficie de mayor contacto antigénico del organismo, así como el sitio donde los agentes patógenos penetran más frecuentemente al organismo. En el mantenimiento de la homeostasis del intestino participan diversas citocinas, entre ellas, las citocinas APRIL y TGF- β , por sus siglas en inglés “A Proliferation Inducing Ligand” y “Transforming Growth Factor-Beta”. APRIL y TGF- β son dos proteínas multifuncionales que se han asociado con diversos procesos inmunológicos en el intestino.

Los patogrupos de *Escherichia coli* son la principal causa de diarrea bacteriana en niños menores de 5 años en México y en el mundo, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) se encuentran entre los patogrupos más prevalentes asociados a diarrea, además EAEC es la segunda causa de la diarrea del viajero. En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado modelos murinos de infección con EAEC y de *Citrobacter rodentium*. *C. rodentium* es uno de los principales agentes de diarrea en ratones neonatos y contiene una isla de patogenicidad denominada LEE (“Locus of enterocyte effacement”) similar a la de EPEC, por lo cual esta bacteria se ha utilizado como un modelo subrogado de este patogrupo para su estudio en modelos animales. Tanto EAEC como *C. rodentium* son patógenos que ingresan al organismo por vía oral y ambos microorganismos son capaces de colonizar el intestino. Hasta el momento se desconoce si las citocinas APRIL y TGF- β son inducidas ante la infección oral por EAEC y *C. rodentium*. Por lo que se inocularon ratones C57BL/6 oralmente. Un grupo con EAEC, otro grupo con *C. rodentium* y un grupo control con solución salina. A los cuatro días se sacrificaron los ratones y se identificó la presencia de APRIL y TGF- β en el íleon de los ratones infectados mediante técnicas inmunohistoquímicas, en contraste con los ratones control en los que no se detectaron las citocinas.

Se observó e identificó la expresión de APRIL y TGF- β y se identificó las zonas de expresión de las citocinas estudiadas en el íleon de ratones que recibieron un estímulo bacteriano (EAEC o *C. rodentium*) encontrando una distribución similar a lo largo del tejido, pero observando diferencia en la intensidad de la expresión, en cambio no se observó expresión de estas citocinas en sus respectivos controles negativos (solución salina), los cuales fueron evaluados al mismo tiempo con los cortes de los ratones inoculados con bacterias. Esto nos permite suponer que la expresión de APRIL y TGF- β y la detección de las mismas en diversas zonas del íleon fueron inducidas por la estimulación bacteriana de EAEC o *C.rodentium*.

INDICE

Introducción	1-22
Sistema Inmune.....	1-2
Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT).....	2-5
Citocinas en respuesta a patógenos en el intestino.....	5-6
TLR (<i>Toll-like receptors</i>).....	6-8
Citocina inductora de proliferación (APRIL) y Factor activador de células B (BAFF).....	8-9
Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β).....	9-12
Marcador de macrófagos F4/80.....	12-13
Participación de las citocinas implicadas en la homeostasis intestinal	13-
-Inmunoglobulina A (IgA).....	13-14
-Células Dendríticas (DC).....	14
-Los Linfocitos B (LB).....	14-15
-Lamina Propia (LP).....	15
-Células Epiteliales.....	15-16
<i>Escherichia coli</i>	16-20
- <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	17-18
- Importancia de EAEC.....	18-19
-Patogenicidad de EAEC.....	19-20
<i>Citrobacter rodentium</i>	20-22
-Importancia de <i>C. rodentium</i>	20-21
-Patogénesis.....	21-22
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo General	24
Objetivos particulares	24
Materiales y Métodos	25-30
A) Cepa murina.....	25
-Ratones C57BL/6.....	25
-Determinación de enterobacterias en las heces de los ratones.....	25-26
B) Cepas bacterianas.....	26-27
-Preparación del inóculo bacteriano.....	26
-Inoculación de los ratones.....	26-27
C) Inclusión de íleon de ratones machos C57BL/6.....	27
D) Cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6.....	27
E) Anti-cuerpos (Ac) utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica.....	28
F) Inmunohistoquímica.....	28-29

G) Programa ImageJ	29
H) Estandarización de un ensayo de inmunohistoquímica para la detección de citocinas (APRIL o TGF- β) en cortes de 5 μ m de íleon de ratones incluidos en parafina.....	29-30
Resultados	31-60
1.- Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina APRIL <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.	31-33
2.- Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina TGF-β <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.....	34-36
3.- Evaluar y comparar la expresión de APRIL <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> en cortes de íleon de ratones infectados con <i>C. rodentium</i> o con EAEC y controles (Solución Salina).....	37-50
4.-Evaluar y comparar la expresión de TGF-β <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> en cortes de íleon de ratones infectados con <i>C. rodentium</i> o con EAEC y controles (Solución Salina).....	51-60
Discusión	61-66
Conclusiones	67
ANEXOS	68-70
Anexo 1. Protocolos de inmunohistoquímicas utilizados para obtener las condiciones óptimas presentadas en este trabajo.....	68-69
Anexo 2. Reactivos.....	70
Referencias	71-73

Abreviaturas

AA: Adherencia agregativa
AAF: Fimbria de Adherencia Agregada
Ac: Anti-cuerpo
A/E: Adherencia y Esfacelamiento
AggR: Aggregative Regulator
ALK: Activin receptor like kinases
APRIL: A Proliferation Inducing Ligand
BAFF: B cell-activation factor of the TNF family
BAFF-R: Transforming Growth Factor-Beta Receptor
BCMA: B-cell maturation antigen
CAML: Calcium modulating Cyclophilin Ligando
CSR: Cambio de Isotipo
DC: Celulas Dendriticas
DV: Diarrea del viajero
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogena
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica
FAE: Follicle associated epithelium
GALT: Tejido Linfoide Asociado al intestino
GI: Tracto Gastrointestinal
IEL: Intraepithelial Lymphocytes
Ig: Inmunoglobulina
iNOS: Nitric oxide synthase
LAP: Latency Associated Peptide
LB: Linfocito B
LEE: Locus of enterocyte effacement
LLC: Large Latent Complex
LP: Lamina propia
LPL: Lamina Propia Lymphocytes
LT: Linfocito T
LTGF- β : Latent Transforming Growth Factor-Beta
MHC: Mayor Histocompatibility Complex
NK: Natural Killer
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patogenos
PMN: Polimorfo nucleares
PRR: Receptores de reconocimiento de Patrones
SED: Subepithelial Dome
SHET: Enterotoxin Of Shigella
SMAD: unión de los acrónimos MAD (mothers againts decantaplegic) y de la proteína SMA de *Caenorabditis elegans*
SST3: Sistema de secreción tipo 3
TACI: Transmembrane activator and CAML interactor
TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta
Th: Linfocitos T Helper
TLR: Toll-Like receptors
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
TMCH: Hiperplasia del colon transmisible murina
TSLP: Thymic Stromal Lymphopoinetin
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Introducción

Sistema Inmune

El sistema inmune de los mamíferos está conformado por el sistema inmune adaptativo y el sistema inmune innato. El sistema inmune innato es capaz de dar respuestas protectoras rápidas para hacer frente a los patógenos invasores. El sistema inmune innato incluye células dendríticas (DC), macrófagos, granulocitos y células asesinas naturales (NK), las cuales participan en respuestas rápidas pero inespecíficas al reconocer estructuras microbianas a través de receptores de reconocimiento de patrones (*PRR*, por sus siglas en inglés), los cuales incluyen los receptores Toll-like (*TLR*, por sus siglas en inglés). Por otro lado, el sistema inmune adaptativo incluye linfocitos T y B, los cuales son capaces de mediar respuestas específicas, pero temporalmente más lentas. Estos linfocitos son capaces de reconocer epítomos a través de receptores altamente diversos. En los linfocitos B, la interacción de estos receptores con el epítomo, induce la producción de anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), los cuales son capaces de reconocer antígenos a través de dominios de unión que pueden ser de baja o alta afinidad. (Pugga et al. 2014)

Los animales vertebrados se encuentran en contacto con el medio que los rodea a través de los epitelios presentes en la piel, el epitelio gastrointestinal, el respiratorio y el genitourinario. Estos epitelios llevan a cabo funciones de gran importancia como: la protección, la vigilancia y el mantenimiento de la homeostasis del organismo, evitando la penetración de los antígenos con los que estamos en contacto diariamente. La mucosa intestinal comprende la superficie de contacto antigénico más amplia del organismo. En el humano, la mucosa digestiva del organismo comprende una superficie aproximadamente de 400 m², 200 veces mayor que la de la piel. (Vega 2007)

El sistema inmune intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmune. Recibe diariamente una carga antigénica enorme y es capaz de distinguir entre patógenos, bacterias comensales y antígenos procedentes de los alimentos. El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el acceso

desustancias nocivas o de microorganismos patógenos al organismo. Esta barrera intestinal está integrada por diversos elementos como el epitelio intestinal, enzimas digestivas y las bacterias que constituyen la microbiota intestinal. Además posee también otra barrera constituida por el tejido linfoide asociado al intestino o GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*). (Vega 2007)

Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT)

El GALT se divide en dos grupos:

a) El GALT organizado, en donde se lleva a cabo la inducción de la respuesta inmune intestinal, el cual está constituido por los folículos linfoides asociados o placas de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y los folículos linfoides aislados. (Kanamori *et. al.*, 1996) (Figura 1)

Las placas de Peyer, están formadas por agregados linfoides macroscópicos situados en la cara anti mesentérica de la mucosa intestinal. El tejido linfoide está separado del lumen intestinal por una mono capa de células (FAE, *follicle-associated epithelium*) constituida por células epiteliales columnares, células M, leucocitos intraepiteliales (IEL, *intraepithelial lymphocytes*) y algunas células secretoras de moco. Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos, carecen de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de las micro vellosidades características del resto de los enterocitos que están recubiertos por el glicocalix. Por debajo del FAE se encuentra una región difusa denominada cúpula o domo subepitelial (SED, *subepithelial dome*), integrada por DC y algunos macrófagos. (Puig *et. al.* 2008) Inmersos en la placa de Peyer se encuentran los folículos linfoides aislados, los cuales están constituidos por linfocitos B, precursores de células plasmáticas productoras de IgA y en los centros germinales de estos folículos es donde se generan linfocitos B de memoria. (Debard *et. al.* 2001)

Los ganglios linfáticos mesentéricos se dividen estructuralmente en tres regiones las cuales contienen una composición y proporción celular diferente: corteza, paracorteza y médula. La corteza contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B y DC. La paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de

linfocitos T y DC. La médula, que es la región más interna del ganglio, está integrada por células plasmáticas, linfocitos T y B. (Abbas and Lichtman, 2004)

b) El GALT difuso, es el sitio efector de la respuesta inmune intestinal, integrado por poblaciones de linfocitos dispersos en la lámina propia intestinal (LPL, *lamina propria lymphocytes*) y los linfocitos que se encuentran entre las células epiteliales (IEL, *intraepithelial lymphocytes*). (Ramiro-Puig *et al.* 2008) (Figura 1)

La lámina propia (LP), comprendida entre el epitelio y la mucosa muscular, contiene células plasmáticas maduras productoras de inmunoglobulinas, linfocitos T (principalmente Th (linfocitos T helper o cooperadores) y otros tipos celulares como macrófagos, DC y mastocitos. Estas poblaciones celulares se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación. (Ramiro-Puig *et al.* 2008)

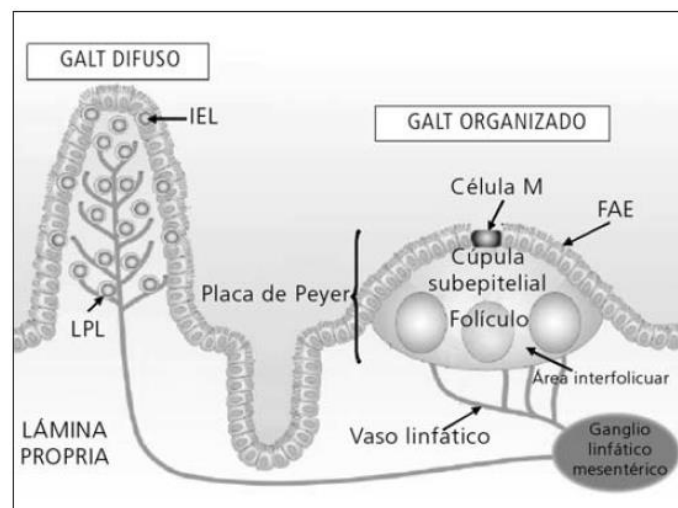


Figura 1. Representación de los elementos que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT): GALT organizado o inductor de la respuesta inmune y GALT difuso o efector. (Ramiro-Puig *et al.* 2008)

En la LP del intestino las células del sistema inmune están organizados en nichos particulares, lo que indica que la estructura está directamente relacionada con la función en la mucosa intestinal, existen cuatro compartimientos principales en la mucosa intestinal: el epitelio, la LP de las vellosidades, LP de las criptas y la submucosa. En cada uno de ellos se alojan varios tipos de células de manera característica. En el epitelio es posible observar una gran cantidad de linfocitos, llamados por esta razón intraepiteliales (IEL); la mayoría tiene fenotipo CD2+CD4-CD8-, con una importante heterogeneidad morfológica y posiblemente también

funcional. (Vega-López *et al* 2001) La mayoría de esas células está conformada por linfocitos NK citotóxicos, los cuales participan en la defensa contra células infectadas por agentes patógenos intracelulares o como células centinela, son células productoras de citocinas tempranas con perfil Th1 (IL-1, IL-2, IL6, IL-7) que modulan la respuesta inmune citotóxica local. En la zona de la membrana basal del epitelio del intestino delgado se encuentran tanto las DC, gran expresión de moléculas MHC-II (Complejo principal de histocompatibilidad II) y linfocitos T CD8+ (citotóxicos), que también podrían participar en la respuesta inmune contra células infectadas intracelularmente. (Vega 2007) En la LP de las vellosidades se encuentran principalmente los linfocitos T CD4+ (cooperadores), que al activarse con el antígeno presentado por las DC, secretan citocinas con perfil Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) las cuales participan en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, los cuales en el intestino producen principalmente anticuerpos de isotipo IgA. (Baron *et al* 2009) En la LP también se encuentran numerosos mastocitos y eosinófilos; los cuales al contacto con el antígeno, son capaces de liberar citocinas con perfil Th2, además de participar en el proceso inflamatorio. (Vega 2007) (Figura 2)

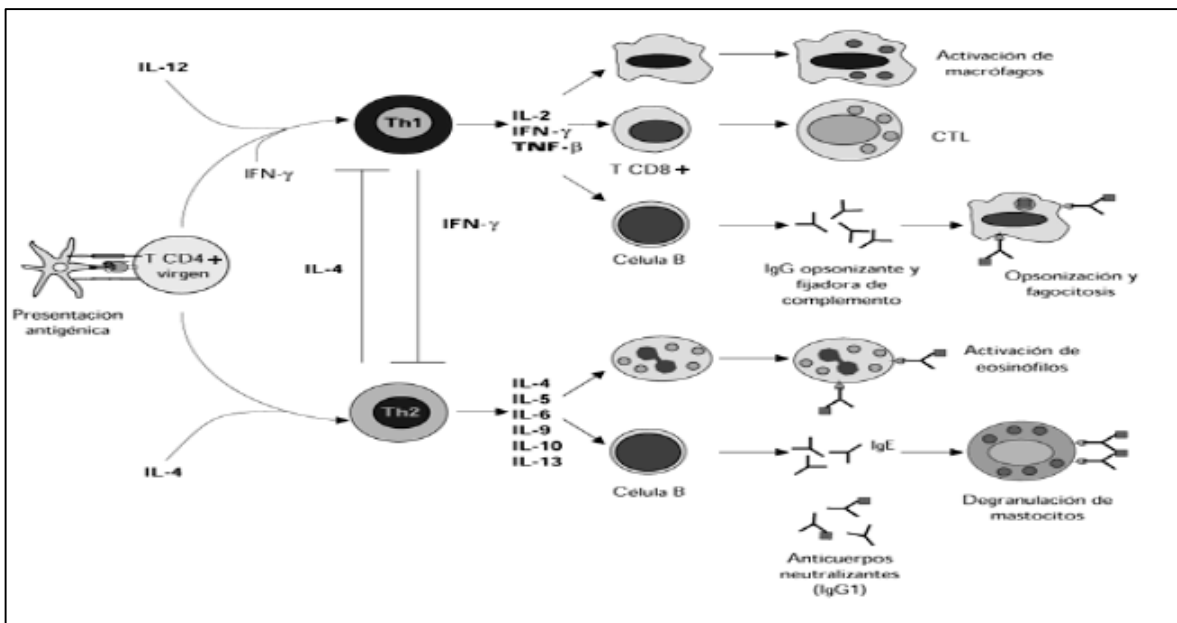


Figura 2. Funciones efectoras de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (Th1 y Th2). (Abbas *et. al.* 2004)

Las vellosidades constituyen la zona de absorción del intestino, así que la presencia de los elementos del sistema inmune que reconocen a los antígenos (células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos cooperadores (Th) y

Las citocinas son una de las primeras respuestas que se inducen ante una infección microbiana inician la respuesta inflamatoria, promueven la quimiotaxis, la adhesión, así como la activación de poblaciones celulares. Ejercen sus efectos en forma autocrina y paracrina, y en menor proporción endocrina. Las principales fuentes de citocinas son los linfocitos T y B, las DC, los macrófagos, los neutrófilos, linfocitos NK, células endoteliales y algunas células epiteliales. Las citocinas producidas activan las células por su reconocimiento a través de los receptores presentes en la superficie celular, los cuales son expresados por muchos tipos de células. Por lo tanto la secreción de una citocina puede ser inducida, potenciada o inhibida por otra citocina que a su vez puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores por lo tanto la citocinas definen la magnitud y la naturaleza de la respuesta inmune específica. (Gayo *et. al.* 2000)

TLR (Toll-like receptors).

La inmunidad innata se considera de gran importancia para la eliminación de los microorganismos invasores del tracto gastrointestinal (GI) así como para evitar la diseminación sistémica. (Chaudhary *et. al.* 1998)

Los TLR son receptores transmembranales que juegan un papel central en la iniciación de la respuesta inmune innata, ya que reconocen y se unen a un amplio espectro de patrones moleculares asociados a patógenos (“PAMP”, por sus siglas en inglés), los cuales tienen funciones importantes para la supervivencia del patógeno y la subsecuente respuesta inmune adaptativa ante patógenos microbianos. (Chaudhary *et. al.* 1998) La activación de los TLR permite la expresión de numerosos genes que participan en la defensa del hospedero, incluyendo genes de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moléculas presentadoras de antígeno y coestimuladores. (Furrie *et. al.* 2005) Hasta el momento se han reportado varios TLR que reconocen una gran variedad de ligandos (Figura 4) y los cuales se han identificado en diversas células como: Células epiteliales intestinales, monocitos, linfocitos B y T, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células NK, DC y macrófagos. (Chaudhary *et. al.* 1998)

Se ha reportado que el reconocimiento de las estructuras bacterianas por medio de los TLR es importante para que las citocinas sean expresadas por las células presentes en el intestino. (Macpherson *et. al.* 2007; Pugga *et. al.* 2014) Por lo tanto los TLR juegan un papel importante en la respuesta inmune, ya que son capaces de identificar estructuras bacterianas como: LPS, peptidoglicano, flagelina, lipoproteínas, etc. (Hayashi *et. al.* 2001)

El intestino está recubierto por una capa de células epiteliales, las cuales participan como una barrera protectora y pueden expresar TLR. Las superficies apicales de las células epiteliales están en un continuo contacto con bacterias. Estas células epiteliales no inducen una respuesta inflamatoria ante bacterias comensales, pero son capaces de producir una respuesta inflamatoria en presencia de bacterias patógenas. Esto se debe por la detección de las regiones estructurales de las bacterias mediante la ubicación de los TLR, por ejemplo el TLR5 (Flagelina) que se expresa solo del lado basolateral de las células epiteliales intestinales, mientras que el TLR4 (LPS) se puede expresar en niveles bajos en las células epiteliales del intestino. (Abreu *et al.* 2003)

Recientemente se ha mostrado el papel de TLR4, en el reconocimiento de bacterias comensales, en el reclutamiento de linfocitos B y el CSR IgA, esto fue descrito utilizando animales transgénicos que expresaban constitutivamente sobre células epiteliales a TLR4. (Wells *et. al.* 2011) Por otro lado los TLR pueden participar en respuestas inflamatorias. Como ya se mencionó las células epiteliales secretan APRIL por la señalización de TLR así como por el TSLP (por sus siglas en inglés thymic stromal lymphopoietin) que estimula la producción de APRIL por DC. (Wells *et. al.* 2011)

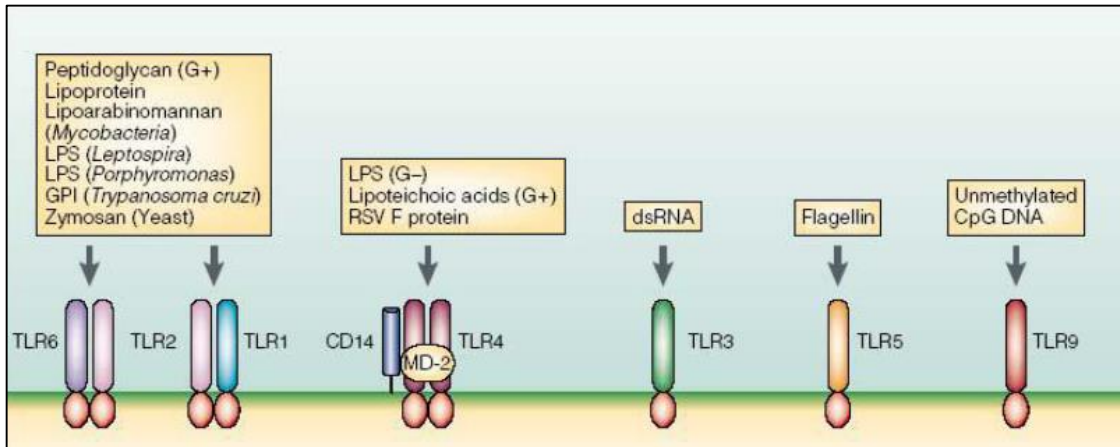


Figura 4. Ligandos específicos de los TLR. Los receptores tipo Toll (TLR) reconocen una gran variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). (Medzhitov, et. al. 1998)

Citocina inductora de proliferación (APRIL) y factor activador de células B (BAFF).

Como se mencionó anteriormente el reconocimiento de los PAMP por medio de los TLR induce la expresión de citocinas entre ellas se encuentra la citocina APRIL (“A Proliferation-Inducing Ligand”) y BAFF (“B cell-activation factor of the TNF family”). (Macpherson and McCoy 2007) Estas moléculas pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y están implicadas en diversos procesos inmunológicos como la supervivencia de las células B periféricas, en la producción de anticuerpos (Ac) independientes de CD40L, cooperan con los ligandos de TLR para inducir cambio de isotipo (CSR) en linfocitos B de mucosa del intestino y se ha demostrado que APRIL y BAFF pueden inducir la expresión de la molécula citidina desaminasa (AID), indispensable para inducir el cambio de isotipo (CSR). BAFF es producido por monocitos y DC, mientras que APRIL es producido por monocitos, macrófagos, DC y células T activadas. (Romero et. al. 2009) (Figura 5).

BAFF en células B tienen tres receptores BCMA (“B-cell maturation antigen”), BAFF-R (“B cell-activation factor of the TNF family Receptor”) y TACI (“transmembrane activator and CAML (Calcium-Modulating Cyclophilin Ligando) interactor”), mientras que APRIL solo puede ser reconocido por BCMA y TACI.

BAFF puede ser expresado en la superficie celular o ser secretado, mientras que APRIL sólo es secretado. (Romero et. al. 2009)

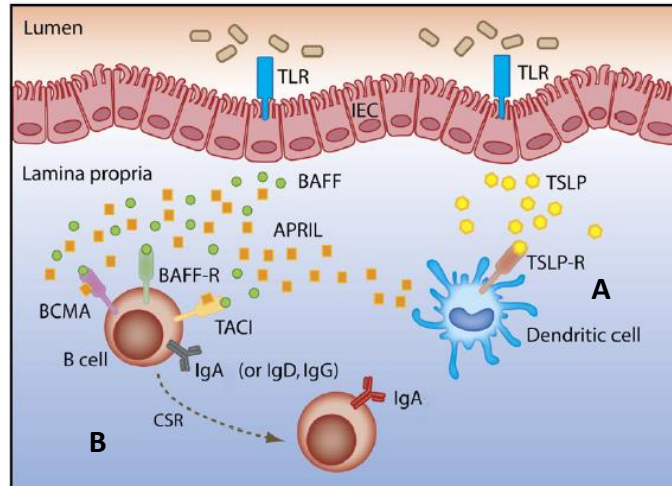


Figura 5. Representación de la detección de bacterias en el lumen por los TLR localizados en las IEC (*Intestinal epithelial cells*). Al unirse los PAMP a los TLR pueden inducir dos eventos **A**) La secreción de APRIL y BAFF por las IEC, las cuales inducen directamente a las células B a un cambio de isotipo (CSR) a IgA al interactuar con sus respectivos receptores. **B**) IEC puede inducir a las células B a un cambio de isotipo a través de la secreción de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). La TSLP es una citocina perteneciente a la familia de la IL-7 e induce la producción de BAFF y APRIL en las DC que hayan sido estimuladas a su vez a través de los TLR. (Macpherson *et. al.* 2007)

Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β)

El TGF- β es una superfamilia de proteínas, que regulan una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación, migración, apoptosis y homeostasis celular. (Sporn 1999)

Hasta el momento se han descrito en diferentes organismos cinco isoformas del TGF- β . También se ha descrito, un heterodímero del TGF- β (TGF- β 1.2) en plaquetas porcinas. Particularmente en mamífero se han descrito tres isoformas del TGF- β (β 1, β 2 y β 3) que poseen una identidad del 80%, las otras dos isoformas 4 y 5 se han identificado en aves y anfibios, respectivamente. Entre las citocinas que conforman a la familia del TGF- β , el TGF- β 1 es la isoforma prototipo utilizada en los estudios de activación a partir de la inducción a través de su ligando. (Heldin and Moustakas 2012) TGF- β se secreta como una molécula precursora, conocida como LTGF- β (*Latent TGF- β* , por sus siglas en inglés), que está conformado por dos péptidos asociados, denominados LAP (*Latency Associated Peptide* por sus siglas en inglés) y un dímero maduro de TGF- β 1. El LTGF- β se asocia con una proteína de unión llamada LTBP, que le confiere la capacidad para unirse a la matriz extracelular (ECM), formando así el LLC (*Large latent complex*,

por sus siglas en inglés). (Javelaud and Mauviel, 2004) (Figura 6). Finalmente para generar el TGF- β activo, primero se escinde el LLC de la ECM, mediante actividad de la citocinaplasmina, después se escinde el dominio LAP por medio la de diferentes proteasas, para finalmente dejar libre y activo a TGF- β 1, el cual es capaz de unirse a sus receptores. (Biernacka and Dobaczewski, 2001)

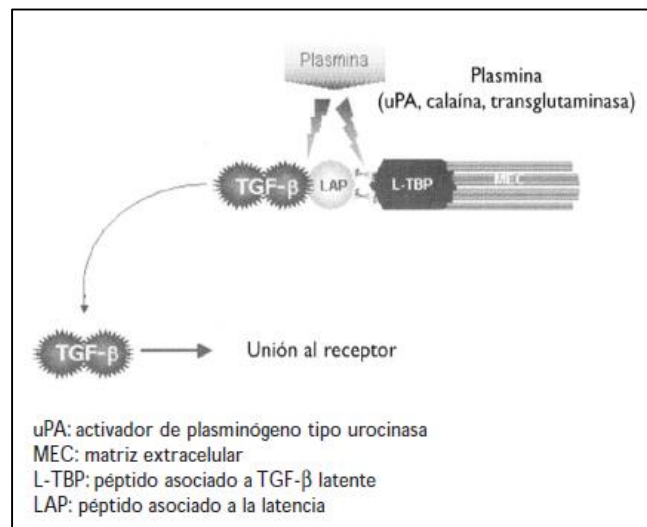


Figura 6. Estructura y activación del TGF- β . Es sintetizado como una molécula inactiva, unida a una secuencia de aminoácidos, conocida como Péptido Asociado a la Latencia (LAP, *Latency Associated Peptide*), que está anclada a la matriz extracelular mediante una proteína denominada proteína de unión al TGF- β latente (L-TBP), que tiene que ser proteolíticamente cortada para que el TGF- β pueda ser secretado. (Galvez-Gastelum et. al. 2004)

Receptores y señalización del TGF- β

La señalización intracelular producida por la familia del TGF- β inicia cuando estas se unen a receptores específicos que se encuentran en la superficie celular, formando complejos con sus receptores de tipo I y II. Uniéndose directamente al receptor tipo II. (Figura 7)

Se han descrito en mamíferos 5 receptores de TGF-B tipo II y 7 receptores tipo I los receptores tipo II incluyen al receptor TGF- β tipo II (TGF- β R-II), el receptor de proteína morfogenica de hueso tipo II BMP (BMPR-II), el receptor de la hormona antimuleriana (AMHR) y los receptores tipo II y tipo IIB de activina (ActR-II y IIB). Mientras que los receptores tipo I son los denominados ALK 1-7 (*Activin receptor-*

like kinases) y el receptor ALK5 es específico para los ligandos TGF- β de mamíferos 1, 2 y 3. (Wrighton *et al* 2009).

Una vez que TGF- β se une al complejo receptor se inicia una cascada de señalización de la familia SMAD (por la unión de las frases (MAD “Mothers against decantaplegic” y SMA “Small Body Size”)) en las vías de transducción inducidas por TGF- β . Las proteínas SMAD tienen funciones tanto inhibitoras y activadores las cuales modulan los efectos biológicos del TGF- β 1; ya que tienen gran importancia en la señalización de TGF- β . (Lonn *et. al.* 2009)

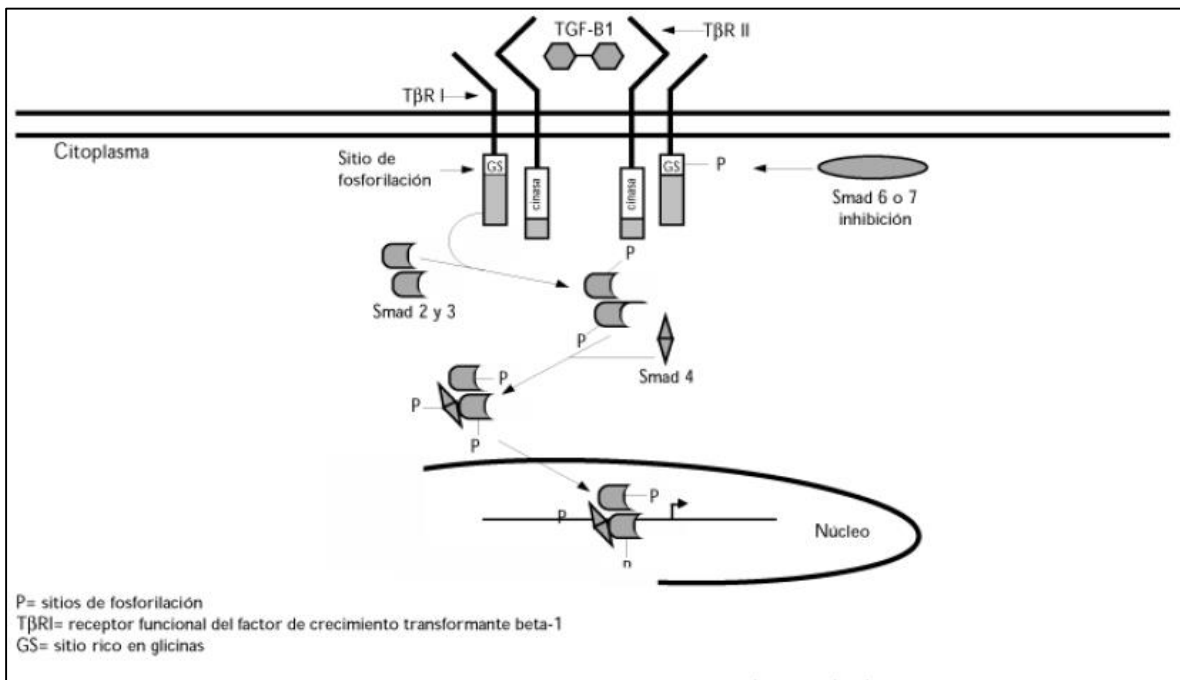


Figura 7. Esquema de la vía de transducción de señales inducida por el TGF- β 1. TGF- β 1 se une a T β RII para formar un complejo con el receptor tipo I (T β RI). Este complejo induce la fosforilación de SMAD 2 y 3, las cuales se unen con SMAD 4. El complejo SMAD 2-3-4 activo es translocado al núcleo donde funciona como un coactivador transcripcional de genes de respuesta al TGF- β 1. Las SMAD 6 y 7 pueden interactuar con T β RI y T β RII e impedir que se fosforilen las SMAD 2 y 3 inactivando la señalización de TGF- β . (Peralta-Zaragoza, 2001)

TGF-β y el sistema inmune

TGF-β es sintetizado por todas las células del sistema inmunológico, además de otras células, como las células epiteliales. Dentro del sistema inmune, el TGF-β tiene un papel importante en inducir un estado de tolerancia, puesto que regula la proliferación de los linfocitos, su diferenciación y su supervivencia. (Godlewski et al 2007) Además, TGF-β participa de manera importante en la respuesta inflamatoria a través de la regulación entre otras de la quimiotaxis, así como la activación de los linfocitos, las DC, las células NK y los granulocitos. Por otro lado TGF-β también tiene funciones opresoras ya que suprime la diferenciación y la actividad citolítica de las células NK y T así como de linfocitos B. (Lomo et. al. 1995) Otro efecto supresor del TGF-β es que inhibe la expresión de las moléculas clase II del MHC sobre la superficie de los macrófagos y también puede inhibir la producción de IL-4. Por lo tanto el equilibrio de la expresión de TGF-β durante la infección y el proceso inflamatorio será relevante para determinar que la respuesta inmunológica sea adecuada. (Halova et al. 2012) (Figura 8)

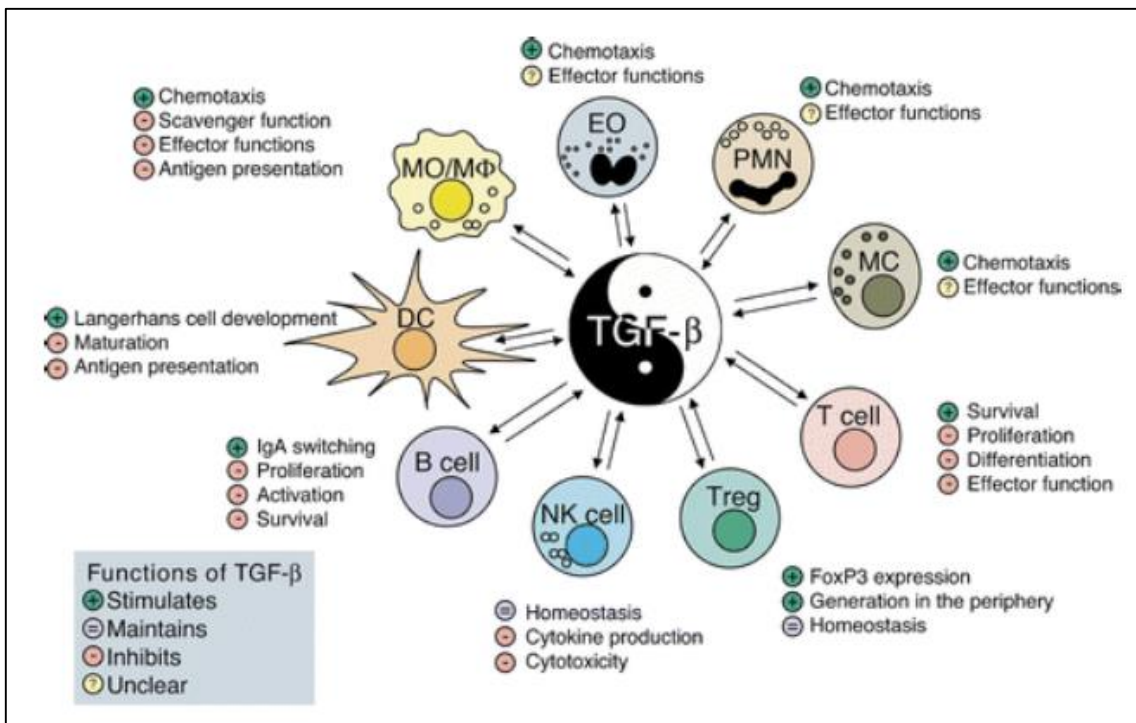


Figura 8. Efectos de la citocina TGF-β en diversas células del sistema inmunitario. (Li et al. 2006)

Marcador de macrófagos F4/80

Con el fin de identificar que células están expresando a APRIL se utilizó este marcador para identificar los macrófagos ya que son de las principales células que pueden expresar a la citocina APRIL a lo largo del íleon.

Los macrófagos son células fagocíticas que son importantes tanto para el sistema inmune innato como para el sistema inmune adaptativo, puesto que los macrófagos desempeñan un papel importante en la presentación y procesamiento de los antígenos, en la producción de moléculas con actividad biológica, tales como citocinas, proteasas y factores de crecimiento. Muchas de sus funciones importantes son realizadas por proteínas de superficie celular, tales como los receptores del complemento, receptores de manosa y los receptores scavenger. F4/80, también conocido como EMR1 o Ly71, que es una glicoproteína de 160 kDa es uno de los marcadores más específicos de la superficie celular de los macrófagos murinos. F4/80 se expresa altamente y constitutivamente en la mayoría de los macrófagos, incluyendo los macrófagos de la pulpa roja del bazo, de la microglia en el cerebro, de las células de Kupffer en el hígado y además en las células de Langerhans en la piel. Por otro lado la expresión de F4/80 está estrechamente regulada de acuerdo al estado fisiológico de las células. Por lo tanto, los precursores de los macrófagos, como los monocitos, tienen una menor expresión de F4/80 que los macrófagos. (Lin *et. al.* 2005)

Participación de las citocinas implicadas en la homeostasis intestinal

En el tracto gastrointestinal hay numerosas células inmunitarias, efectoras y reguladoras que juegan un papel crítico en la defensa del hospedero contra las infecciones entéricas. La función de estas células es regulada para favorecer una respuesta inmune tolerogénica contra productos de la digestión y de la flora normal. El equilibrio entre las funciones de la defensa del huésped y la tolerancia en el sistema inmune del intestino está mediado en parte por la producción de citocinas reguladoras producidas por las células del tejido linfoide asociado al intestino. (Malstrom y James 1998)

-Inmunoglobulina A

En la mucosa intestinal habitan grandes comunidades de bacterias comensales, las cuales se mantienen separadas del resto del sistema inmune intestinal a través de distintas estrategias, generando protección sin causar inflamación. Una de las estrategias principales para conseguir un estado no inflamatorio incluye la

producción de manera T Independiente (TI, regulación del CSR a IgA, induciendo la transcripción del gen AID independientemente de la interacción CD40/CD40L) de anticuerpos IgA por los linfocitos B residentes en los folículos de la mucosa, por ejemplo en las placas de Peyer o en las zonas extrafoliculares. (Dullaers *et. al.* 2009) La inmunoglobulina IgA neutraliza toxinas, bacterias patógenas y moléculas inflamatorias de origen microbiano, por ejemplo el LPS. IgA impide tanto la unión de las bacterias comensales a la superficie epitelial por impedimento estérico, como las interacciones con la capa de moco a través del componente secretor de la IgA e induce aglutinación bacteriana. (Dullaers *et. al.* 2009)

En las mucosas la IgA es el anticuerpo más abundante, ya que representa aproximadamente el 80% de las inmunoglobulinas producidas en estas. En el intestino existen diferentes células que participan en la síntesis de IgA tanto por un mecanismo T dependiente como T independiente. (Dullaers *et. al.* 2009)

-Células Dendríticas (DC)

Las DC, después de recibir un estímulo a través de sus TLR liberan BAFF y APRIL, así como ácido retinoico, esto conlleva a la activación de otras DC y de otras células del sistema inmune innato, tales como macrófagos, granulocitos y células epiteliales del intestino, las cuales también a su vez son capaces de liberar BAFF y APRIL. (Suzuki *et. al.* 2010)

Por otro lado, las DC de la placa de Peyer liberan otras citocinas como TGF- β que pueden inducir la producción de grandes cantidades de IgA. Las DC pueden promover la producción de anticuerpos IgA contra antígenos T-independiente presentando estos antígenos intactos a los linfocitos B. (Dullaers *et. al.* 2009)

-Los Linfocitos B (LB)

En los linfocitos B de las placas de Peyer y de los ganglios linfáticos mesentéricos se lleva a cabo el CSR de manera T-dependiente, pero el CSR también puede ser inducido de una forma TI en respuesta a señales emergentes (detección de Ag por TLR ubicados en las IEC o por las DC). Cuando el Ag es detectado por las IEC o por las DC se liberan grandes cantidades de BAFF y APRIL, que en conjunto con

otras citocinas (IL-5, IL-6, IL-10) inducen el CSR. También se puede inducir el CSR en los linfocitos B de los folículos linfoides aislados. Este tipo particular de folículos contienen células inductoras del tejido linfoide, caracterizadas por liberar otra molécula de la familia del TNF linfotóxina- β , después de recibir señales vía TLR de las bacterias comensales. La función de la linfotóxina- β en DC es la de estimular la producción de TGF- β , una citocina capaz de inducir CSR a IgA de forma T-dependiente pero también de forma T-independiente, en cooperación con BAFF y APRIL, ambos también liberados por DC activadas por ligandos específicos de los TLR. (Tezuka *et. al.* 2011) (Figura 9).

-Lamina Propia (LP)

La lámina propia intestinal, es un sitio donde los linfocitos B se encuentran de forma dispersa y sin formar estructuras foliculares, pero también es un sitio inductor para la producción de IgA de manera T independiente. La producción de IgA en esta zona específica del intestino se lleva a cabo mediante el apoyo de múltiples subtipos de DC residentes, las cuales aportan señales activadoras a los linfocitos B de manera TI. Un subtipo de DC que participa activamente en este tipo de procesos producen iNOS (*nitric oxide synthase*) después de recibir señales de las citocinas BAFF y APRIL, esto conlleva a incrementar la expresión del receptor de TGF- β en los linfocitos B vía óxido nítrico, de manera que los linfocitos B se sensibilizan a señales inducibles provenientes de TGF- β para empezar a producir IgA. Señales microbianas a través de los TLR activan a las DC y su propia producción de BAFF y APRIL. Otro subtipo de DC residente en la lámina propia son las que constitutivamente expresan el receptor de flagelina (TLR5). Estas DC tienen una expresión de TLR4 muy baja o no detectable y se ha demostrado que son capaces de inducir el CSR a IgA de forma TI al liberar ácido retinoico e IL-6. La flagelina de las bacterias activa a los TLR5 de este tipo de DC²⁴, (Ueda *et. al.* 2007) (Figura 9).

-Células Epiteliales

Las células epiteliales intestinales pueden liberar citocinas como BAFF y APRIL que inducen el CSR a IgA, al reconocer a las bacterias mediante los TLR.

Además, las células epiteliales pueden ampliar las funciones de activación de las DC colindantes liberando la citocina TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). La TSLP es una citocina perteneciente a la familia de la IL-7, que induce, la producción de BAFF y APRIL en DC que han sido estimuladas a su vez a través de los TLR. (He et. al. 2007; Xu et. al. 2007) (Figura 9).

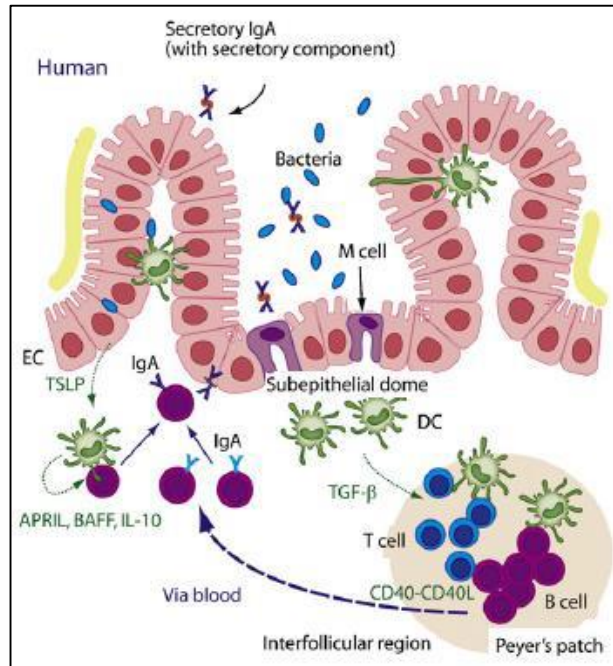


Figura 9. Cambio de isotipo por un mecanismo TI. En la lámina propia los linfocitos B con isotipolgM+ IgD+ pueden llevar a cabo el cambio de isotipo directo de IgM a IgA en respuesta a la presencia de BAFF, APRIL, IL-5, IL-6 e IL-10. (Xu et. al. 2007)

Escherichia coli

Es una bacteria anaerobia facultativa de la microbiota intestinal de los animales de sangre caliente. El hospedero se coloniza desde el nacimiento con *E. coli*, la cual reside de manera permanente en el intestino, estableciendo una relación simbiótica con el hospedero. *E. coli* y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento adecuado del proceso digestivo, además de ser responsables de producir las vitaminas B y K. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo. *E. coli* es un bacilo Gram negativo, móvil (por flagelos peritricos), no esporulado, fermenta glucosa y lactosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen nitratos a nitritos. Sin embargo, existen cepas que por mecanismos de transferencia horizontal han adquirido genes de patogenicidad

y pueden causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

(Rodríguez-Ángeles *et. al* 2002)

Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis grupos, cada uno definido por sus mecanismos de patogenicidad: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* entero patógena típica y atípica (tEPEC, aEPEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* entero hemorrágica (EHEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento. (Rodríguez-Ángeles

et. al 2002)

EAEC

E. coli Enteroagregativa (EAEC) es un patógeno emergente identificado por primera vez durante la década de 1980 cuando las cepas de EAEC fueron aisladas de casos de diarrea aguda y persistente en infantes de países en vías de desarrollo y en casos de la denominada diarrea del viajero (DV). (Mathew *et al.* 1985) La DV es la enfermedad que más comúnmente afecta a individuos que viajan desde países industrializados a zonas menos desarrolladas del mundo.

La característica distintiva de las cepas de la EAEC es su capacidad para producir un patrón de adherencia agregativa "ladrillos apilados" sobre células HEp-2 o sobre superficies como el vidrio (Cravioto *et al* 1979). Utilizando el protocolo de adherencia (Cravioto 1979), simultáneamente dos grupos independientes (Mathew *et al.* 1985; Nataro *et al* 1987) publicaron que cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diarrea, adultos y de infantes ambos con enfermedad diarreica se adhirieron a las hep-2 en forma de ladrillos apilados. Los autores del trabajo de diarrea en adultos utilizaron el término "adherencia agregativa" (AA) para describir estas cepas de *E. coli*, y el grupo del trabajo en niños las denominó "Entero agregativas". De estos estudios se obtuvieron dos cepas de referencia, en la actualidad contamos con dos cepas de referencia de cada uno de estos estudios JM221 y 042. (Mathew *et al.* 1985; Nataro *et al* 1987) Estos aislamientos de EAEC y otros fueron probados en un estudio con voluntarios adultos en el que se observó que la cepa 042 provocó diarrea en la

mayoría de los voluntarios, mientras que las otras cepas de EAEC no lo hicieron (Nataro *et al.* 1995). Estos primeros estudios proporcionan evidencia de la gran heterogeneidad de las cepas de EAEC, así como las respuestas del hospedero a estas. De tal manera la cepa 042 es considerada el arquetipo de las cepas EAEC, con esta cepa se han realizado la mayoría de los estudios de factores de virulencia, los estudios genéticos y para el desarrollo de modelos en animales. (Estrada García T. and Navarro-García E. 2012; Morín *et al* 2013)

Importancia de *Escherichia coli* entero agregativa (EAEC)

EAEC se ha asociado a casos de diarrea aguda entre lactantes y niños pequeños que residen en todas las regiones del mundo y de personas que viajan de países industrializados a regiones menos desarrolladas, también se ha relacionado con diarrea aguda y persistente en niños de regiones sub desarrolladas y por otro lado varios estudios han mostrado que EAEC es un importante agente causal de diarrea aguda y persistente en niños menores de 5 años de regiones menos desarrolladas así como de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). (Estrada García T. and Navarro-García E. 2012; García *et al* 2010)

Los niños con deficiencias nutricionales o inmunocomprometidos presentan mayor riesgo de enfermedades diarreicas potencialmente mortales. La presencia de infecciones de EAEC asintomáticas o con diarrea en niños menores de 5 años está asociada con el retraso en el crecimiento y la diarrea recurrente con el retraso en el desarrollo cognoscitivo. (Lima and Guerrant, 1992)

Como ya se mencionó EAEC es la segunda causa de diarrea del viajero solamente detrás de ETEC de personas de países industrializado que han visitado América Latina y del sudeste asiático. (Paredes-Paredes *et al* 2011; Ahn JY *et al* 2011) La DV se presenta en 15 al 50% de los visitantes de países industrializados a regiones de bajos y medianos ingresos, y se reportan anualmente hasta 40 millones de casos de DV. Dependiendo de la duración de la estancia, la DV puede afectar hasta el 80% de los viajeros a destinos de alto riesgo (OMS). Además, se conoce que una parte de los pacientes con DC desarrollado síndrome de intestino irritable (IBS) y síntomas gastrointestinales crónicos. (De la Cabada Bauche *et al* 2011; Okhuysen *et al* 2004)

Las características clínicas producidas por EAEC se han descrito en estudios en voluntarios, en brotes y en casos esporádicos. El cuadro clínico característico producido por EAEC incluye la diarrea acuosa asociada con la presencia de moco, con o sin sangre, fiebre baja, dolor abdominal, náuseas y vómitos. También se ha asociado con PMN (Polimorfo nucleares) y lactoferrina en heces. (Nataro JP *et al* 1995; Bhan *et al* 1989)

Patogénesis

Datos acumulados de varios estudios han sugerido tres características importantes de la patogénesis de EAEC: 1) la adherencia a la mucosa intestinal y formación del biofilm sobre la superficie del enterocito, 2) la producción de enterotoxinas y citotoxinas y 3) la inducción de una respuesta inflamatoria de la mucosa, incremento de secreción intestinal y daño. (Estrada García T. and Navarro-García E. 2012; Croxen *et al* 2013). La Adhesión de EAEC se ha caracterizado por producir un biofilm compuesto por agregados “ladrillos apilados”, embebida en una capa de moco espeso. Se considera que el patrón de AA (Adherencia Agregativa) depende de la presencia de las fimbrias de adherencia agregativa. EAEC codifica un factor transcripcional denominado *AggR* (*aggregative Regulator*). *AggR* es considerado el regulador maestro ya que regula la biogénesis de la fimbria de adherencia agregada (AAF/I, AAF/II y AAF/III) así como una gran variedad de factores de virulencia entre ellas la producción de varias toxinas incluyendo *E. coli* enteroagregativa1 (EAST1) que activa los canales de cloruro; Pet (plasmid-encoded toxin), una proteína que altera la estructura del citoesqueleto; Enterotoxina 1 de Shigella (SHET1) que también induce la secreción intestinal; y la proteína implicada en la colonización intestinal (pic) que también tiene una actividad proteasa. (Navarro-García *et al* 2011)

Otra molécula implicada en la patogénesis de la EAEC es la dispersina, una proteína secretada y codificada por el gen *aap*. La dispersina es translocada por AaT (*antiaggregative transporter system*), actúa disminuyendo la autoagregación bacteriana y permite la dispersión de la EAEC a lo largo de la mucosa intestinal.

(Mohamed *et al* 2007; Sheikh *et al* 2002)

Hasta el momento no existe un modelo murino de infección con EAEC que nos permita reproducir y caracterizar los eventos que induce esta bacteria sobre el epitelio intestinal. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de infección con EAEC que estamos valorando en la actualidad.

Citrobacter rodentium

Citrobacter rodentium es un patógeno de la mucosa intestinal murina. Es una bacteria Gram negativa que causa diarrea en ratones lactantes así como, en adultos, hiperplasia del colon transmisible murina (TMCH). La infección de *C. rodentium* puede ser mortal en ratones lactantes, sin embargo en ratones adultos la infección normalmente no es letal. (Collins *et al.* 2014)

En modelos murinos se ha observado que la infección por esta bacteria comienza pocas horas después de su inoculación oral. La lesión (hiperplasia) es visible entre los días 5 y 14 post-inoculación y entre los días 21-28 post-inoculación deja de ser detectable en heces y a las 7 semanas post-inoculación las lesiones desaparecen. Si estos ratones vuelven a ser inoculados con *C. rodentium* ya no desarrolla la infección sugiriendo que los animales han generado inmunidad ante este patógeno. (Mundy *et al.* 2005)

Importancia de *C. rodentium*

C. rodentium está relacionada genéticamente con *E. coli* en particular con *E. coli* entero patógena (EPEC) y *E. coli* entero hemorrágica (EHEC) estas últimas bacterias son patógenos gastrointestinales clínicamente importantes en humanos. En su conjunto estas tres bacterias se caracterizan por producir la lesión Adherencia y Esfacelamiento (A/E) en el tracto gastrointestinal del hospedero (Mundy *et al.* 2005). La formación de lesiones A/E distingue a EPEC y EHEC de otras cepas de *E. coli* patógenas y comensales. EPEC es una causa importante de diarrea infantil, que conduce a altas tasas de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo. Mientras que la infección por EHEC causa diarrea sin sangre, colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (este último causado por la producción de la toxina Shiga (Stx)). *C. rodentium* comparte el 67% de sus genes

genes que se agrupan en cinco operones: LEE1, LEE2 y LEE3, LEE4 y LEE5 que codifican para varias proteínas, entre ellas las del SST3, las proteínas de adhesión Tir e intimina y otros efectoras, así como para el regulador maestro ler (Mundy *et al* 2005; Barba J. *et al* 2005). (Figura 11) La organización de los genes de la isla de patogenicidad LEE es casi idéntica en EPEC, EHEC y *C. rodentium*, sin embargo su localización dentro del cromosoma es diferente. (Wales A.D. *et al* 2005)

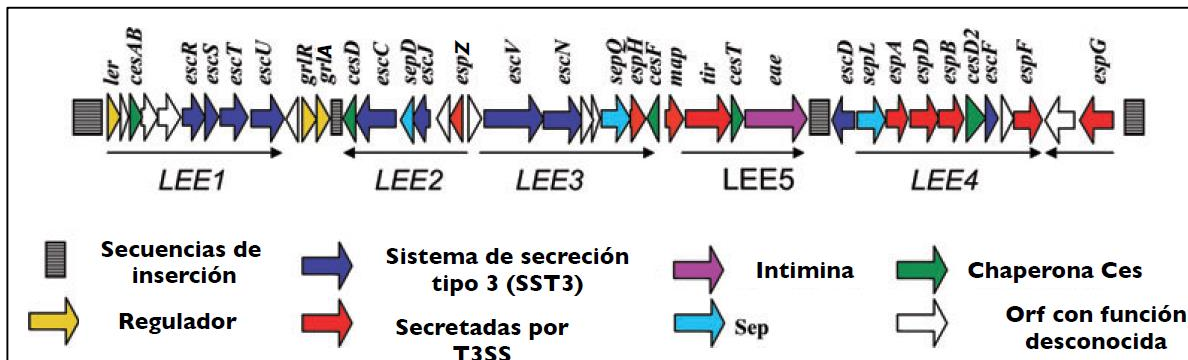


Figura 11. Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de *C. rodentium* en los cuales se muestran algunos genes representativos. La isla de patogenicidad LEE consta de 41 genes que se agrupan en cinco operones denominados LEE1 a LEE5. Los operones LEE1 a LEE3 contienen los genes que codifican para el SST3, LEE4 contiene la mayoría de los genes que codifican para proteínas efectoras y el operon LEE5 codifica las proteínas necesarias para las proteínas de adhesión íntima. (Mundy *et al* 2005)

Justificación:

Escherichia coli entero agregativa (EAEC) es uno de los principales causante de diarrea en el mundo y *C. rodentium* es el principal causante de diarrea en ratones neonatos. La vía natural de entrada de EAEC y de *C. rodentium* es oral y colonizan principalmente el intestino delgado y grueso respectivamente.

En la respuesta inmune intestinal la citocina TGF- β juega un papel importante en regular la respuesta ante patógenos intestinales, mientras que la citocina APRIL es un elemento clave para permitir el CSR hacia la IgA contra moléculas específicas del patógeno e impidiendo así la posterior colonización de estos.

Hipótesis

La infección por *Escherichia coli* entero agregativa o *Citrobacter rodentium* de ratones C57BL/6 induce un incremento de la expresión de las citocinas APRIL y TGF- β en el intestino delgado.

Objetivo General

Caracterizar la expresión de las citocinas APRIL y TGF- β en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 infectados y controles.

Objetivos particulares

1. Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina APRIL in vivo e in situ en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.
2. Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina TGF- β in vivo e in situ en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.
3. Evaluar y compararla expresión de APRIL in vivo e in situ en cortes de íleon de ratones infectados y controles con *C. rodentium* o con EAEC.
 - 3.1. Identificar las células productoras de APRIL en íleon de ratones C57BL/6 con *C. rodentium*.
4. Comparar la expresión de APRIL y TGF- β in vivo e in situ en cortes de íleon de ratones infectados y controles con *C. rodentium* o con EAEC.

Materiales y Métodos

A) Cepa murina

Ratones C57BL/6

Los ratones C57BLACK6, abreviada como C57BL/6 o black 6, es la cepa de ratón de laboratorio más usada para ser manipulada genéticamente en el estudio de las enfermedades humanas. Su aspecto corresponde a un pelaje de color marrón oscuro, casi negro, son más sensibles al ruido, más propensos a morder y buenos criadores. Esta cepa de ratón se utiliza en diversas líneas de investigación como por ejemplo: la genética, la inmunología, la neurobiología y la microbiología.

Para realizar este proyecto se utilizaron 7 ratones de los cuales: a 3 ratones se les administro solución salina, 2 ratones fueron inoculados con EAEC y por ultimo 2 ratones fueron inoculados con *C. rodentium*, los ratones utilizados fueron sacrificados a los 4 días post-inoculación.

Los experimentos realizados para el presente trabajo se llevaron a cabo en ratones C57BL/6 machos y ratones C57BL/6 hembras de 4 semanas, libres de patógenos. Los pies de cría (Laboratorios Jackson) son mantenidos en el bioterio del CINVESTAV bajo el cuidado personalizado de nuestro laboratorio. Se reprodujeron y criaron en cajas estériles con filtro, así como con aserrín, alimento y agua estéril. Durante toda la fase experimental los ratones fueron mantenidos bajo las condiciones antes mencionadas así como con alimentación y agua ad libitum; el aserrín fue cambiado diariamente y al final de los experimentos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio del CINVESTAV (CICUAL-CINVESTAV).

Determinación de enterobacterias en las heces de los ratones

Previo a cada experimento se tomaron las heces de los ratones (1 a 3 “pallets”), se resuspendieron en 1 mL de solución salina estéril al 0.85 % y se sembraron en agar McConkey. Se utilizaron aquellos ratones en donde no se obtuvo ningún crecimiento en las placas de agar McConkey. Cabe mencionar que no eran

ratones genotobiontes, ya que en medios ricos como el agar soya tripticasa, hubo crecimiento de cocos Gram (+) y algunos bacilos Gram (+).

B) Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa 042 de *Escherichia coli* entero agregativa para inoculación de ratones, mientras que para *C. rodentium* utilizamos la cepa BS 100.

Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas de EAEC y *C. rodentium* se sembraron por estría cruzada en una placa de agar McConkey (McDLab) y se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Del cultivo se seleccionó una colonia, la mitad de la colonia se resuspendió en 5 mL de caldo de soya tripticasa estéril (McDLab) y se incubó a 37°C durante 18-24 h. La otra mitad se colocó en 1 mL de agua MilliQ para realizar el ensayo de PCR para identificar el gen *eaeB* que codifica para la intimina B de *C. rodentium*, y los genes *aatA* (que codifica para el translocador de la dispersina *AaT* antiaggregative transport system), *AggR* (codifica para el regulon maestro) y *aap* codifica para la dispersina, estos tres últimos genes se utilizan para la identificación de EAEC. Del cultivo en caldo de 24 h se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana y se colocó en un matraz con 50 mL de caldo soya tripticasa fresco y se incubó a 37°C por aproximadamente 4 h para *C. rodentium* y 5 h para EAEC, con agitación constante de 180 rpm en un agitador digital (Digital Shaker). Posteriormente se colocó 1 mL de cada suspensión bacteriana en tubos de microcentrifuga y se centrifugó a 13,000 rpm se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con solución salina al 0.85 %. Una vez lavada la pastilla bacteriana se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril al 0.85 %, se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Smartspec 3000, Bio-Rad) a una λ de 600 nm ($1 \text{ O.D.} = 5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$), se determinó la concentración bacteriana y se realizaron los cálculos y las diluciones necesarias para obtener la dosis para los experimentos.

Inoculación de los ratones

Los ratones se inocularon vía oral utilizando una sonda intraesofágica. A un grupo de ratones se les inoculó con una dosis de 9.5×10^9 UFC de EAEC y otro grupo

con una dosis de 5×10^8 UFC de *C. rodentium*. En el caso de *C. rodentium* el alimento fue retirado 6 h antes de la inoculación bacteriana y sólo se les dejó con agua. A los ratones control se les administró 50 µL de solución salina estéril. El peso de cada ratón fue registrado diariamente.

C) Inclusión del íleon de los ratones C57BL/6

Los ratones inoculados con *C. rodentium* o EAEC y controles se colocaron en una cámara con cloroformo, para posteriormente ser sacrificados por dislocación cervical para su disección. A cada ratón se le extrajo el intestino desde el duodeno hasta el recto, posteriormente se seleccionó y se realizaron cortes de 1 cm al íleon. A estos cortes de íleon se les realizó un corte longitudinal y se colocaron extendidos como una lámina sobre cera dental. El tejido se sumergió en etanol absoluto durante 24 horas para fijarlo. Posteriormente cada corte del íleon fue colocado en un sobre de papel filtro para poder ser lavado con agua durante 12 horas, el cual fue deshidratado utilizando diferentes diluciones de etanol y Xilol durante 1 hr cada reactivo (Etanol 70%, Etanol 96 % I, Etanol 96 % II, Etanol Absoluto I, Etanol Absoluto II, Etanol- Xilol I (Vol-Vol), Etanol-Xilol II (Vol-Vol) y Xilol).

Posteriormente las muestras fueron incluidas en parafina (Parafina I durante 90 min y Parafina II durante 120 min).

Por último a las muestra se les retiró el sobre de papel filtro y fueron montadas con parafina líquida, para poder ser cortados en el micrótopo.

D) Cortes histológicos de íleon de los ratones C57BL/6

Los cortes histológicos de íleon fueron realizados en el laboratorio No. 2 ubicado en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV-IPN).

E) Características de los Anti-cuerpos (Ac) utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica.

1) APRIL

Se utilizó como Ac primario un Ac polyclonal Anti-APRIL, cuyo isotipo es IgG, de la marca GeneTex con el número de catálogo GTX22566.

Como Ac secundario se utilizó POX anti-Rabbit, cuyo isotipo es IgG, de la marca Jackson ImmunoResearch con el número de catálogo 111-036-047.

2) TGF- β

Se utilizó como Ac primario un Ac polyclonal Anti-TGF- β , cuyo isotipo es IgG, de la marca Santa Cruz Biotechnology Inc con el número de catálogo TGF- β 1 (V): sc-146.

Como Ac secundario se utilizó Swine Anti-Goat IgG (H+L), cuyo isotipo es IgG, de la marca Southern Biotech con el número de catálogo 6300-05.

F) Inmunohistoquímica

Son un grupo de técnicas que permiten localizar antígenos específicos presentes en células o en tejidos utilizando Ac. La interacción Ag-Ac solo es visible si el Ac 1° o 2° está marcado (Figura 9), los cuales pueden estar marcados con sustancias que absorbe o emite luz o produce coloración. (Baron *et al.* 2009; Sangild *et al.* 2009) (Figura 12)

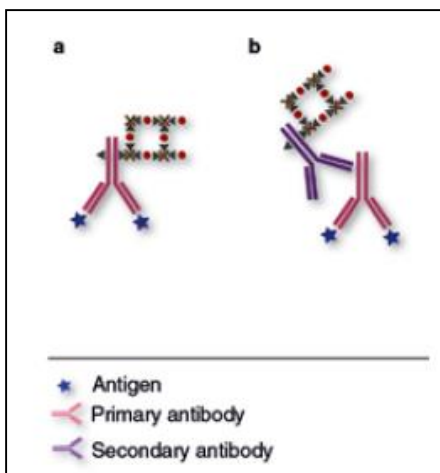


Figura 12. Métodos inmunohistoquímicos que producen coloración.

a) Método directo: utiliza un Ac 1° conjugado a una enzima que reconoce específicamente al Ag de un tejido. La interacción Ag-Ac es detectada al adicionar la solución sustrato-cromógeno.

b) Método Indirecto: utiliza un Ac 1° no conjugado que reconoce específicamente al Ag de un tejido. Se necesita un Ac 2° conjugado a una enzima, el cual reconocerá las regiones constantes del Ac 1°. La interacción Ag-Ac es detectada al adicionar la solución sustrato-cromógeno. (Sangild *et al.* 2009)

En este trabajo se hará referencia a la técnica de inmunoperoxidasa la cual utiliza como marcador una enzima que cambia de color un sustrato incoloro. En los inmunoensayos realizados se utilizó un Ac 2° peroxidado y como sustrato fue utilizada la Diaminobenzidina (DAB), la cual nos permite identificar a las células marcadas con un color café.

G) Programa ImageJ

En este proyecto se utilizó el programa ImageJ para llevar a cabo el conteo de células positivas en los mismos campos de tejidos seriados de íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC, para detectar que células están expresando a la citocina APRIL.

H) Estandarización de un ensayo de inmunohistoquímica para la detección de citocinas (APRIL o TGF- β) en cortes de 5 μ m de íleon de ratones incluidos en parafina.

Los cortes utilizados para los ensayos de inmunohistoquímica se dejaron desparafinar en un horno durante toda la noche a una temperatura entre 58-63°C, se retira el excedente de parafina del contorno de los cortes y se termina la etapa de desparafinación al sumergir los cortes en xilol, para posteriormente ser hidratados con diferentes concentraciones de Etanol (99.5% I, 99.5% II, 99.0% I, 99.0% II y 80.0%) durante 1 min cada una. Para la recuperación de antígeno, los cortes se sumergen en buffer de citratos 0.01 M pH 6.0 y se colocan en un baño María, a ebullición durante 20 min, se dejan enfriar las muestras por 10 min, para posteriormente ser colocadas en PBS 1 X. Para eliminar la actividad de las peroxidases endógenas las muestras son incubadas con H₂O₂ al 9 % en PBS 1X con 0.1 % de azida de sodio durante una hora, se realizan tres lavados con BSA al 0.1 % en PBS 1X de 5 min. En lo sucesivo los lavados se harán de manera idéntica. Para el bloqueo de uniones inespecíficas se incuban las muestras con suero no relacionado al 1-2 % en BSA al 1 % en PBS 1X pH 7.4 durante 1 hr. Las muestras son incubadas toda la noche a 4°C con el Anti-APRIL o Anti-TGF- β (diluidos con la solución utilizada para el bloqueo de uniones inespecíficas). Al día

siguiente se realizan tres lavados y se incuban las muestras durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo. Posteriormente las muestras son reveladas con el kit Betazoid DAB Chromogen de la marca Biocare Medical durante 2 min o menos (el revelado debe de ser monitoreado con un microscopio en todo momento), la reacción es detenida con la solución de lavado. Las muestras son contrastadas con Hematoxilina de Harris por 3 min, deshidratadas con diferentes soluciones de Etanol (80.0%, 99.0% II, 99.0% I, 99.5% II, 99.5% I) durante 20 s cada una, por ultimo agregar el medio de montaje Polymount y colocar un cubreobjetos para posteriormente ser analizadas.

Resultados

1.- Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.

Con el fin de estandarizar la técnica para detectar la citocina APRIL en los cortes de íleon, se utilizaron cortes de un bloque de parafina (No. 1905) del íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con 5×10^8 UFC de *C.rodentium* y sacrificado al cuarto día post-inoculación. Se realizaron tres experimentos en donde se modificaron las concentraciones (diluciones) del anticuerpo secundario para determinar las mejores condiciones de trabajo para la detección de APRIL como se muestra en la siguiente Tabla 1.

	Diluciones		
	1	2	3
AC Primario	1:50 (10 µg/ml)	1:50 (10 µg/ml)	1:50 (10 µg/ml)
Ac Secundario	1:250 (3.2 µg/ml)	1:50 (16 µg/ml)	1:100 (8 µg/ml)
Tiempo de exposición a DAB	30 s	30 s	30 s

Tabla 1. Diluciones utilizadas para la estandarización de la citocina APRIL en íleon de un ratón inoculado con 5×10^8 UFC de *C.rodentium*.

Además de probar diferentes concentraciones del Ac secundario, nosotros establecimos aumentar el tiempo de lavado de 3 a 5 minutos tres veces utilizando el mismo tiempo de revelado de DAB en los tres experimentos. (Figura 13)

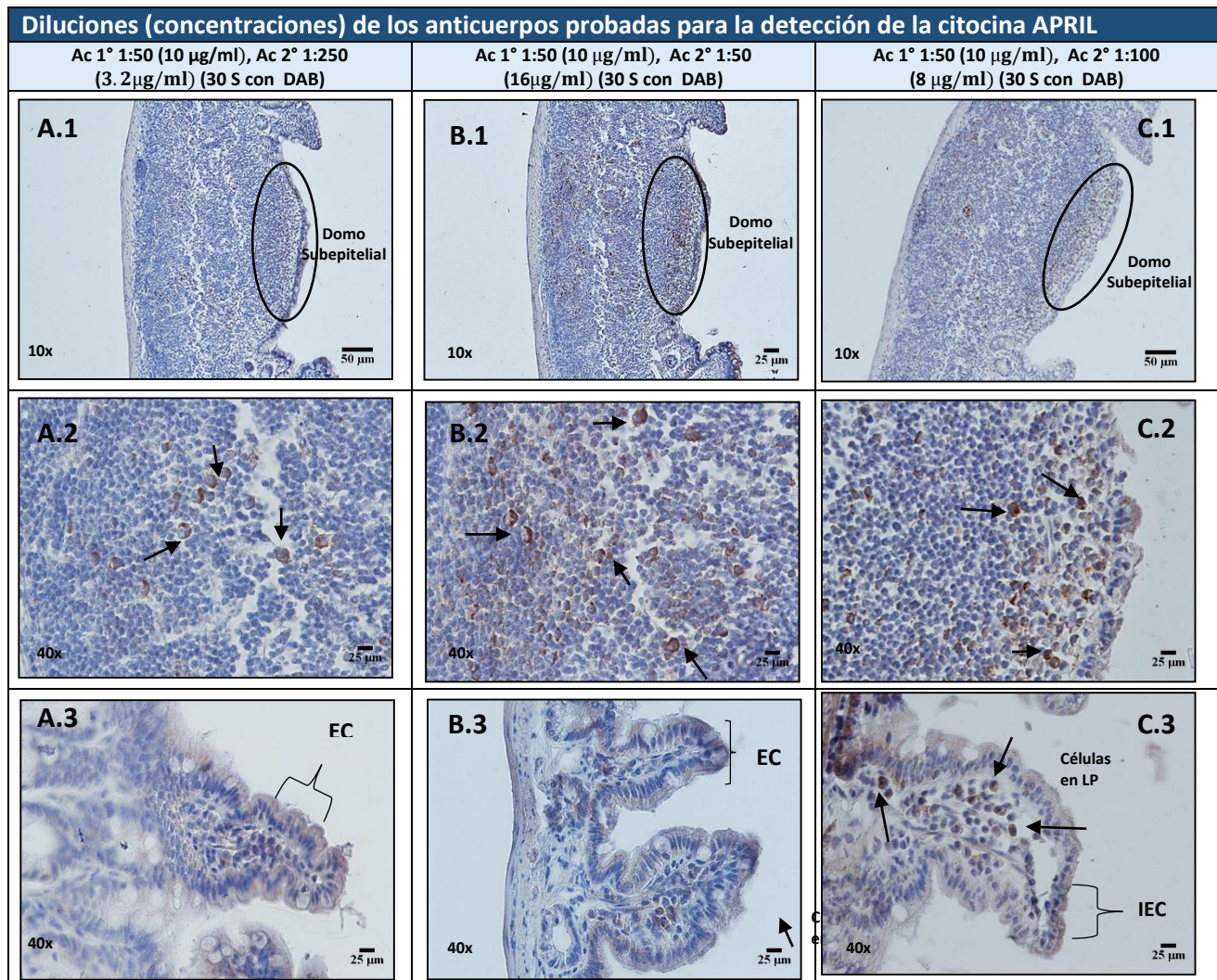


Figura 13. Comparación de la expresión de la citocina APRIL en cortes de 5 µm de íleon del ratón C57BL/6 inmunizado con *C. rodentium*, utilizando diferentes diluciones del anticuerpo secundario y aumentando los tiempos de lavado. Las imágenes identificadas con los números (A.1, B.1, C.1) muestran los resultados con las diferentes concentraciones de anticuerpo secundario y con un lavado de 5 minutos con BSA en PBS 1X por triplicado. En los diferentes inmunoensayos se observan células marcadas por la citocina APRIL tanto en el domo subepitelial de la placa de Peyer (A.2, B.2, C.2), en la lámina propia (LP) (A.3, B.3 y C.3) y en los enterocitos (EC) (A.3, B.3 y C.3).

Con base en los resultados de la estandarización de la citocina APRIL se decidió utilizar las concentraciones del Ac primario 1:50 (10 µg/mL) y Ac secundario 1:50 (16 µg/mL), ya que con estas diluciones se observó una clara expresión de la citocina APRIL evitando el exceso de fondo producido por el DAB, visualizando de manera adecuada las células marcadas (Figura 14). La expresión de la citocina APRIL se observó principalmente en las células del domo subepitelial y en la

región inferior de la Placa de Peyer, en las células en la lámina propia de algunas vellosidades y en los enterocitos.

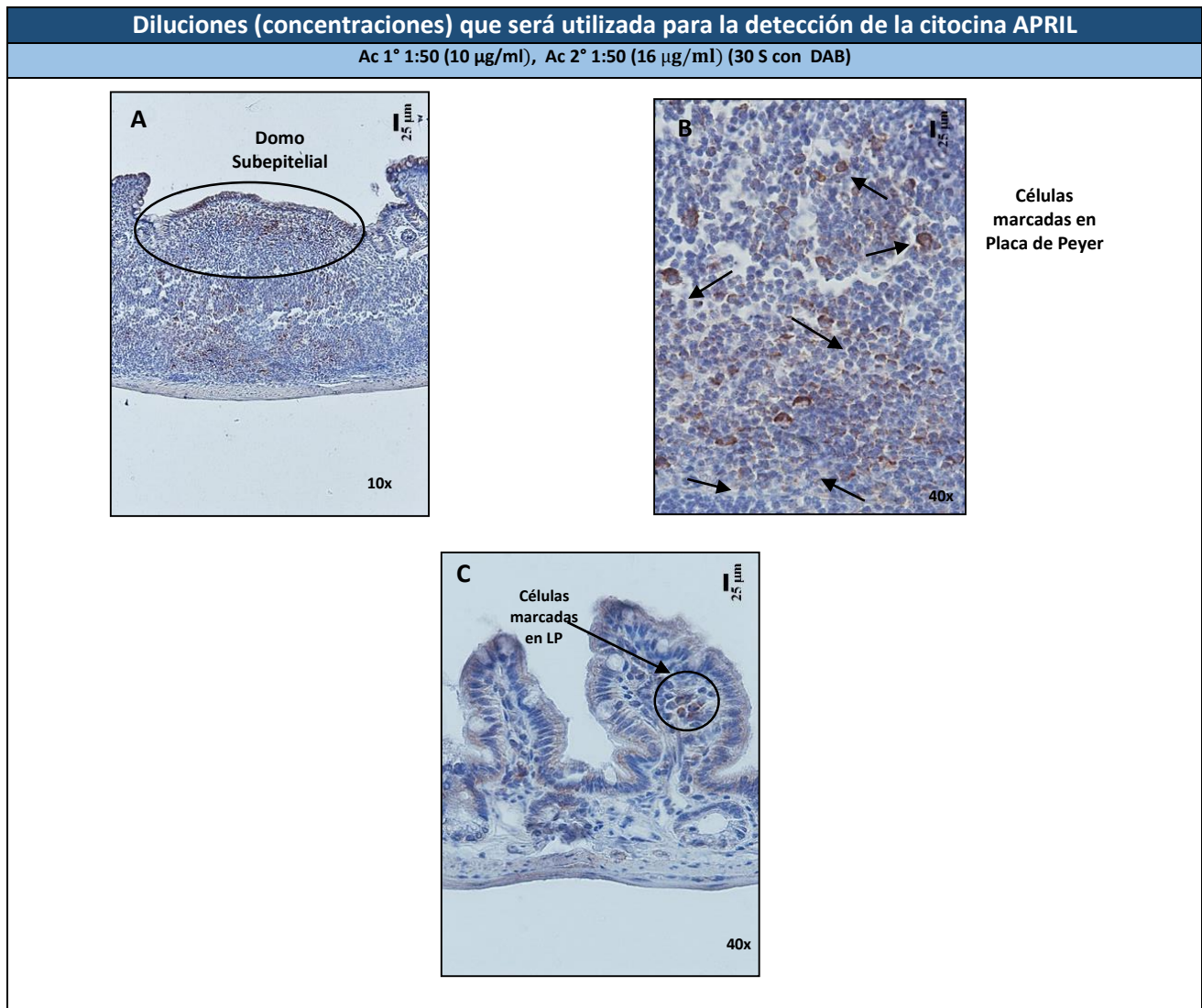


Figura 14. Condiciones óptimas para la inmunolocalización de la citocina APRIL en cortes de 5 µm de íleon de ratón C57BL/6 inmunizado con *C. rodentium*, utilizando la dilución óptimas de Ac 1° (1:50 ,10 µg/ml), y Ac 2° (1:50 ,16 µg/ml). Como se muestra en las microfotografías se observa la presencia de células marcadas por la citocina APRIL en el domo subepitelial de la placa de Peyer (A y B), en la lámina propia (C) y en los enterocitos (C).

2.- Estandarizar una técnica de inmunohistoquímica para la detección de la citocina TGF- β *in vivo* e *in situ* en cortes histológicos de íleon de ratones C57BL/6 incluidos en parafina.

Para determinar las condiciones óptimas para detectar la citocina TGF- β se llevaron a cabo seis inmunoensayos. Para esto se utilizó el bloque de parafina No. 388 del íleon de un ratón C57BL/6 inoculado 5×10^9 UFC de EAEC el cual fue sacrificado al cuarto día post-inoculación. Se utilizaron tres diferentes concentraciones del Ac primario con la misma concentración del Ac secundario, pero en las tres combinaciones de anticuerpos se utilizaron tres diferentes tiempos de revelado de DAB como se muestra en la siguiente Tabla 2:

	Diluciones (Concentraciones)					
	1	2	3	4	5	6
Ac Primario	1:400 (0.25 $\mu\text{g/ml}$)	1:50 (2.0 $\mu\text{g/ml}$)	1:50 (2.0 $\mu\text{g/ml}$)	1:100 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)	1:50 (2.0 $\mu\text{g/ml}$)	1:50 (2.0 $\mu\text{g/ml}$)
Ac Secundario	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)	1:400 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)
Tiempo de exposición a DAB	1 min	2 min	30 s	1 min	2 min	30 s

Tabla 2. Diluciones utilizadas para la estandarización de la citocina TGF- β en íleon de un ratón inoculado con 5×10^9 UFC de EAEC.

Además de probar diferentes concentraciones del Ac primario, nosotros establecimos aumentar el tiempo de lavado de 3 a 5 minutos tres veces utilizando el mismo tiempo de revelado de DAB en los tres experimentos. (Figura 15)

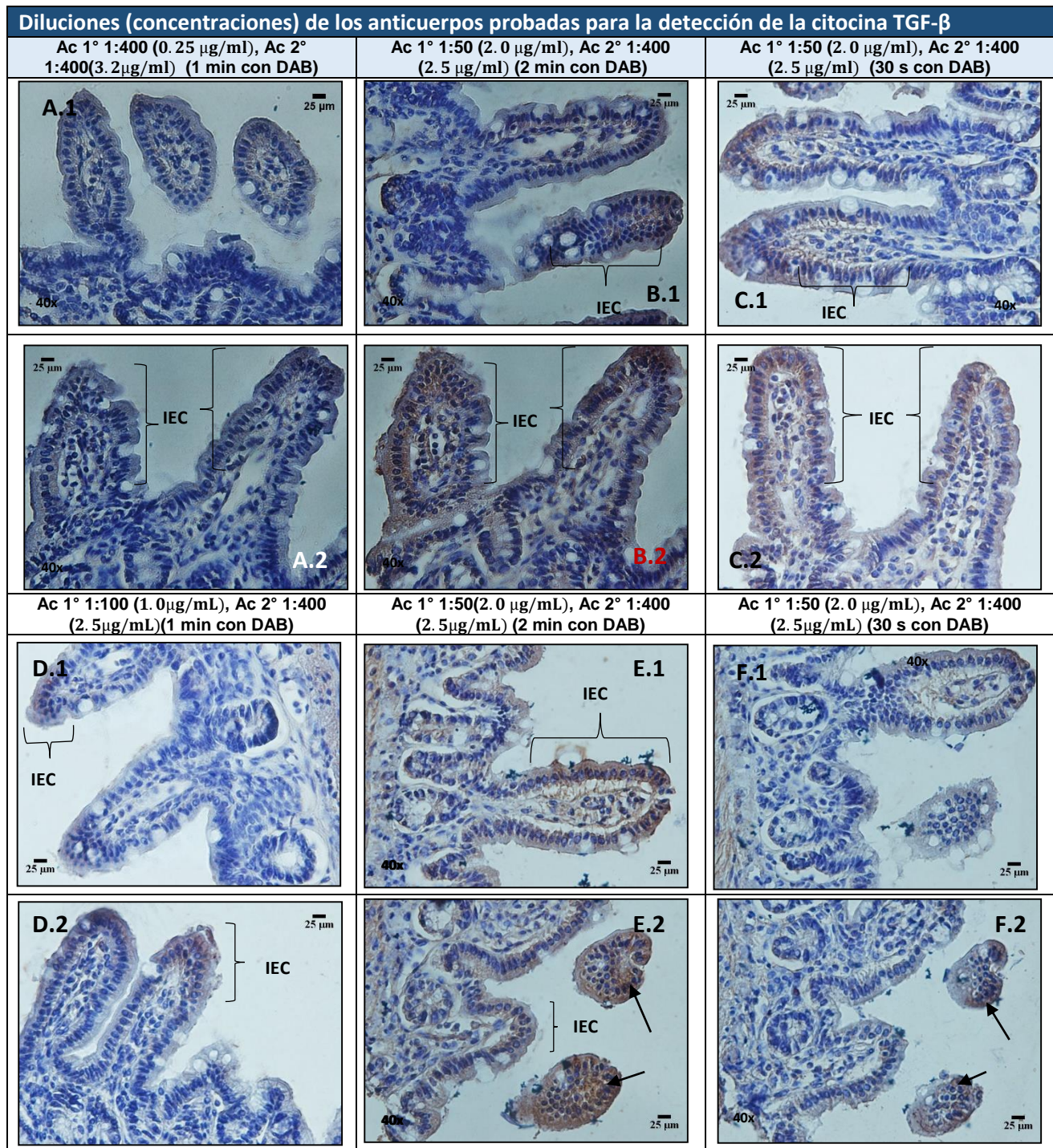


Figura 15. Comparación de la expresión de la citocina TGF- β en cortes de 5 μm de íleon de ratón C57BL/6 inmunizado con EAEC, utilizando diferentes diluciones de anticuerpos primario y tiempos de revelado de DAB. Como se muestra en las microfotografías A.1-2, B.1-2, C.1-2, D.1-2, E.1-2 y F.1-2 se observan las diferentes zonas de expresión de la citocina TGF- β en el tejido. En los diferentes inmunoensayos se observan células que expresan la citocina TGF- β en los enterocitos y la lámina propia de las vellosidades. En las imágenes se observan la expresión de TGF- β en las mismas regiones del tejido, pero varía la intensidad de la expresión de la citocina dependiendo de las diferentes diluciones de anticuerpos utilizada y del tiempo de exposición de DAB.

Posteriormente de haber realizado la estandarización para esta citocina, encontramos que las condiciones óptimas en donde se observa de manera mas adecuada la expresion de TGF- β fue utilizando las concentraciones de Ac 1° (1:50, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), del Ac 2° (1:400, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y una exposici3n de DAB, de 30 s como se muestra en la Figura 16. La expresi3n de TGF- β se observ3 en los enterocitos aunque se observa tambi3n en c3lulas localizadas en la l3mina propia, cabe mencionar que no se evalu3 la placa de Peyer.

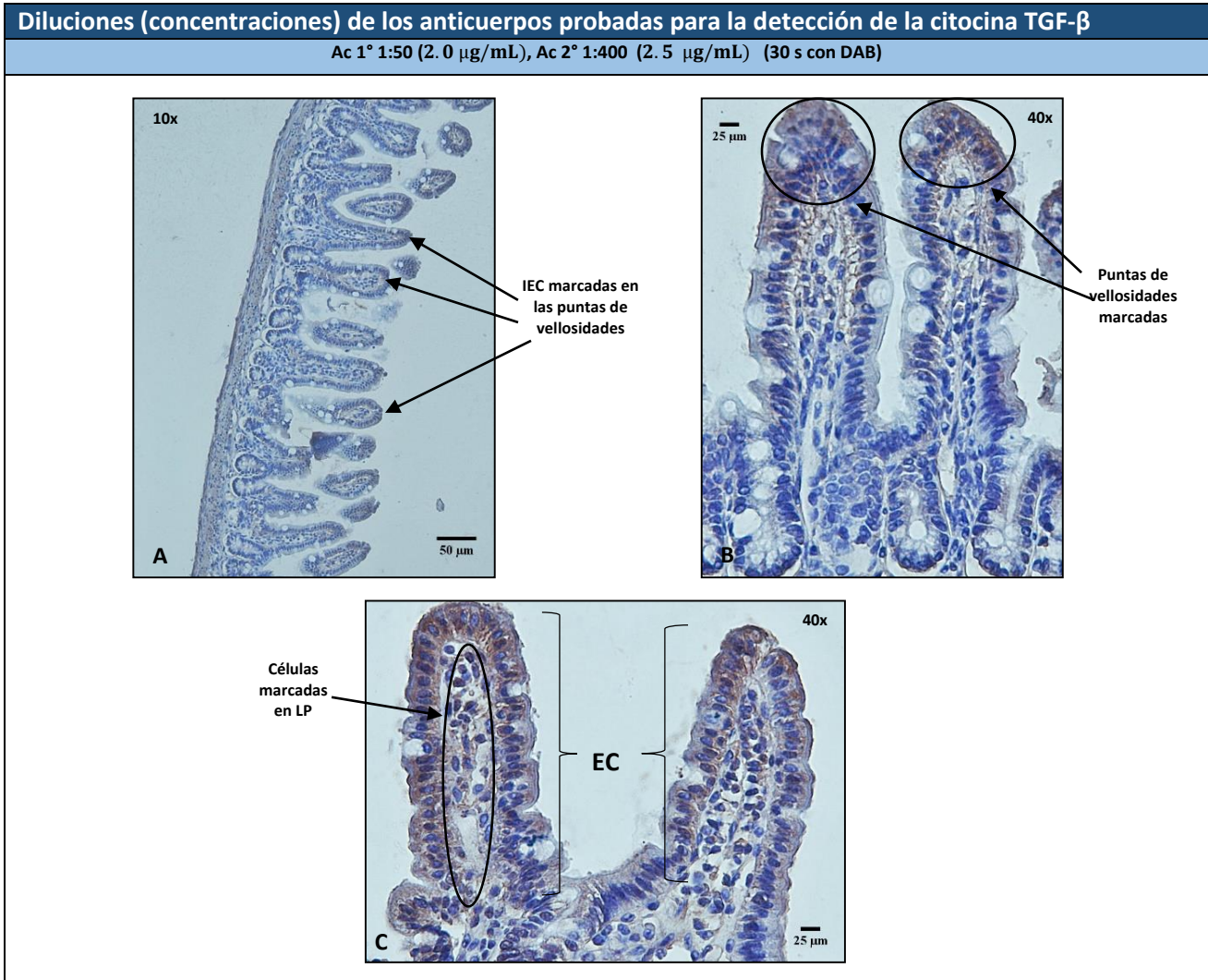


Figura 16. Expresi3n de la citocina TGF- β en cortes de 5 μm de ile3n de rat3n C57BL/6 inmunizado con EAEC. Utilizando la diluci3n de Ac 1° 1:50 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Ac 2° 1:400 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Observamos un claro marcaje de las c3lulas positivas a TGF- β , tales como en los enterocitos y algunas c3lulas de la l3mina propia de las vellosidades (A, B y C).

3.- Evaluar y comparar la expresión de APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con *C.rodentium* o con EAEC y controles (Solución Salina).

A.- Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en cortes de 5 µm del íleon de un ratón al que se le administro solución salina (Control) que fue sacrificado a los cuatro días post inoculación, utilizando las condiciones estandarizadas para APRIL (Ac primario Anti-APRIL 1:50/**10** µg/mL, Ac secundario 1:50/**16** µg/mL y 30 s de DAB) para esto utilizamos el bloque de parafina con el No. 374.

Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:50 (**16** µg/mL)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de APRIL.

Como se muestra en la Figura 17 no se observó marcaje con el anticuerpo Anti-APRIL en la Placa de Peyer (D.1-2) ni tampoco en las vellosidades (D.3) ni en ninguna célula. En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo, confirmando que la técnica no presenta marcaje inespecífico. Cabe mencionar que al mismo tiempo que corrimos este experimento se realizó el marcaje de tejidos de animales inoculados con los patógenos en los cuales si se observó marcaje. (Figuras 18 y 20)

Expresión de la citocina APRIL en tejidos control (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con solución salina)

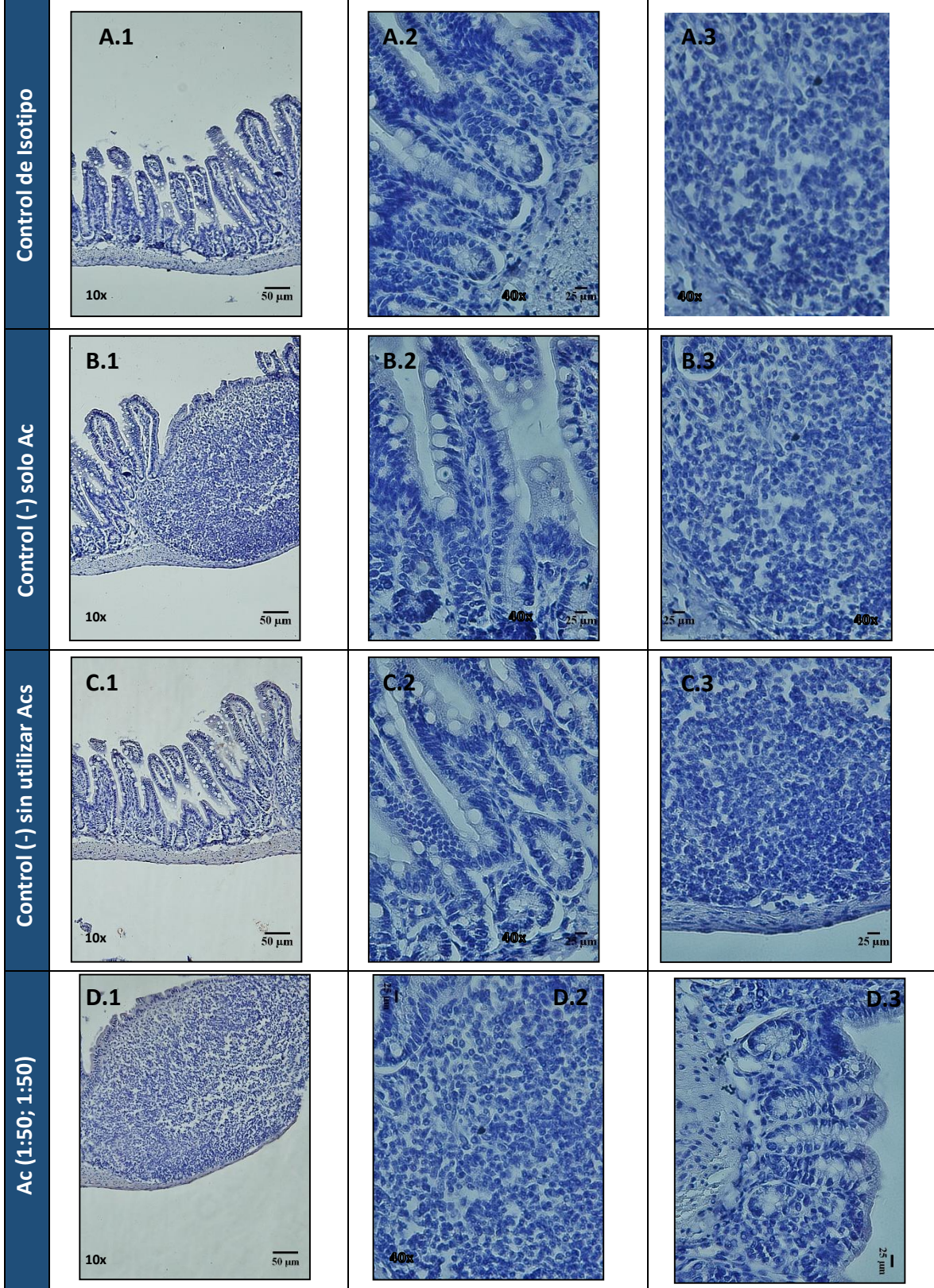


Figura 17. Microfotografías de cortes de íleon (5 μm), con Ac Anti-APRIL, de un ratón C57BL/6 al que se le administró solución salina, sacrificado al cuarto día post administración. En esta figura se observan las

imágenes que corresponden a el control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles del ensayo no se observa la detección de la citocina APRIL. Los tejidos de las imágenes (D.1-3) fueron tratados con el Ac primario y secundario contra APRIL pero no se detectó la expresión de la citocina APRIL en la placa de Peyer, en la lámina propia o en los enterocitos.

B.- Evaluar la expresión de APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con *C.rodentium*.

B.1.-Evaluación de la expresión de APRIL en cortes de íleon de 5µm de un ratón C57BL/6 que fue inoculado con 5X10⁸ UFC de *C.rodentium* sacrificado a los 4 días post inoculación, utilizando el bloque No. 1905 y las concentraciones estandarizadas en este proyecto (Ac primario 1:50/10 µg/mL, Ac secundario 1:50 16 µg/mL y DAB 30 s).

Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:50 (**16 µg/mL**)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de APRIL.

En la Figura 18, se observa la expresión de la citocina APRIL tanto en las vellosidades como en la placa de Peyer. Encontramos una alta expresión de la citocina en la placa de Peyer, principalmente en el citoplasma de las células en la zona inferior (zona de linfocitos T) y en el domo subepitelial (D.1-2), mientras que en las vellosidades se muestra células en cuyo citoplasma se expresa APRIL incluyendo células en la lámina propia, en las criptas y en las enterocitos (D.3). En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo.

Expresión de la citocina APRIL en tejidos infectados (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con *C. rodentium*)

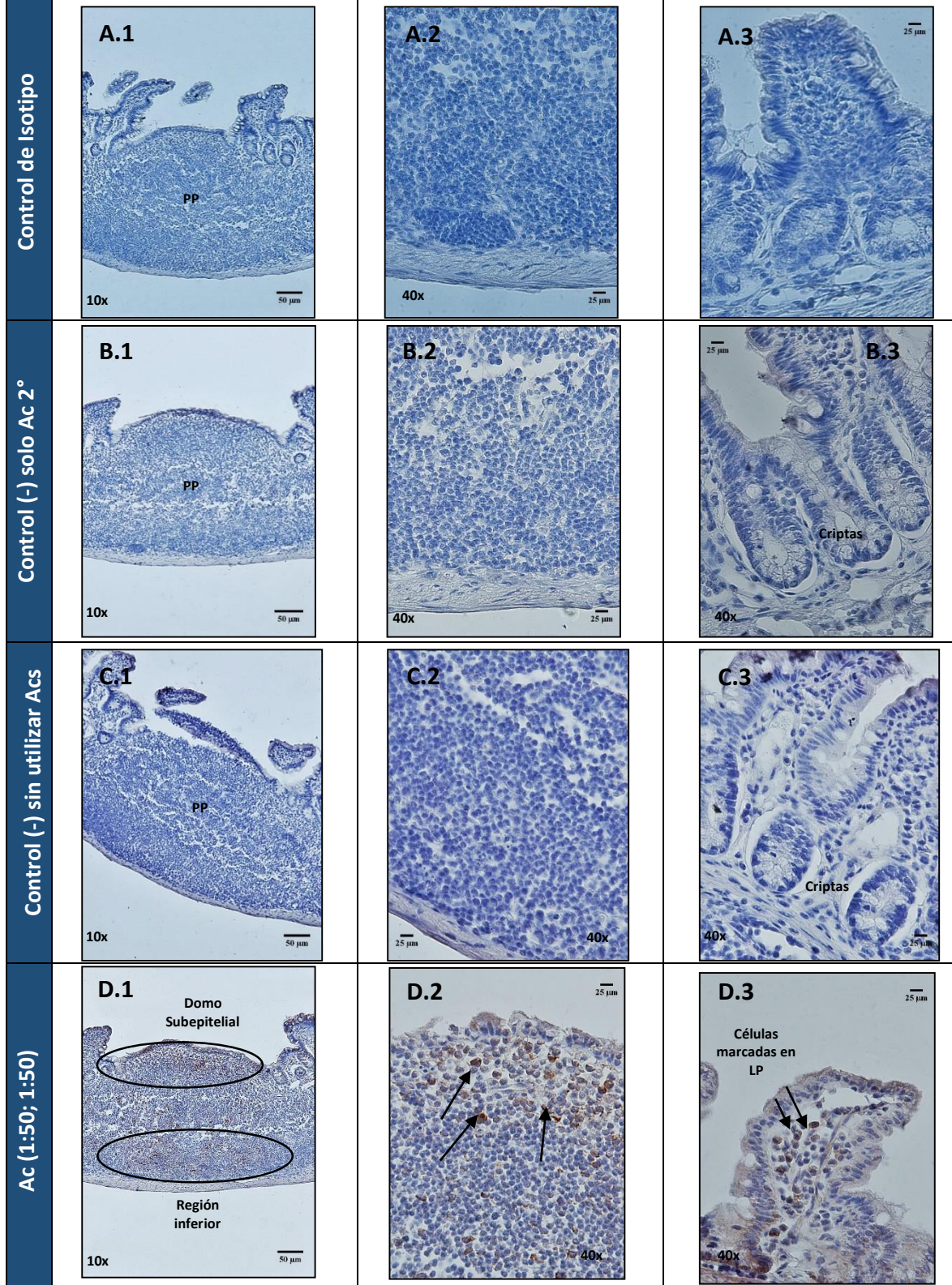


Figura 18. Microfotografías de cortes de íleon (5 μm) de un ratón C57BL/6 inoculado con *C. rodentium* y Ac Anti-APRIL. En esta figura se observan las imágenes que corresponden al control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar los Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles utilizados no

se observa marcaje. Como se muestra en las imágenes (D.1-3) se observan células marcadas con el anticuerpo Anti-APRIL en citoplasma tanto de las células del domo subepitelial como de la región inferior de la Placa de Peyer (D.1-2), así como en el citoplasma de las células de la lámina propia y de los enterocitos de las vellosidades (D.3).

B.2.- Comparar la expresión de APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con *C. rodentium* y controles (Solución Salina).

Como ya se mencionó las inmunohistoquímicas se realizaron seriadas es decir al mismo tiempo se evaluó la presencia de APRIL en los tejidos de los ratones a los que se administró solución salina e inoculados con *C. rodentium* ambos sacrificados a los cuatro días posteriores a las administraciones de solución salina y *C. rodentium*. En la figura 19 se muestra la comparación del marcaje con APRIL de los tejidos del íleon de ratones que se les administró solución salina e infectado con *C. rodentium*, como ya se mencionó no se observó marcaje en los animales con solución salina, mientras claramente se ven teñidos en color café el citoplasma de las células de la LP (Figura 19 B3) así como células en el domo de la placa de Peyer de los tejidos infectados con *C.rodentium* (Figura 19 B1-2).

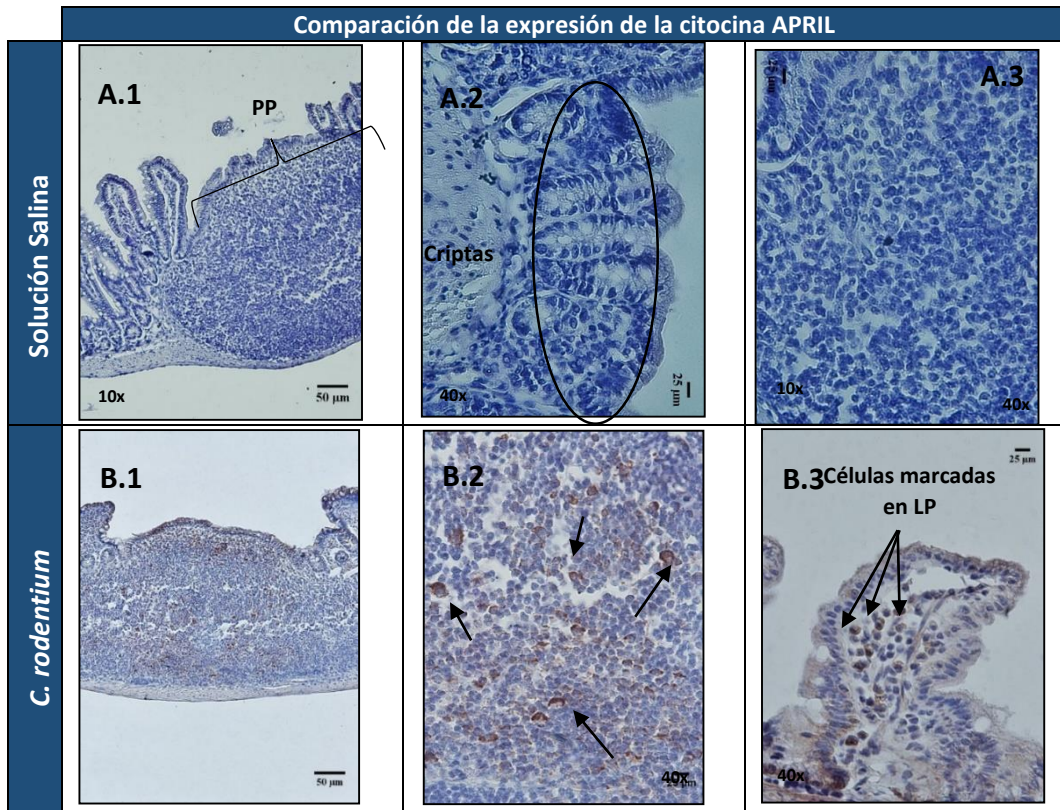


Figura 19. Comparación de la expresión de la citocina APRIL en cortes del íleon de ratones C57BL/6 controles e inmunizados con *C. rodentium*. Los inmunoensayos se realizaron en serie y bajo las mismas condiciones. En las imágenes A.1, A.2 y A.3 se observan los cortes correspondientes al íleon de un ratón control, en los cuales no se observa la expresión de la citocina APRIL en ninguno de los tejidos evaluados (vellosidades y Placa de Peyer). En contraste en las imágenes B.1, B.2 y B.3 se observan los cortes correspondiente al íleon de un ratón inmunizado con *C. rodentium*, en los cuales se

observa la expresión de la citocina APRIL en citoplasma de las células de la lámina propia (LP) de algunas vellosidades y en la placa de Peyer, principalmente en el domo subepitelial y en la zona inferior.

C.- Evaluar la expresión de APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con EAEC.

C.1.-Evaluación de la expresión de APRIL en cortes de íleon de 5µm de un ratón C57BL/6 que fue inoculado con 9.5×10^9 UFC de EAEC sacrificado a los 4 días post inoculación, utilizando el bloque No. A11 y las concentraciones estandarizadas en este proyecto (Ac primario 1:50/10 µg/mL, Ac secundario 1:50/16 µg/mL y DAB 30 s). Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:50 (**16** µg/mL)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de APRIL.

En la Figura 20, se observa la expresión de la citocina APRIL tanto en la placa de Peyer como en las vellosidades. Encontramos una alta expresión de la citocina en la placa de Peyer, principalmente en el citoplasma de las células en la zona intrafolicular y en menor proporción en el domo subepitelial (D.1-3), mientras que en las vellosidades se muestra células en cuyo citoplasma se expresa APRIL incluyendo células en las criptas y en las enterocitos (D.1). En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo.

En los cortes de íleon del ratón infectado con EAEC, se observó una disminución notable en la expresión de APRIL en comparación con los cortes de íleon del ratón infectados con *C.rodentium*. La expresión de APRIL en los cortes histológicos de íleon de ratón infectado con EAEC se observó en la misma zona del domo subepitelial de la placa de Peyer al igual que en los cortes de los ratones infectados con *C. rodentium*, sin embargo con una menor intensidad (es decir un color café más claro), también en los cortes histológicos de íleon de ratón infectado con EAEC se observaron zonas intrafoliculares en donde observamos mayor expresión de APRIL en comparación a la zona del domo subepitelial. En las vellosidades se observó la expresión de la citocina APRIL en las células epiteliales al igual que en los cortes con *C. rodentium* pero también con una menor intensidad. Y en la lámina propia no se ve una señal clara a comparación con *C. rodentium* en donde hay varias células que expresan la citocina.

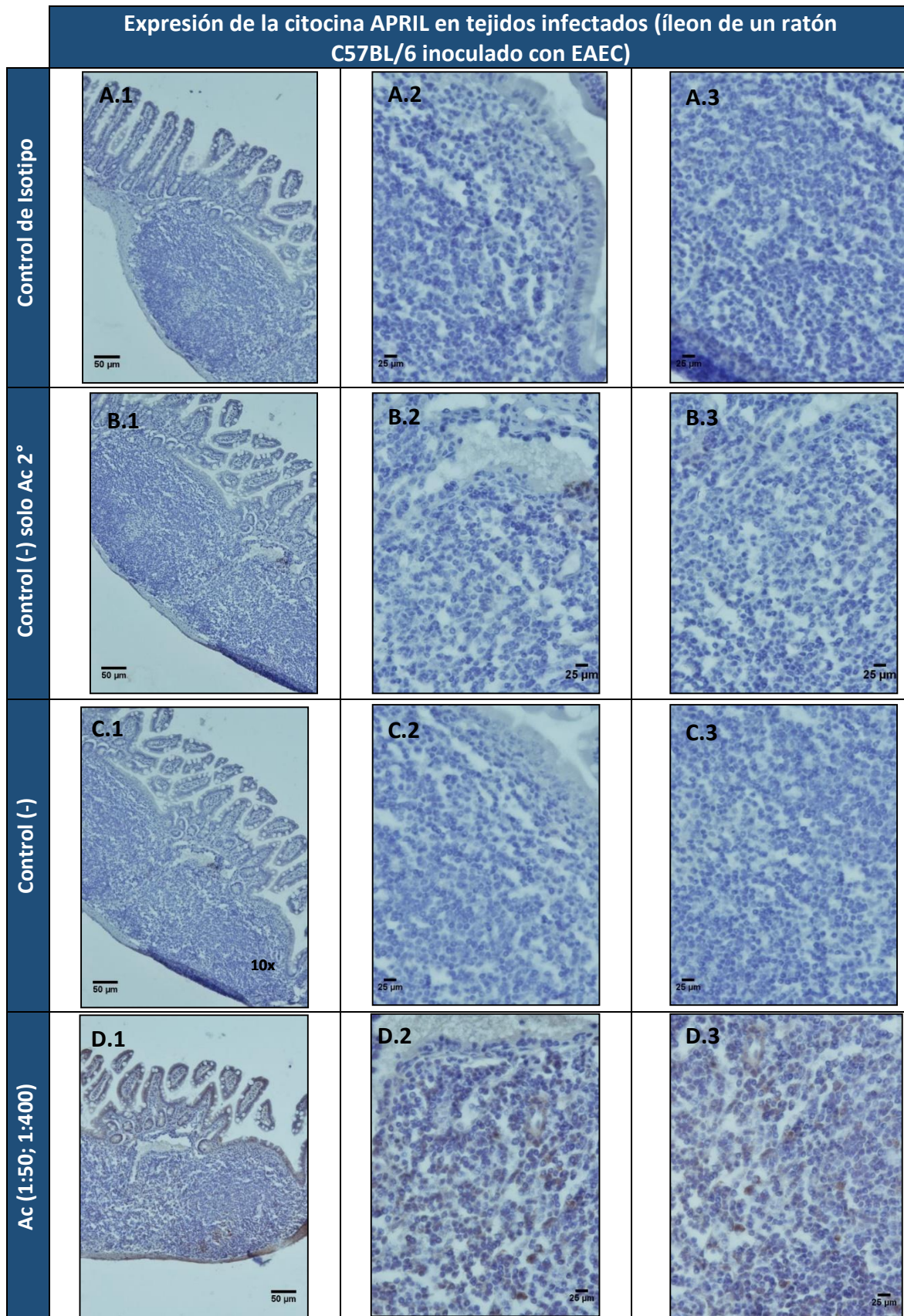


Figura 20. Microfotografías de cortes de íleon (5 µm) de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC, que se les realizó una inmunohistoquímica con Ac contra APRIL. En esta figura se observan las imágenes que corresponden a el control de isotipo

(A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles utilizados no se observa la detección de la citocina APRIL. Como se muestra en las imágenes (D.1-3) se observan células marcadas con el anticuerpo Anti-APRIL principalmente en la zona intrafolicular de la Placa de Peyer (D.1-3), al igual que en los enterocitos de las vellosidades (D.1).

C.2.- Comparar la expresión de APRIL *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con EAEC y controles (Solución Salina)

Como ya se mencionó las inmunohistoquímicas se realizaron seriadas es decir al mismo tiempo se evaluó la presencia de APRIL en los tejidos de los ratones a los que se administró solución salina e inoculados con EAEC ambos sacrificados a los cuatro días posteriores a las administraciones de solución salina y EAEC. En la Figura 21 se muestra la comparación del marcaje con APRIL de los tejidos del íleon de ratones administrados con solución salina e infectado con EAEC como ya se mencionó no se observó marcaje en los animales con solución salina, mientras claramente se ven teñidos en color café el citoplasma de las células de la LP principalmente (Figura 21 B1-3 B3) así como células en el domo de la placa de Peyer de los tejidos infectados con EAEC (Figura 21 B1) y por último en las criptas y en los enterocitos de las vellosidades.

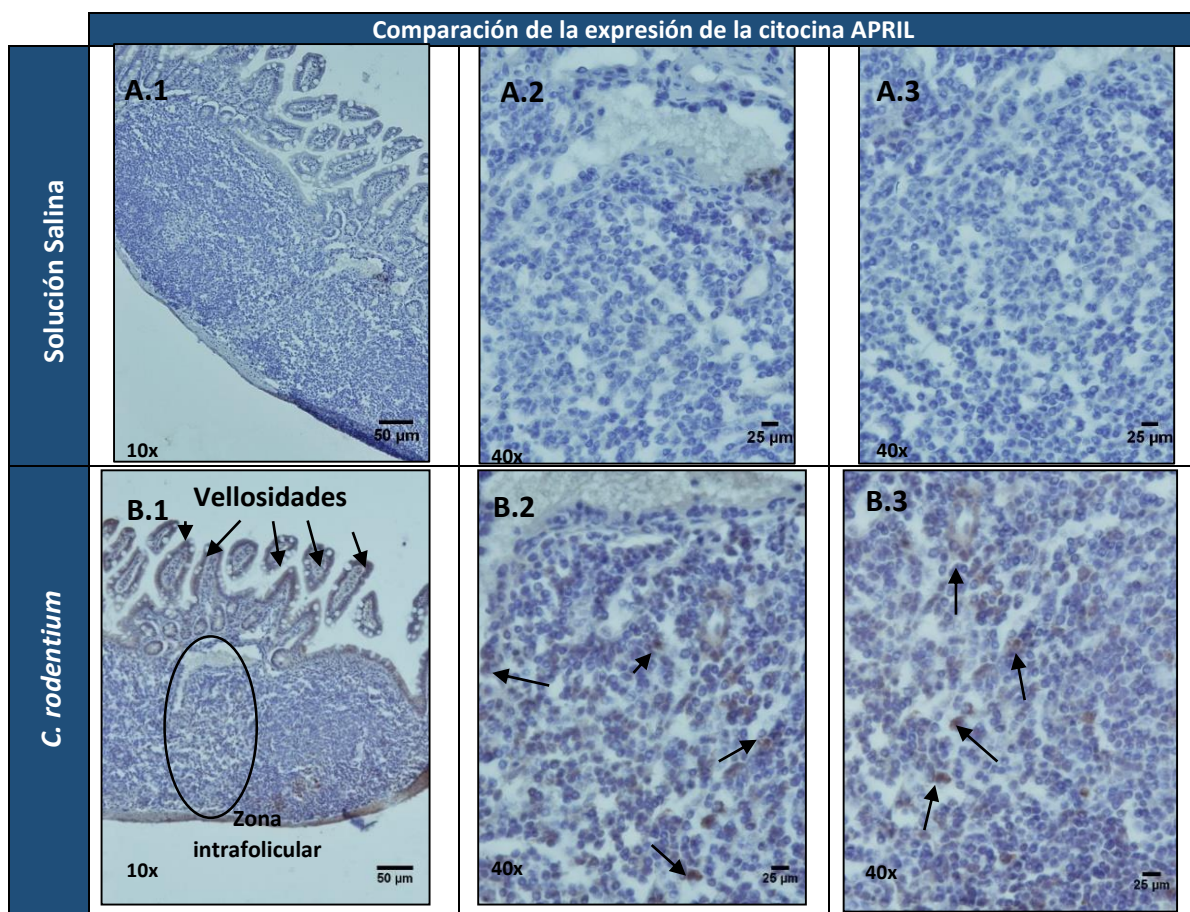


Figura 21. Comparación de la expresión de la citocina APRIL en cortes del íleon de ratones C57BL/6 controles e inmunizados con EAEC. Los inmunoensayos se realizaron en serie y bajo las mismas condiciones. En las imágenes A.1, A.2 y A.3 se observan los cortes correspondientes al íleon de un ratón control, en los cuales no se observa la expresión de la citocina APRIL en ninguno de los tejidos evaluados (vellosidades y Placa de Peyer). En contraste en las imágenes B.1, B.2 y B.3 se observan los cortes correspondiente al íleon de un ratón inmunizado con EAEC, en los cuales se observa la expresión de la citocina APRIL en citoplasma de las células en la placa de Peyer, principalmente en la zona intrafolicular y en menor proporción en el domo subepitelial, también se observan células marcadas en las criptas y enterocitos de algunas vellosidades.

3.1.- Identificar las células productoras de APRIL en íleon de ratones C57BL/6 inoculados con EAEC.

Junto con el ensayo inmunohistoquímico de la expresión de la citocina APRIL en el íleon de un ratón C57BL/6 inoculados con EAEC, se realizó a la par un ensayo inmunohistoquímico para la expresión del marcador de macrófagos F4/80 utilizando cortes histológicos seriados del mismo bloque de parafina utilizados en los ensayos inmunohistoquímicos de la expresión de la citocina APRIL. Este experimento se realizó con el objetivo de identificar los macrófagos que están expresando a APRIL. Figura 22

En la expresión de F4/80 en cortes del íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC. Se utilizó una dilución del Ac primario de 1:50 (**10** µg/mL) y de Ac secundario 1:50(**16** µg/mL).

Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:50 (**16** µg/mL)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de APRIL.

Expresión de F4/80 en tejidos infectados (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC)

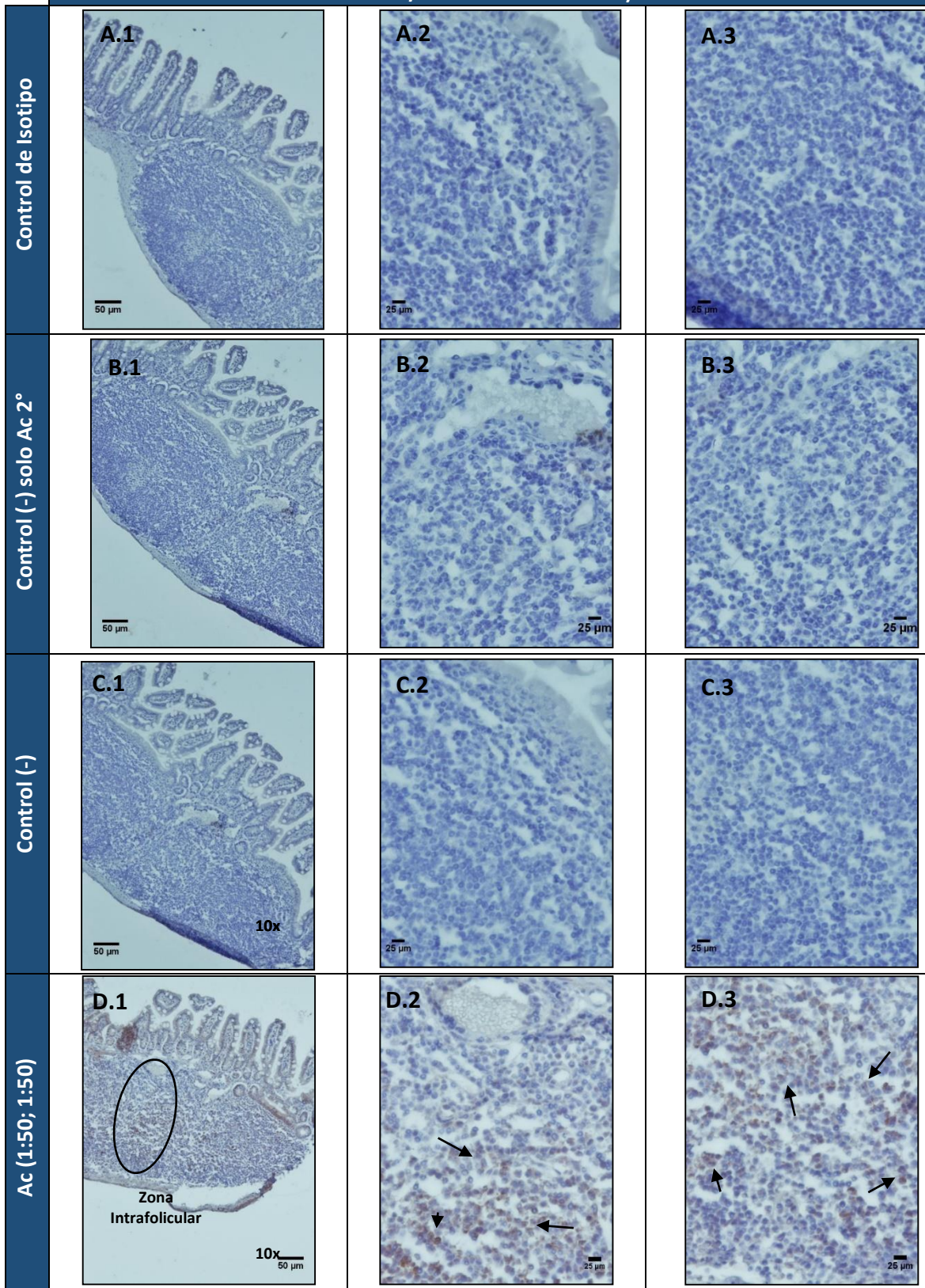


Figura 22. Microfotografías de cortes de íleon (5 μm) de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC, que se les realizó una inmunohistoquímica para identificar a F4/80. En esta figura se observan las imágenes que corresponden a el control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles utilizados no se observa la detección de F4/80. Como se muestra en las imágenes (D.1-3) se observan células marcadas con Anti-F4/80 principalmente en la zona intrafolicular de la Placa de Peyer (D.1-3).

Posteriormente para visualizar de una mejor manera e identificar los macrófagos que están expresando a APRIL, se realizó la Figura 23 en la cual se compara la expresión de F4/80 y la de APRIL en los mismos campos, para después realizar un conteo de macrófagos que están expresando a APRIL en esos tejidos infectados por EAEC.

Tabla comparativa de la expresión de la citocinas APRIL, del marcador de macrófagos F4/80 en tejido infectado y sus respectivos controles (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC)

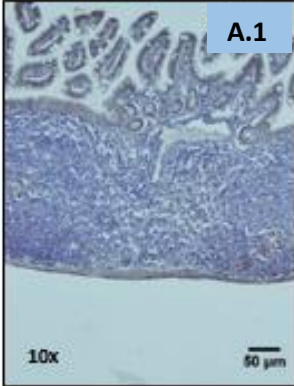
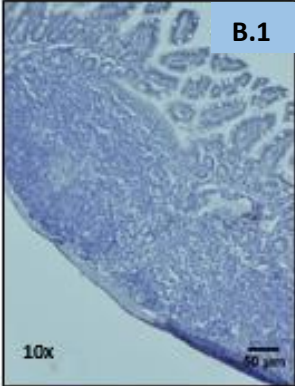
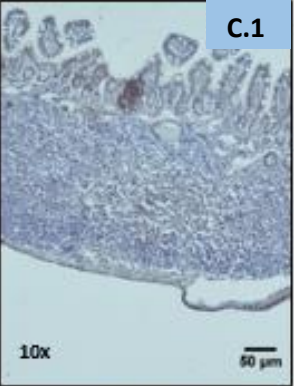
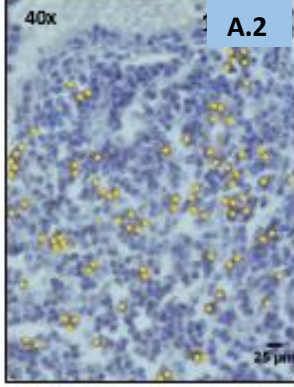
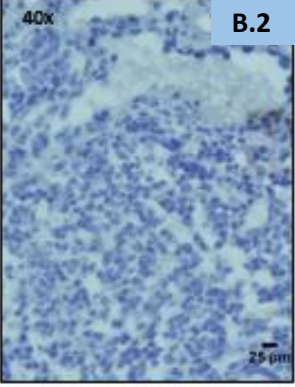
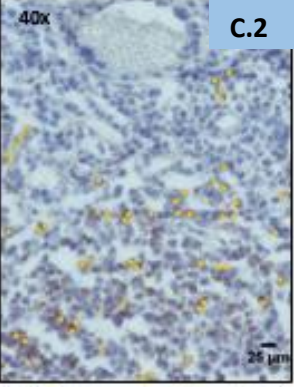
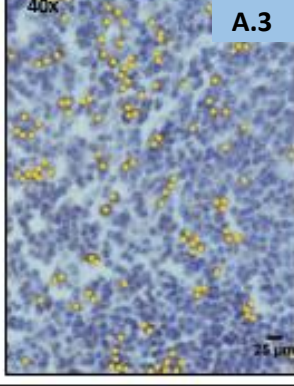
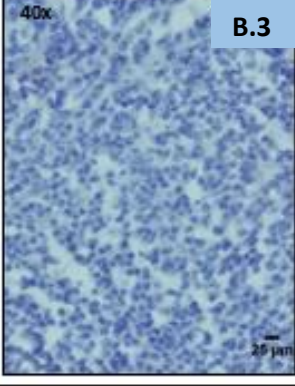
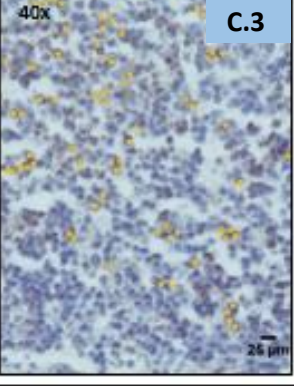
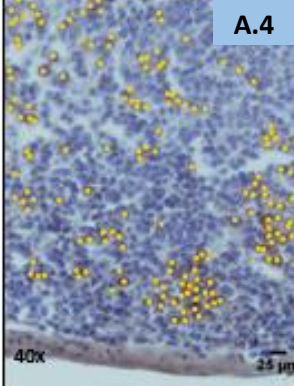
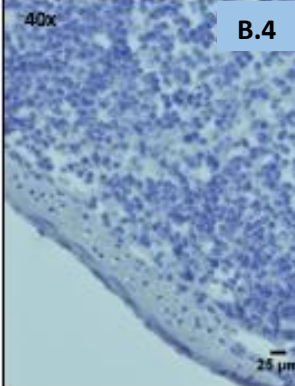
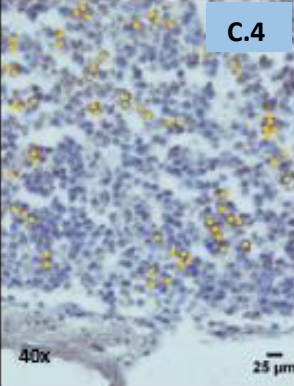
APRIL	CONTROL	F4/80
 <p>A.1 10x 50 µm</p>	 <p>B.1 10x 50 µm</p>	 <p>C.1 10x 50 µm</p>
 <p>A.2 40x 25 µm</p>	 <p>B.2 40x 25 µm</p>	 <p>C.2 40x 25 µm</p>
 <p>A.3 40x 25 µm</p>	 <p>B.3 40x 25 µm</p>	 <p>C.3 40x 25 µm</p>
 <p>A.4 40x 25 µm</p>	 <p>B.4 40x 25 µm</p>	 <p>C.4 40x 25 µm</p>

Figura 23. Tabla comparativa de la expresión del marcador de F4/80 (A.1-4) y de APRIL (C.1-4) en cortes de 5 µm de íleon de un ratón C57BL/6 seriados inoculados con EAEC con sus respectivos controles (B.1-4). En las imágenes correspondientes a la expresión de APRIL se observa una mayor cantidad de células marcadas, ya que APRIL puede ser expresada por macrófagos, células dendríticas, células epiteliales y linfocitos. En cuanto a las imágenes correspondientes a F4/80 se observan menor cantidad de células marcadas para F4/80 en comparación con las imágenes de APRIL, aunque son cortes seriados e imágenes de la misma zona, ya que F4/80 es un marcador específico de macrófagos.

Para la comparación de las células marcadas de los ensayos inmunohistoquímicos de APRIL y F4/80 se utilizó el programa ImageJ, con el cual se realizó el conteo de células marcadas en los mismos campos de tejidos seriados de íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC, para poder contar las células marcadas en la zona intrafolicular de la placa de Peyer, ya que esta zona se observa una mayor expresión de F4/80, y determinar si existe una diferencia significativa.

Conteo de células marcadas con el programa ImageJ en la zona intrafolicular

F4/80	
Ac 1° (1:50) y Ac 2° (100)	
PP EAEC	Células
1	50
2	62
3	65
Promedio	59

Tabla 3. Conteo de células positivas para el marcador de macrófagos F4/80

APRIL	
Ac 1° (1:50) y Ac 2° (100)	
PP EAEC	Células
1	85
2	120
3	148
Promedio	117

Tabla 4. Conteo de células positivas para la citocina APRIL

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	59.000	117.667
Varianza	63.000	996.333
Estadístico t	-3.122	
P(T<=t) una cola	0.018	
Valor crítico de t (una cola)	2.132	
P(T<=t) dos colas	0.035	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776	

Tabla 5. Tabla con los valores obtenidos al realizar una T-student con los valores obtenidos de la Tabla 1 y la Tabla 2.

Al realizar el conteo de las células positivas de tres campos y realizar el promedio, se obtuvo para F4/80 (promedio= 59) y APRIL (promedio= 117), con estos valores de promedio obtenidos de los inmunoensayos correspondientes se determina que para F4/80 se obtiene un 50.43% de células marcadas, teniendo en cuenta que las células marcadas para APRIL es nuestro 100%. Esto quiere decir que en esta zona de la placa de Peyer (zona intrafolicular) la expresión de APRIL se lleva a cabo en 50% por macrófagos y el otro 50% es expresado por otras células del sistema inmune (linfocitos, células dendríticas).

Al realizar un prueba t-student con los datos de la tabla 1 y 2 se observa que el estadístico t es mayor tanto para el valor crítico t de una cola y de dos colas, también que P a una cola y a dos colas es menor a 0.05. Por lo tanto se rechaza la hipótesis de igualdad de las medias, por lo cual la diferencia observada es estadísticamente significativa.

4.-Evaluar y comparar la expresión de TGF- β *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con *C.rodentium* o con EAEC y controles (Solución Salina).

A.- Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en cortes de 5 μ m del íleon de dos ratones a los que se les administro solución salina (Control), fueron sacrificados a los cuatro días post inoculación, utilizando las condiciones estandarizadas para TGF- β (Ac primario Anti- TGF- β 1:50/2 μ g/mL, Ac secundario 1:400/2.5 μ g/mL y 30 s de DAB) para esto utilizamos los bloques de parafina con los No. 1898 y 334.

A.1- Para el bloque con el número 1898, se utilizaron también estos cortes para realizar el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:400 (2.5 μ g/mL)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de TGF- β .

Como se muestra en la Figura 24 no se observó marcaje con el anticuerpo Anti-TGF- β en la Placa de Peyer (D.1-2) ni tampoco en las vellosidades (D.3) ni en ninguna célula. En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo, confirmando que la técnica no presenta marcaje inespecífico. Cabe mencionar que al mismo tiempo que corrimos este experimento se realizó el marcaje de tejidos de animales inoculados con *C.rodentium* en los cuales si se observó marcaje. Figura 26.

Expresión de la citocina TGF- β en tejidos control (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con solución salina)

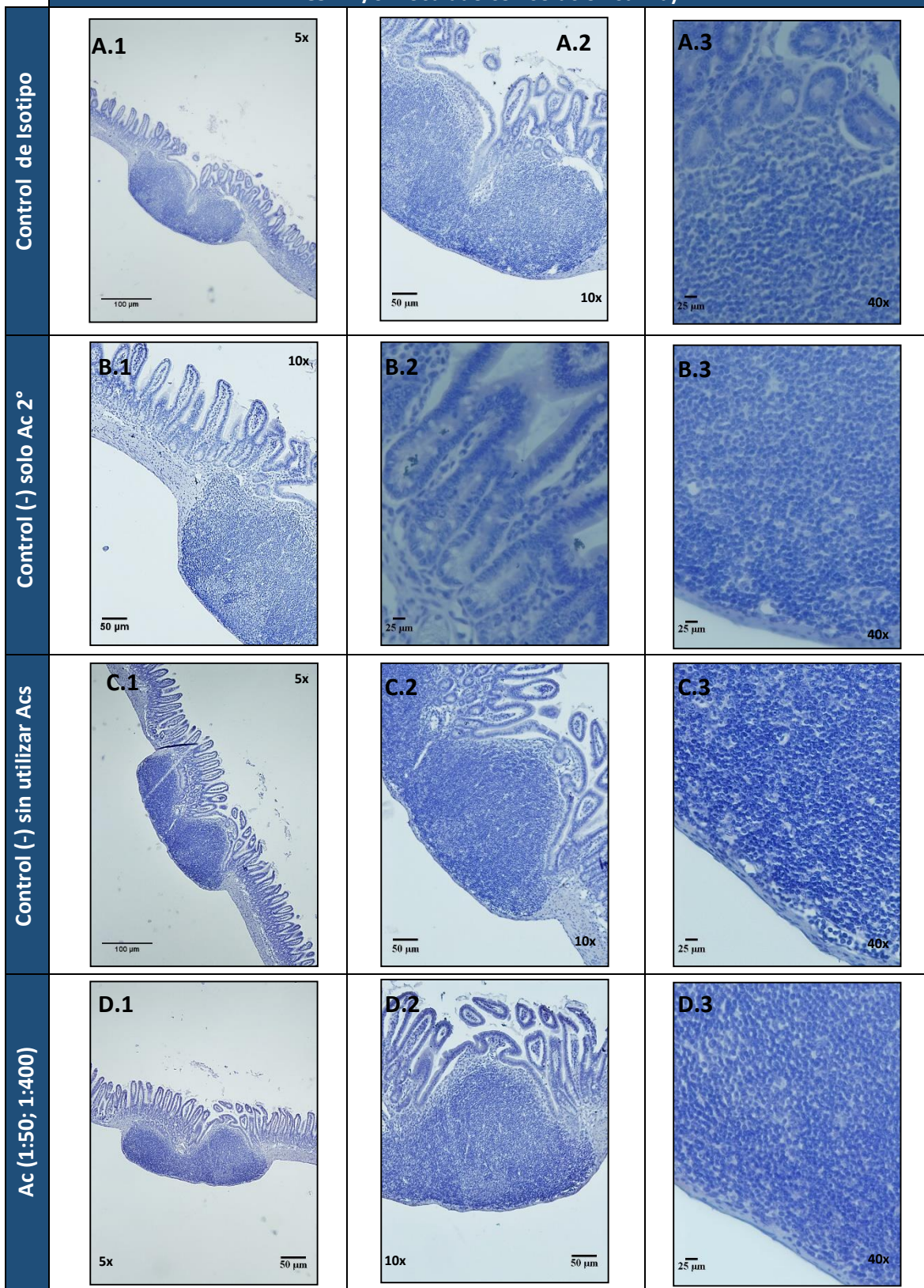


Figura 24. Microfotografías de cortes de íleon (5 µm), con Ac Anti-TGF-β, de un ratón C57BL/6 al que se le administró solución salina, sacrificado al cuarto día post administración. En esta figura se observan las imágenes que corresponden a el control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles del ensayo no se observa la detección de la citocina TGF-β. Los tejidos de las imágenes (D.1-3) fueron tratados con el Ac primario y secundario contra TGF-β pero no se detectó la expresión de la citocina TGF-β en la placa de Peyer, en la lámina propia o en los enterocitos.

A.2.- Para el bloque con el número 334, se utilizaron también estos cortes para realizar el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-APRIL), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:400 (2.5 µg/mL)) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de TGF-β.

Como se muestra en la Figura 25 no se observó marcaje con el anticuerpo Anti-TGF-β en las criptas, ni en enterocitos y tampoco en la lámina propia de las vellosidades (D.1-3) ni en ninguna célula. En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna zona del íleon utilizadas en este ensayo, confirmando que la técnica no presenta marcaje inespecífico. Cabe mencionar que al mismo tiempo que corrimos este experimento se realizó el marcaje de tejidos de animales inoculados con EAEC en los cuales si se observó marcaje. Figura 28.

Expresión de la citocina TGF- β en tejidos control (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con solución salina)

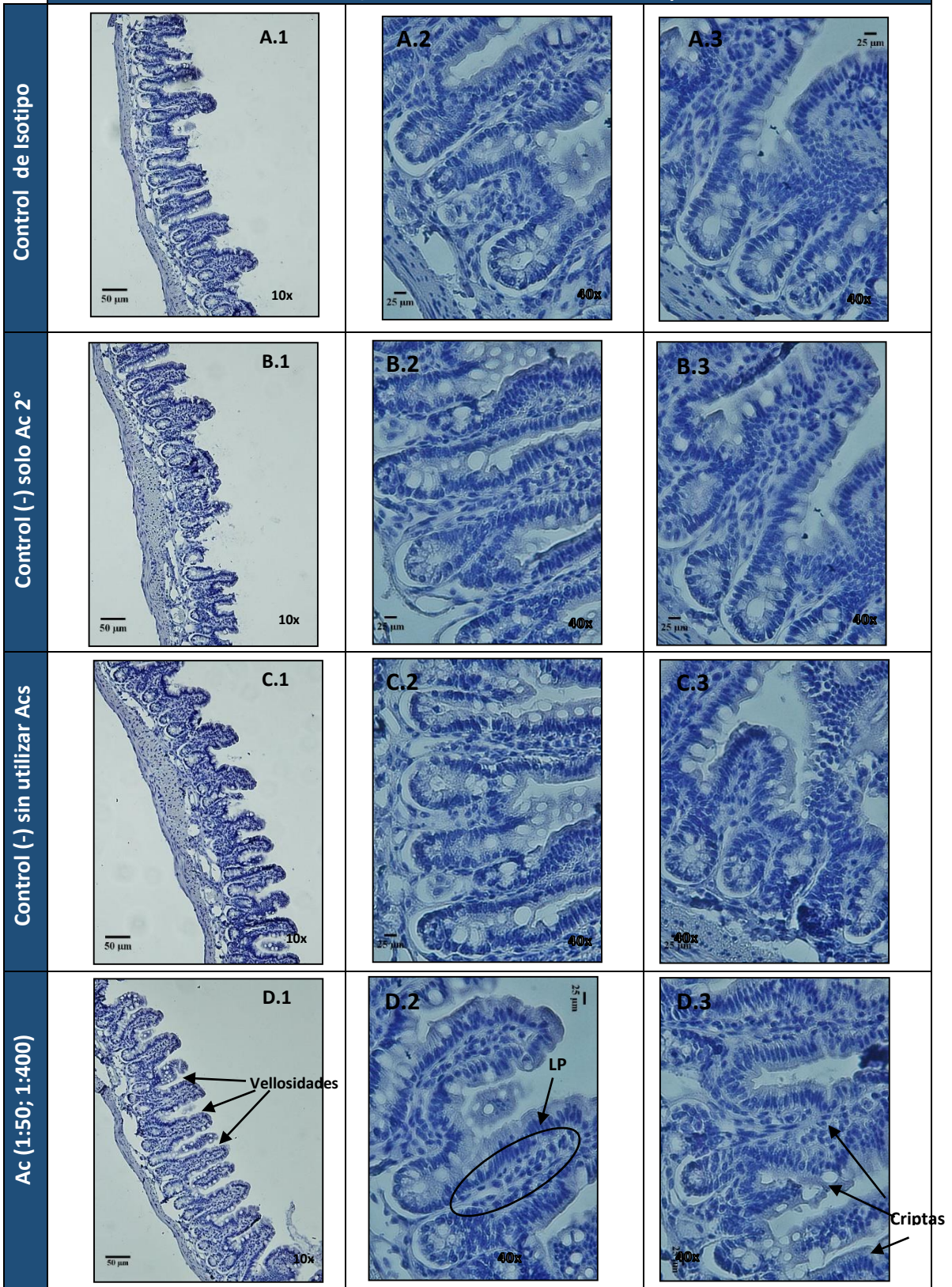


Figura 25. Microfotografías de cortes de íleon (5 μm), con Ac Anti-TGF- β , de un ratón C57BL/6 al que se le administró solución salina, sacrificado al cuarto día post administración. En esta figura se observan las imágenes que corresponden a el control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles del ensayo no se observa la detección de la citocina TGF- β . Los tejidos de las imágenes (D.1-3) fueron tratados con el Ac primario y secundario contra TGF- β pero no se detectó la expresión de la citocina TGF- β en las criptas, ni en los enterocitos y tampoco en la lámina propia de las vellosidades.

B.- Evaluar la expresión de TGF- β *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con *C.rodentium*.

B.1.-Evaluación de la expresión de TGF- β en cortes de íleon de 5 μm de un ratón C57BL/6 que fue inoculado con 5×10^8 UFC de *C. rodentium* sacrificado a los 4 días post inoculación, utilizando el bloque No. 1912 y las concentraciones estandarizadas en este proyecto (Ac primario 1:50/2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Ac secundario 1:400 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y DAB 30 s).

Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-TGF- β), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:400 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de TGF- β .

En la Figura 26, se observa la expresión de la citocina TGF- β tanto en las puntas de las vellosidades como en la placa de Peyer. Encontramos una alta expresión de la citocina en la placa de Peyer, principalmente en el citoplasma de las células del domo subepitelial (D.1-2), mientras que en las vellosidades se muestra células en cuyo citoplasma se expresa TGF- β incluyendo células en las criptas y en los enterocitos de las puntas (D.3). En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo.

Expresión de la citocina TGF- β en tejidos infectados (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con *C. rodentium*)

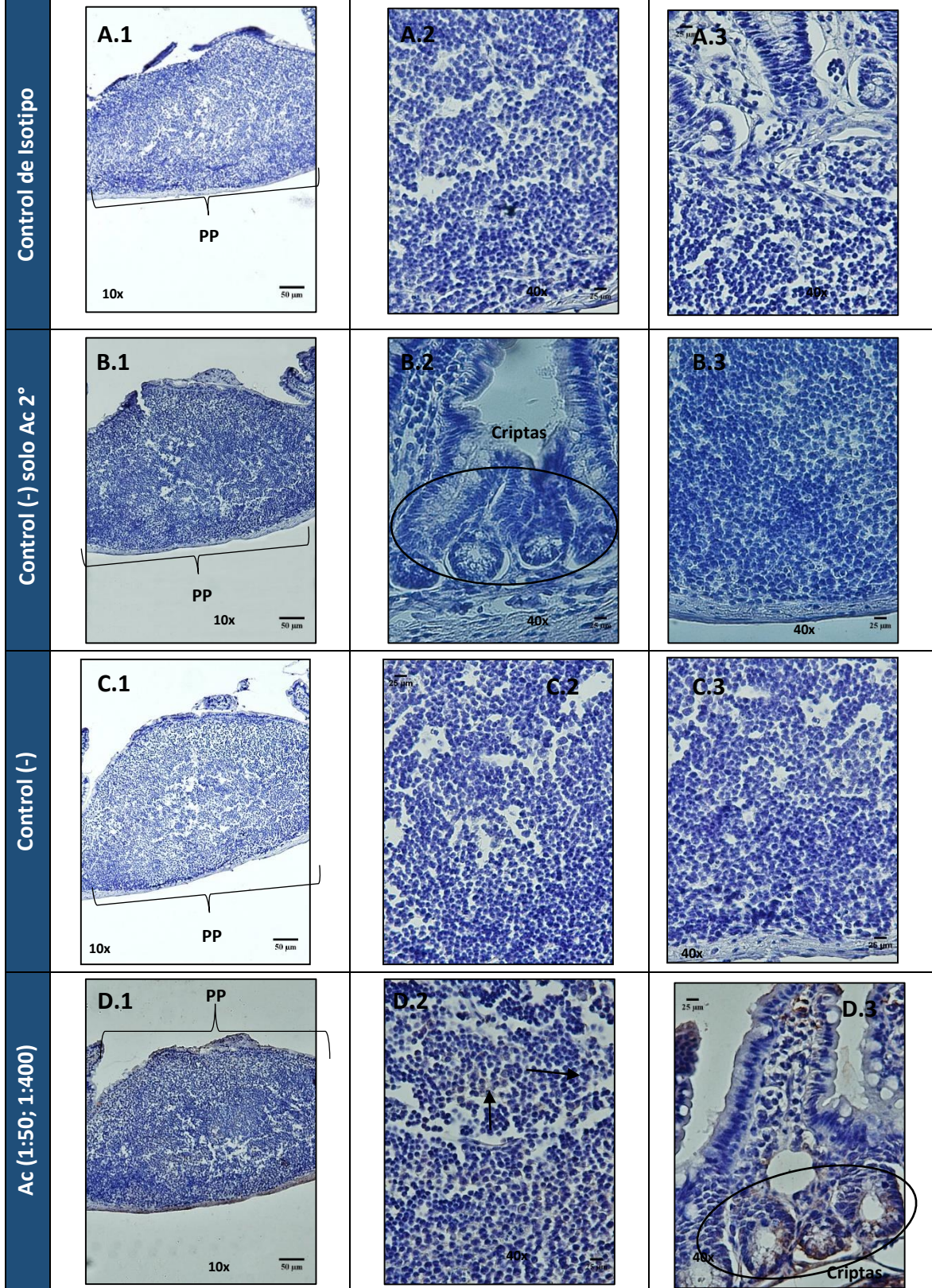


Figura 26. . Microfotografías de cortes de íleon (5 μ m) de un ratón C57BL/6 inoculado con *C. rodentium* y Ac Anti- TGF- β . En esta figura se observan las imágenes que corresponden al control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac

secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar los Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles utilizados no se observa marcaje. Como se muestra en las imágenes (D.1-3) se observan células marcadas con el anticuerpo Anti- TGF- β en citoplasma de las células del domo subepitelial (D.1-2), así como en el citoplasma de las células de las criptas y de los enterocitos que se encuentran en las puntas de las vellosidades (D.3).

B.1.- Comparar la expresión de TGF- β in vivo e in situ en cortes del íleon de ratones infectados con *C.rodentium* y controles (Solución Salina)

Como ya se mencionó las inmunohistoquímicas se realizaron seriadas es decir al mismo tiempo se evaluó la presencia de TGF- β en los tejidos de los ratones a los que se administró solución salina e inoculados con *C. rodentium* ambos sacrificados a los cuatro días posteriores a las administraciones de solución salina y *C.rodentium*. En la figura 27 se muestra la comparación del marcaje con TGF- β de los tejidos del íleon de ratones administrados con solución salina e infectado con *C.rodentium*, como ya se mencionó no se observó marcaje en los animales administrados con solución salina, mientras claramente se ven teñidos en color café el citoplasma de las células de las criptas, también en los enterocitos de las puntas de las vellosidades (Figura 27 B.2-3) así como células en el domo de la placa de Peyer de los tejidos infectados con *C. rodentium* (Figura 27 B1-2).

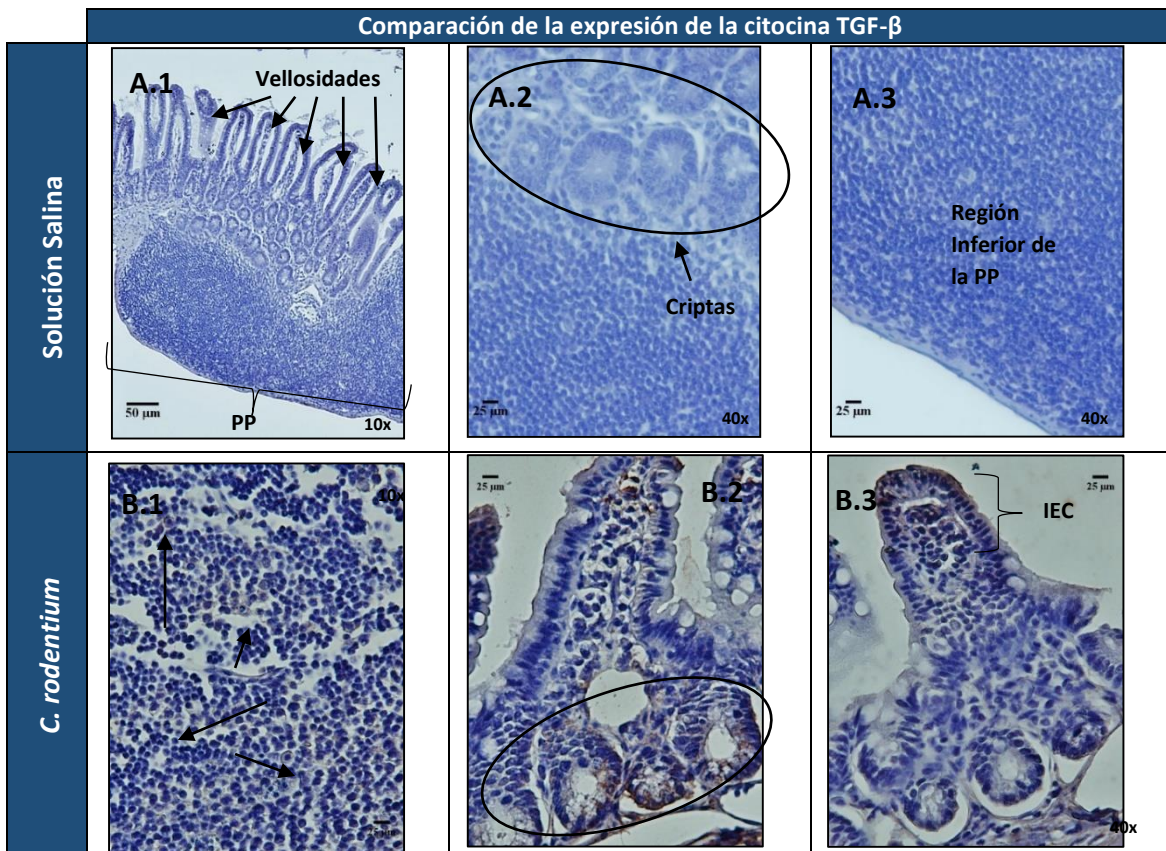


Figura 27. Comparación de la expresión de la citocina TGF- β en cortes del íleon de ratones C57BL/6 controles e inmunizados con *C.rodentium*. Los inmunoensayos se realizaron en serie y bajo las mismas condiciones. En las imágenes A.1-3 se observan los cortes correspondientes al íleon de un ratón control, en los cuales no se observa la expresión de la citocina APRIL en ninguno de los tejidos evaluados (vellosidades y Placa de Peyer). En contraste en las imágenes B.1-3 se observan los cortes correspondiente al íleon de un ratón inmunizado con *C.rodentium*, en los cuales se observa la expresión de la citocina TGF- β en citoplasma de las células de las criptas, también en los enterocitos de algunas vellosidades y en la placa de Peyer, principalmente en el domo subepitelial.

C.- Evaluar la expresión de TGF- β *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con EAEC.

Evaluación de la expresión de TGF- β en cortes de íleon de 5 μ m de un ratón C57BL/6 que fue inoculado con 9.5×10^9 UFC de EAEC sacrificado a los 4 días post inoculación, utilizando el bloque No. 388 y las concentraciones estandarizadas en este proyecto (Ac primario 1:50/2.0 μ g/mL, Ac secundario 1:400/2.5 μ g/mL y DAB 30 s).

Utilizando estos cortes también se realizó el control de isotipo (Se utilizó con la misma concentración utilizada para el Ac Anti-TGF- β), control (-) utilizando solo el Ac secundario (Se utilizó usando una dilución 1:400 2.5 μ g/mL) y control (-) sin utilizar Ac (No se utilizó ningún Ac), necesarios para la adecuada estandarización de la técnica y confirmación de que lo que observamos es en efecto el marcaje de TGF- β .

En la Figura 28, se observa la expresión de la citocina TGF- β solo en las vellosidades (criptas, lámina propia y enterocitos) porque en los tejidos utilizados no tenían placas de Peyer. Encontramos una alta expresión de la citocina en las vellosidades ya que se muestra células en cuyo citoplasma se expresa TGF- β incluyendo células en la lámina propia, en las criptas y en las enterocitos (D.1-3). En las microfotografías correspondientes a los controles, no se observa marcaje en ninguna de zonas del íleon utilizadas en este ensayo.

En los tejidos de los ratones infectados con EAEC se observa la expresión de TGF- β a lo largo de las células epiteliales de las vellosidades en comparación con los ratones infectados con *C. rodentium* en los cuales solo se observa exclusivamente en las puntas de las vellosidades. Para la detección de la citocina TGF- β en cortes de íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC, se observó solo la detección de esta citocina en las vellosidades (ya que los tejidos de íleon que fueron incluidos en parafina no tenían placa de Peyer) principalmente en las células epiteliales, criptas (con poca intensidad) y en menor proporción en la lámina propia.

Expresión de la citocina TGF- β en tejidos infectados (íleon de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC)

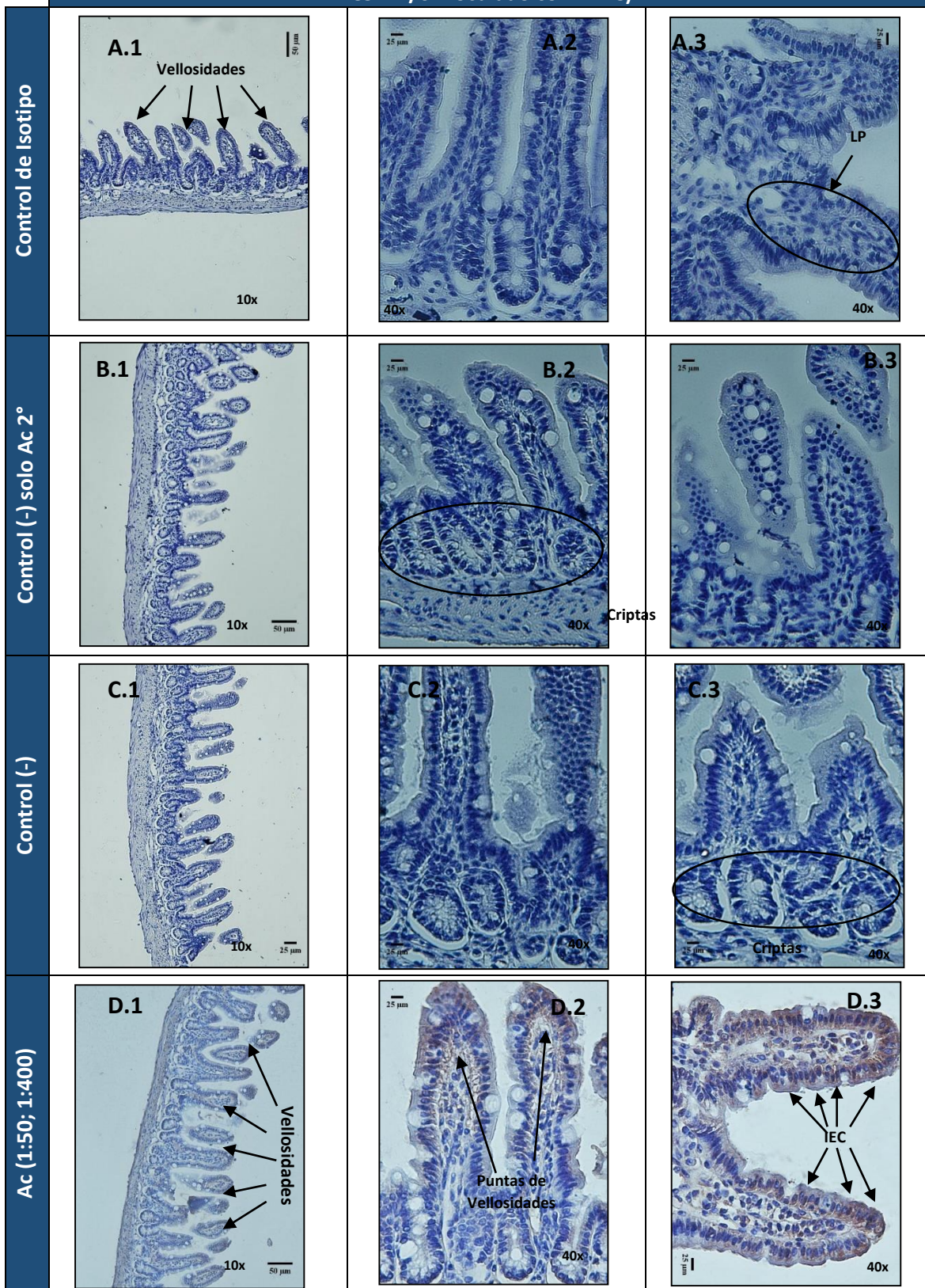


Figura 28. Microfotografías de cortes de íleon (5 μ m) de un ratón C57BL/6 inoculado con EAEC y Ac Anti-TGF- β . En esta figura se observan las imágenes que corresponden al control de isotipo (A.1-3), control (-) utilizando solo el Ac

secundario (B.1-3) y el control (-) sin utilizar los Acs (C.1-3). En las imágenes que corresponden a los controles utilizados no se observa marcaje. Como se muestra en las imágenes (D.1-3) se observan células marcadas con el anticuerpo Anti-TGF- β en de las células de la lámina propia, de las criptas y de los enterocitos de las vellosidades (D.1-3).

C.1- Comparar la expresión de TGF- β *in vivo* e *in situ* en cortes de íleon de ratones infectados con EAEC y controles (Solución Salina)

Como ya se mencionó las inmunohistoquímicas se realizaron seriadas es decir al mismo tiempo se evaluó la presencia de TGF- β en los tejidos de los ratones a los que se administró solución salina e inoculados con EAEC ambos sacrificados a los cuatro días posteriores a las administraciones de solución salina y EAEC. En la Figura 29 se muestra la comparación del marcaje con TGF- β de los tejidos del íleon de ratones administrados con solución salina e infectado con EAEC como ya se mencionó no se observó marcaje en los animales control, mientras claramente se ven teñidos en color café el citoplasma de las células de la LP, así como células de las criptas y también en los enterocitos de los tejidos infectados con *C.rodentium* (Figura 29 B.1-3).

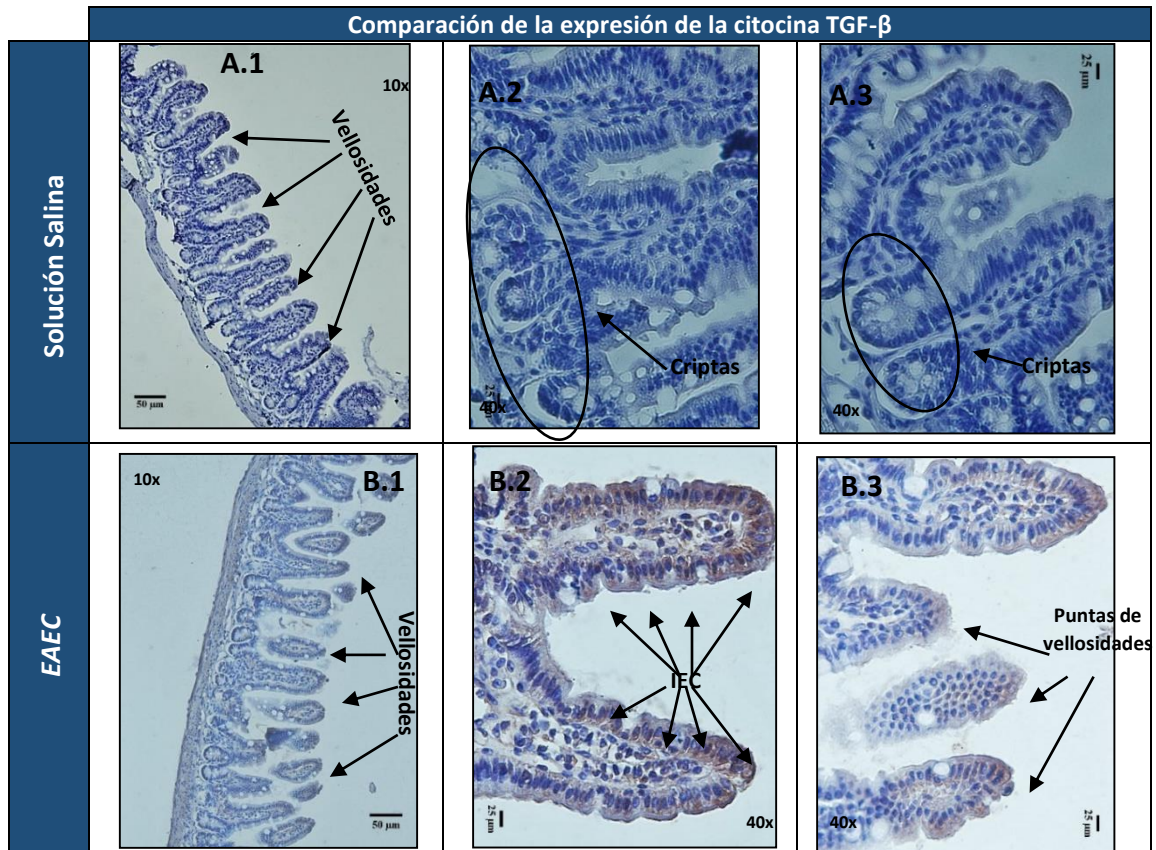


Figura 29. Comparación de la expresión de la citocina TGF- β en cortes del íleon de ratones C57BL/6 controles e inmunizados con EAEC. Los inmunoensayos se realizaron en serie y bajo las mismas condiciones. En las imágenes A.1-3 se observan los cortes correspondientes al íleon de un ratón control, en los cuales no se observa la expresión de la citocina TGF- β en ninguno de los tejidos evaluados (vellosidades). En contraste en las imágenes B.1-3 se observan los cortes correspondientes al íleon de un ratón inmunizado con EAEC, en los cuales se observa la expresión de la citocina TGF- β en citoplasma de las células de la lámina propia (LP), en las criptas y en los enterocitos de las vellosidades.

Discusión

Existen pocos estudios que evalúen las citocinas *in vivo* e *in situ* contra patógenos entéricos no invasores. En este trabajo evaluamos la expresión *in situ* de las citocinas APRIL y TGF- β ante una estimulación bacteriana. La expresión de las citocinas previamente mencionadas se evaluaron en microcortes de íleon de ratones C57BL/6 que fueron inoculados vía oral, que es la entrada natural de los patógenos intestinales, con *C. rodentium* el cual es un patógeno murino o EAEC que es un patógeno humano.

Uno de los objetivos principales fue estandarizar la técnica inmunohistoquímica para las citocinas APRIL y TGF- β utilizando íleon de ratones C57BL/6 fijados en parafina. Por lo que uno de los primeros retos fue identificar técnicas que permitieran mantener las propiedades de estas proteínas. Para la estandarización de esta técnica se usó como base los protocolos que han sido desarrollados tanto en nuestro laboratorio como en el del laboratorio No. 15 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. La primera modificación fue fijar los tejidos en etanol en vez de en formaldehído ya que se ha demostrado que conserva mejor a las proteínas. Otro punto que se modificó fue la recuperación de antígeno ya que se había probado previamente colocando los tejidos incluidos en parafina utilizando tripsina sin éxito, por lo tanto nuestras condiciones óptimas para la recuperación de Ag se llevaron a cabo colocando nuestras muestras en buffer de citratos a ebullición durante 20 min. Otro detalle importante fue el bloqueo de las peroxidasas endógenas del intestino, ya que es un órgano que contiene una gran cantidad de peroxidasas por lo que fue necesario incrementar el porcentaje de peróxido de hidrógeno del 6% al 9% para tener un bloqueo adecuado; además, puesto que en el intestino se encuentran varias células que expresan de manera constitutiva receptores Fc y con el fin de bloquear las uniones inespecíficas de los Ac a los receptores, se incrementó el tiempo de bloqueo con la solución que contiene el suero humano de 30 min a 60 min, así como también incrementamos los tiempos de lavado de 3 min a 5 min ya que en el intestino hay una gran cantidad de moco. Uno de los principales cambios en la técnica de inmunohistoquímica empleada entre las citocinas APRIL y TGF- β fue el tiempo de

revelado con DAB. Para TGF- β se utilizó de 20-30 s mientras que para APRIL se utilizó 1 min.

Todos estos cambios fueron realizados paso a paso hasta observar los resultados mostrados en este proyecto, ya que al estar estandarizando esta técnica inmunohistoquímica observamos ensayos con exceso de fondo, con falsos positivos o residuos de pasos (reactivos) anteriores por una inadecuada forma de lavado.

Está documentado que la infección con *C. rodentium* en ratones y con EAEC en humanos induce una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal; caracterizada por la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-17 e IL-6 en la infección por *C.rodentium* (Collins 2014) y por IL-1 β , lactoferrina e IL-8 en la infección por EAEC (Boll y MacCornick, 2012). Sin embargo, no hay reportes de las citocinas que se inducen para regular estas respuestas inflamatorias y volver nuevamente a la homeostasis intestinal.

En este trabajo se demostró la expresión de APRIL tanto en el íleon de los ratones C57BL/6 que fueron inoculados con *C. rodentium* como en los que fueron inoculados con EAEC. Cabe mencionar que ninguna de estas citocinas se expresó en animales a los que se les administro solución salina. Esto nos permite suponer que la expresión y la detección de APRIL y TGF- β en diversas zonas del íleon, en estos inmunoensayos, fue inducida por la estimulación bacteriana de EAEC o *C.rodentium*. Como ya se mencionó APRIL y TGF- β son dos importantes citocinas que participan en la homeostasis intestinal, ambas citocinas son producidas por macrófagos, DC, linfocitos T activados y células epiteliales. (Wells et. al. 2011) Se ha reportado que el reconocimiento de las estructuras bacterianas por medio de los TLR es importante para que APRIL y TGF- β sean expresadas por las células presentes en el intestino. (Macpherson et. al. 2007; Pugaa et. al. 2014) Por lo tanto los TLR juegan un papel importante en la respuesta inmune, ya que son capaces de identificar estructuras bacterianas como: LPS, peptidoglicano, flagelina, lipoproteínas, etc. (Hayashi et. al. 2001)

Cabe mencionar que aunque no se realizó un análisis cuantitativo se puede apreciar una ligera expresión diferencial de las citocinas APRIL y TGF- β entre los cortes de los ratones inoculados con *C. rodentium* y los cortes de los ratones inoculados con EAEC.

Esta diferencia cualitativa de intensidad de señal positiva de APRIL y TGF- β entre los cortes de íleon de los ratones infectados con *C. rodentium* y EAEC, puede deberse a que *C. rodentium* es un patógeno de ratón mientras que EAEC es un patógeno de humano, que aunque en el modelo murino de EAEC de nuestro laboratorio se ha demostrado cambios histológicos y movilización de β -catenina no provoca un daño tan severo en el ratón como lo hace *C. rodentium*.

En la detección de la citocina APRIL observamos su expresión tanto en las vellosidades (IEC, lámina propia y criptas) así como en la placa de Peyer principalmente en el citoplasma de las células del domo subepitelial y de la región inferior, tanto de animales infectados con *C. rodentium* (Figura 18) o EAEC (Figura 20). Una expresión y distribución similar de la citocina APRIL se ha reportado en cortes de intestino delgado humano pero con diferente agente bacteriano. (Baron *et. al.* 2009; Spencer *et. al.* 2016)

En la detección de APRIL en los tejidos infectados con *C. rodentium* no se realizaron dobles marcajes para identificar las poblaciones celulares que la están expresando, sin embargo las células que están expresando a APRIL podrían ser macrófagos y DC, ya que al comparar las zonas de expresión observados en nuestros inmunoensayos con lo reportado en otros estudios en donde se ha evaluado a APRIL por inmunohistoquímica, se ha reportado que son principalmente los macrófagos y las DC localizadas en el domo subepitelial y en la zona inferior (zona de linfocitos T) de la placa de Peyer, las productoras de APRIL. (Baron *et. al.* 2009; Spencer *et. al.* 2016) En cuanto a las células marcadas en la lámina propia de las vellosidades podríamos sugerir que son principalmente macrófagos, ya que en otro estudio, en intestino de humano, se determinó por doble marcaje (APRIL y CD68) que la mayoría de células que expresan a APRIL en la lámina propia son macrófagos. (Baron *et. al.* 2009) También observamos la expresión de APRIL

en las células epiteliales que cubren las vellosidades y en el citoplasma de las células epiteliales de las criptas, de igual manera nuestros resultados son similares a los presentados en otros estudios, observando una intensa expresión de la citocina APRIL en estas zonas del íleon. (Baron *et. al.* 2009; Spencer *et. al.* 2016)

Con el fin de identificar que células están expresando APRIL en los inmunoensayos con los cortes de íleon del ratón infectado con EAEC, cabe mencionar que solo en estos ensayos realizamos tinciones seriadas de APRIL y un marcador específico de macrófagos (F4/80), se muestra que los macrófagos son de las principales células que expresan a la citocina APRIL ya que se observa a diversos macrófagos marcados ubicados en el domo subepitelial y en la región inferior de la placa de Peyer (Figura 22 y 23). Nuestros resultados coinciden con los datos mostrados en otros estudios en los cuales identifican a macrófagos en las mismas zonas en donde nosotros los detectamos. (Barone *et. al.* 2009)

Por otro lado también observamos células que no son macrófagos cuyo citoplasma se tiñe con la detección de APRIL, se localizan tanto en el domo subepitelial y en la región inferior de la placa de Peyer y podemos sugerir que por su localización estas células sean DC y linfocitos T, porque en experimentos similares han encontrado que son este grupo de células, además de los macrófagos, las encargadas de la expresión de APRIL en estas zonas. (Barone *et. al.* 2009; Spencer *et. al.* 2016) Cabe mencionar que este marcaje seriado también se observó en lámina propia de las vellosidades los cuales posiblemente son un infiltrado de macrófagos en respuesta por la infección de EAEC como también se ha reportado. (Barone *et. al.* 2009)

De manera interesante en los cortes de íleon del ratón infectado con EAEC, se observó una disminución notable de la expresión de APRIL en comparación con los cortes de íleon del ratón infectados con *C. rodentium*. (Figura 18 y 20) Esto podría deberse a que los ratones infectados con EAEC (Patógeno humano) pueden resistir y mejorar de una manera más adecuada ante la infección en comparación de los ratones infectados con *C.rodentium* (Patógeno murino), ya que hemos observado en nuestro laboratorio por medio del plaqueo de heces en

agar McConkey que los ratones que fueron infectados con EAEC expulsan de manera más eficaz a esta bacteria porque el número de UFC es mayor durante los primeros días en comparación con los ratones inoculados con *C.rodentium*.

La otra citocina que evaluamos fue TGF- β , es importante recordar que en el intestino no se observa una respuesta de TGF- β contra Ag procedentes de los alimentos, ya que como se ha mencionado, se considera que el ambiente en el intestino es tolerogénico. Nuestros resultados muestran la expresión de TGF- β en los tejidos de los ratones inoculados con *C. rodentium* y con EAEC, en los cuales se puede apreciar una expresión similar en las zonas de las vellosidades, pero con diferente intensidad entre los cortes de los ratones inoculados con *C. rodentium* y los cortes de los ratones inoculados con EAEC. (Figura 26 y 28)

La expresión de TGF- β en los cortes de íleon del ratón C57BL/6 inoculado con *C. rodentium* se observó principalmente en el citoplasma de las células de las vellosidades (enterocitos de las puntas y en las criptas) así como en el citoplasma de las células en la placa de Peyer principalmente en la región inferior (Zona de linfocitos T). (Figura 26) Al no haber realizado un doble marcaje para poder conocer cuales células del sistema inmune son las que están expresando dicha citocina, podemos sugerir que tipos de linaje celular están expresando a la citocina TGF- β por su ubicación y por los artículos encontrados en la literatura. En la placa de Peyer al haber una intensa expresión en la región inferior podemos sugerir que las células marcadas son posiblemente macrófagos y DC, porque en otros experimentos utilizando íleon de cerdo han identificado a estas células como las principales productoras de TGF- β en estas zonas. (Sangild *et. al.* 2009) En cuanto a las células marcadas en las vellosidades podemos sugerir que se trata de macrófagos y linfocitos, ya que se ha reportado en otros estudios en donde se ha evaluado a TGF- β por inmunohistoquímica, que son principalmente macrófagos y linfocitos localizadas en las vellosidades las productoras de TGF- β , sitio en donde también nosotros encontramos la expresión de esta citocina (Sangild *et. al.* 2009; F.Li *et al.* 2009), además de las células epiteliales marcadas solo en las puntas de las vellosidades, este último resultado no pudo ser comparado ya que en la literatura no se encontró un resultado similar.

Mientras que en los animales inoculados con EAEC se observó principalmente en el citoplasma de los enterocitos a lo largo de las vellosidades a comparación de lo observado con los ratones infectados con *C.rodentium* en el que solo se observaba la expresión de TGF- β en las puntas de las vellosidades, esto puede deberse a que en los tejidos infectados con EAEC la estimulación de la producción de moco y la formación de una biopelícula en la superficie de la mucosa puede ser a lo largo de la vellosidad mientras que en los tejidos infectados con *C.rodentium* la formación de la lesión A/F no es tan continua.

Además de observar el marcaje de TGF- β a lo largo de las vellosidades también observamos su expresión en la lámina propia y una ligera expresión en las células de las criptas. (Figura 27) Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios en donde se muestra la expresión de TGF- β a lo largo de las vellosidades (enterocitos). (Sangild *et. al.* 2009) Mientras que las células que expresan a TGF- β en la LP son posiblemente linfocitos y macrófagos, ya que se ha identificado que son en su mayoría estas células las que expresan a esta citocina. (Sangild *et. al.* 2009; F.Li *et al.* 2009) En este experimento en particular los tejidos infectados que utilizamos no contenían placa de Peyer por lo que no se pudo realizar el marcaje en esta estructura.

Con base en las inmunohistoquímicas realizadas fue posible demostrar que las citocinas APRIL y TGF- β son importantes en la homeostasis intestinal, que se expresan en el íleon de ratones infectados con *C. rodentium* y EAEC pero no en los ratones que fueron administrados con solución salina. La expresión de estas citocinas es menos intensa en los ratones con EAEC que en los ratones inoculados con *C. rodentium*. Además la localización de la expresión de TGF- β es diferente en los ratones inoculados con uno o con otro patógeno, pero la expresión de APRIL es similar en ambos ratones.

Conclusiones

- Se estandarizo una técnica inmunohistoquímica para la detección de las citocinas APRIL y TGF- β .
- Con base en los inmunoensayos realizados en este trabajo, se muestran grandes zonas de expresión de las citocinas APRIL y TGF- β , las cuales se expresan a lo largo del íleon en presencia de una infección bacteriana (en este caso con EAEC o *C. rodentium*), las cuales apoyan en las funciones para el mantenimiento de la homeostasis en la mucosa intestinal.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolos de inmunohistoquímicas utilizados para obtener las condiciones óptimas presentadas en este trabajo.

Protocolo 1.

1. Desparafinar los cortes (toda la noche a 58 °C).
2. Dejar enfriar las laminillas y quitar la parafina que escurre.
3. Hidratación de tejidos con diluciones de Xilol durante 5 min cada una (Xilol I, Xilol II y Xilol III) y etanol durante 1 min cada una (Etanol 99.5 % I, Etanol 99.5 % II, Etanol 99.0 % I, Etanol 99.0 % II y Etanol 80.0 %)
4. Enjuagar con H₂O corriente durante 3 min.
5. Sumergir en PBS 1X durante 5 min (1 vez).
6. Colocar las muestras en baño María, sumergidas en buffer de citratos 0.01 M a ebullición durante 20 min.
7. Dejar enfriar las muestras y enjuagarlas con PBS 1X durante 5 minutos (1 vez).
8. Delimitar el área en donde se encuentra el corte con un plumón hidrofóbico.
9. Bloquear las peroxidasa endógena con metanol-peróxido de hidrogeno por 1 hora 1:10 (1800 µl MeOH+ 200 µl H₂O₂), hacer recambios cada 20 min.
10. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
11. Realizar un lavado con agua MiliQ (agua desionizada) (5 min)
12. Bloquear uniones inespecíficas con BSA al 1% en PBS 1X por 2 hr a temperatura ambiente.
13. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
14. Realizar un lavado con agua MiliQ (5 min)
15. Colocar el Ac 1° diluido en solución bloqueadora (BSA al 1% en PBS) y dejar 16-24 hrs a 4°C.
16. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
17. Realizar un lavado con agua MiliQ
18. Colocar el Ac 2° diluido en solución bloqueadora (BSA al 1% en PBS) por 2 hrs a temperatura ambiente.
19. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
20. Realizar un lavado con agua MiliQ
21. adicionar el sustrato para la peroxidasa DAB + H₂O₂ diluido 1:10 para 400 µl (40µl DAB +360 µl H₂O₂)
22. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
23. Realizar un lavado con agua MiliQ
24. Contra colorear con hematoxilina 5 min.
25. Enjuagar la hematoxilina con agua corriente.
26. Enjuagar con PBS-tween 0.01% por 5 min (3 veces).
27. Realizar un lavado con agua MiliQ
28. Deshidratar el tejido utilizando etanol a diferentes concentración durante 20 s cada uno (Etanol 85 %, Etanol 90.0 %, Etanol 99.0 %, Etanol 100.0 %) y Xilol durante 10 s cada uno (Xilol I, Xilol II y Xilol III)
29. Montar con resina

Protocolo 2.

1. Desparafinar los cortes (toda la noche a 58 °C).
2. Dejar enfriar las laminillas y quitar la parafina que escurre.
3. Hidratación de tejidos con diluciones de Xilol durante 5 min cada una (Xilol I, Xilol II y Xilol III) y etanol durante 1 min cada una (Etanol 99.5 % I, Etanol 99.5 % II, Etanol 99.0 % I, Etanol 99.0 % II y Etanol 80.0 %)
4. Enjuagar con H₂O corriente
5. Sumergir en PBS 1X durante 5 min.
6. Colocar las muestras en baño María, sumergidas en buffer de citratos 0.01 M a ebullición durante 20 min.
7. Dejar enfriar las muestras 10 min y enjuagarlas con PBS 1X durante 5 minutos (3 veces).
8. Delimitar el área con plumón hidrofóbico.
9. Incubar los cortes 1 hora a temperatura ambiente con H₂O₂ al 6 % en PBS 1X con 0.1 % de azida de sodio. Importante: no dejar que se seque el tejido una vez que se ha hidratado.
10. Lavar al menos 2-3 veces con BSA al 0.1 % en PBS 1X, cada lavado debe ser de al menos 5 minutos. En lo sucesivo los lavados se harán de manera idéntica.
11. Incubar 30 min-1 hora a temperatura ambiente con suero no relacionado al 1-2 % en BSA al 1 % en PBS 1X pH 7.4.
12. Decantar y eliminar el exceso de la incubación anterior.
13. Incubar con los Ac primarios a las diluciones correspondientes en BSA 1% en PBS 1X pH 7.4 con suero no relacionado al 1-2%, es recomendable dejar al menos 1 hora a temperatura ambiente, o si se requiere reducir el pegado inespecífico toda la noche a 4 °C.
14. Lavar.
15. Incubar con el Ac secundario a la dilución correspondiente en BSA 1 % en PBS 1X pH 7.4 1 hora a temperatura ambiente.
16. Lavar.
17. Adicionar el sustrato para la peroxidasa DAB + H₂O₂ diluido 1:10 para 400 µl (40µl DAB +360 µl H₂O₂).
18. Lavar.
19. Contra colorear con hematoxilina.
20. Enjuagar la hematoxilina con agua corriente.
21. Deshidratar el tejido utilizando etanol a diferentes concentración durante 20 s cada uno (Etanol 85 %, Etanol 90.0 %, Etanol 99.0 %, Etanol 100.0 %) y Xilol durante 10 s cada uno (Xilol I, Xilol II y Xilol III)
22. Montar con resina

Anexo 2. Reactivos

1. Solución de PBS 10X (0.1 M) pH 7.2

Fosfato de sodio dibásico (NaH ₂ PO ₄)	11.5 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	2.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	80.0 g
Agua desionizada (Milli Q) cbp	1.0 L

2. Solución de PBS 1X (0.01 M) pH 7.2

Solución de PBS 10X (0.1 M) pH 7.2	100 ml
Agua desionizada (Milli Q)	900 ml

3. Buffer de citratos 0.01 M pH 6.0

3.1. Citrato 0.01 M

3.1.1. Ácido cítrico 0.1 M

Ácido cítrico monohidratado	21.01 g
Agua desionizada (Milli Q) cbp	1000 ml

3.1.2. Citrato de sodio 0.1 M

Citrato de sodio dihidratado	29.41 g
Agua desionizada (Milli Q) cbp	1000 ml

3.2. Solución de trabajo

Ácido cítrico 0.1 M	18 ml
Citrato de sodio 0.1 M	82 ml
Agua desionizada (Milli Q) cbp	1000 ml

4. Solución de PBS 1X (0.01 M) pH 7.2- Tween 0.01%

Solución de PBS 1X (0.01 M) pH 7.2	1000 ml
Tween 20	0.1 ml

Referencias.

1. Abbas K. A., Lichtman H. A. 2004. *Inmunología celular y molecular*. 5ta ed. Edit. Elsevier pag.
2. Abreu et al. 2003. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res*. 9: 322-330
3. Barone F, Patel P, Sanderson J.D and Spencer J. 2009. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. *Nature publishing group*. VOLUME 2 NUMBER 6. 495-503
4. Beatriz T., Adrián R., García E., Leal J. 2009. Citocinas y lupus eritematoso sistémico. *Gac Méd Caracas*. 117(3):196-211.
5. Benson M.J et al. 2008. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol*. 180, 3655–3659.
6. Boll E.J and McCormick B.A. 2012. A new understanding of enteroaggregative *Escherichia coli* as an inflammatory pathogen. *Cell and migration* 6; 5: 413-418.
7. Cabrera R. 2005. Sistema inmunológico intestinal: nutrición e inmunidad. En: Gil. A., editor. *Tratado de nutrición*. Tomo I: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Madrid. Acción Médica. P. 1231-60
8. Camille J, Hugot J.P and Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. 2010. *International Journal of Inflammation* Volume 2010, Article ID 823710, 12 pages
9. Cerutti A. 2008. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. 8:421–34.
10. Chaudhary P.M., Ferguson C., Nguyen O., Massa H.F., Eby M., Jasmin A., Trask B.J., Hood L., Nelson P.S. 1998. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood*. 91: 4020-4027.
11. Collins W.J, Keeney K.M, Crepin F.W, Rathinam V.A.K, Fitzgerald K.A, Finlay B.B& Frankel G. 2014. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 12, 612–623.
12. Cording S, Fleissner D, Heimesaat M.M, Bereswill S, Loddenkemper C, Uematsu S, Akira S, and Huehn J. 2013. Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *European Journal of Microbiology and Immunology* 3 (2013) 1, pp 1-10
13. Debard N., Sierro F., Browning J. and Kraehenbuhl J.P. 2001. Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology*. 120: 1173-1182.
14. Dullaers M, Li D, Xue Y, Ni L, Gayet I, Morita R. 2009. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity*. 30:120–9.
15. Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin J.R, Henderson I.R, Cravioto A, Nataro J.P. 1998. Pet an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 66:3155-3163.
16. Furrie E., Macfarlane S., Thompson G., Macfarlane G. T. 2005. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*. 115: 565-574

17. Gálvez-Gastélum F.J, Sandoval-Rodríguez A.S, Armendáriz-Borunda J. 2004. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud Pública Mex.* 46:341-350.
18. Gayo A., Mozo L., Suarez A., Tuñón A., Lahoz C., Gutiérrez C. 2000. Long-term effect of IFN beta 1b treatment on the spontaneous and induced expression of IL-10 and TGF- β 1 in MS patients. *J Neurol Sci.* 1; 179 (S 1-2): 43-9.
19. Godlewski MM, Hallay N, Bierla JB, Zabielski R. Molecular mechanism of programmed cell death in the gut epithelium of neonatal piglets. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 3: 97–113, 2007.
20. Hayashi F, Smith K.D, Ozinsky et al. 2001. The innate immuneresponse to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature.* 410: 1099-1103
21. He B, Xu W, Santini P.A, Polydorides A.D, Chiu A, Estrella J. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent Immunoglobulin A (2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity.* 26: 812–26.
22. Huerta Saquero A, Oropeza R. 2011. Calva. Bacterias que causan diarrea a los bebés... Academia de ciencias de Morelos, A.C.
23. Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, Ishikawa H, 1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. exp Med.* 1; 184 (4): 1449-59
24. Lin H.H, Faunce D, Stacey M. 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *JEM* Vol. 201, No. 10, 1615–1625.
25. M. Sporn. 1999. TGF- β : 20 years and counting. *Microbes Infect* 1251-1253.
26. Macpherson A.J and McCoy K. 2007. APRIL in the Intestine: A Good Destination for Immunoglobulin A2. *Immunity* 26. Elsevier Inc. 755-757.
27. Malstrom C and James S. 1998. Inhibition of Murine Splenic and Mucosal Lymphocyte Function by Enteric Bacterial Products. *INFECTION AND IMMUNITY*, July 1998, p. 3120–3127
28. Medzhitov, R. et. al. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* 2: 253-258.
29. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin C.H. 2002. Mechanism of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 82:85-91
30. Nagler-Anderson C. 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 59–67.
31. Nataro JP, Yikang D, Cookson S, et al. Heterogeneity of enteroaggregative E. coli virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995;171:465–8
32. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. 2001. Transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex* 43:340-351.
33. Pugaa I., Cerutti A. 2014. Modulación del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas por señales del sistema inmunitario innato. *Semin Fund Esp Reumatol.* 15(1)11–18.
34. Ramiro-Puig E., Pérez-Cano F. J., Castellote C., Franch A. y Castell M. 2008. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *REV ESP ENFERM DIG (Madrid)* Vol. 100. N.º 1, pp. 29-34.
35. Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli *Salud Publica Mex.* 44:464-475.

36. Sangild P.T et al. 2009. The prenatal porcine intestine has low transforming growth factor-beta ligand and receptor density and shows reduced trophic response to enteral diets. *American Physiological Society*. R1053-R1062
37. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. 2011. *ENF INF MICROBIOL*. 31 (4): 137-151
38. Spencer J and Sollid L.M. 2016. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunology* VOLUME 9 NUMBER 5.
39. Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace W.W, et al. 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*. 33:71–83.
40. Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, et al. 2011. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity*. 34:247–57.
41. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, et al. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*. 448:929–33.
42. Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsoe G. 2007. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*. 178:3593–601.
43. Vega M.A. 2007. Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. *CINVESTAV Enero-Marzo 2007* 55-59.
44. Vega-López, M.A., Arenas-Contreras, G., Bailey, M., González-Pozos, S., Stokes, C.R., Ortega, M.G. y Mondragon-Flores, R. Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev.Immunol*. 8, 147-158. 2001.
45. Wells J. M, Rossi O, Meijerink M and Van Baarlen. 2010. Epithelial crosstalk at the microbiota mucosal interface.
46. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan W, Buldys M, et al. 2007. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*. 8: 294–303.