



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON EL EPÍTOPO  
LINEAL COMÚN DEL FACTOR DE  
COLONIZACIÓN Y LA SUBUNIDAD B DE LA  
TOXINA DEL CÓLERA CONTRA LA INFECCIÓN  
POR *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA EN EL  
MODELO MURINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

OLGA ROXANA SUASTE VILLANUEVA



MÉXICO, D. F.



Abril 2005

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

m342443



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.

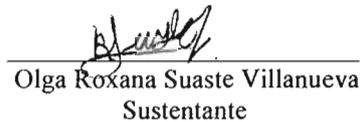
### **Jurado Asignado**

Presidente: Prof. Rodolfo Pastelín Palacios  
Vocal: Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas  
Secretario: Prof. Yolanda López Vidal  
1er sup. Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz  
2do sup. Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM

  
Dra. Yolanda López Vidal  
Asesor

  
Olga Roxana Suaste Villanueva  
Sustentante

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la asesoría y el apoyo brindado para la realización de esta tesis. Al Dr. Mauricio Castañón Arreola por su asesoría técnica en la realización del diseño de la parte experimental. A la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal por el apoyo brindado en la realización de la citometría de flujo.

El proyecto fue financiado parcialmente por DGAPA IN218698, DGAPA IN210196, CONACYT 27557M, UC MEXUS, Partida Presupuestal del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Durante mis Estudios de Licenciatura gocé de una beca otorgada por PRONABES y para la realización de la Tesis gocé de una beca otorgada por PROBETEL.

## DEDICATORIAS

### *A mi madre*

Quien siempre me ha impulsado para ser una mejor persona y por tenerme la confianza para recorrer el camino hasta aquí, tú me has inspirado para este logro.

### *A mi padre*

Porque me ha brindado su apoyo y cariño incondicional en todo momento y me ha enseñado que el valor más importante es la nobleza.

### *A mi hermano*

Porque me llena de orgullo todo lo que ha hecho por nosotros y porque su nobleza es algo que voy a admirar toda mi vida, gracias porque sin ti no hubiera llegado hasta aquí.

### *Iván*

Gracias por estar conmigo en momentos difíciles apoyándome y por hacerme creer en mí aún cuando yo misma dejé de hacerlo.

### *Karina Adames*

Gracias por tu amistad, por tu confianza y sobre todo por tu paciencia durante todos estos años.

### *Paty, Tere, Ana Karina, Adriana, Martha, Ivonne y Fernando.*

Porque juntos hemos recorrido un arduo camino para llegar aquí y porque me han apoyado en todo momento, gracias.

### *Dr. Gonzalo*

Gracias por sus asesorías y por su apoyo.

<b>INDICE</b>	<b>Págs.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>DEDICATORIAS</b>	iv
<b>ABREVIATURAS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Epidemiología	2
1.2 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	3
b) Hábitat	4
c) <i>Escherichia</i> sp	4
1.3 Clasificación	
a) Cepas patógenas de <i>E. coli</i>	5
b) Características estructurales y antigénicas	6
c) Serotipos	7
1.4 Mecanismo de transmisión y patogenicidad	8
1.5 Factores de virulencia	9
a) Toxinas	9
b) Factores de colonización	11
1.6 Inmunidad y protección	15
a) Inmunidad innata	15
b) Inmunidad específica	16
c) Respuesta inmune frente a la infección	21
d) Sistema linfoide asociado a mucosas (MALT)	22
e) Modelos para evaluación de patogenicidad y vacunas	24
1.7 Desarrollo de vacunas contra la diarrea ocasionada por ETEC	26
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	31
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos particulares	32
<b>4. METODOLOGÍA</b>	33
4.1 Bacteria	34
4.2 Epítipo lineal común (CLE) y subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	34

	<b>Págs.</b>
4.3 Animales	35
4.3.1 Inmunización	35
4.3.2 Reto	35
4.3.3 Seguimiento de los ratones retados con ETEC H10407	36
a) Excreción de ETEC	36
b) Evaluación de diarrea	36
4.4 Obtención, conteo y viabilidad celular	36
4.5 Ensayo de proliferación celular	37
4.6 Marcadores de superficie celular	37
4.7 Citocinas intracelulares	38
4.8 Análisis de fluorescencia, granularidad y tamaño por citometría de flujo	39
4.9 Esquema general de metodología	40
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1 Seguimiento de los ratones post-reto con ETEC	43
5.2 Obtención de linfocitos	44
5.3 Determinación de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo	44
5.4 Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo	49
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
6.1 Seguimiento de los ratones	59
6.2 Subpoblaciones linfocitarias	61
6.3 Perfil de citocinas	63
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APC	Célula presentadora de antígeno
CF	Factor de colonización
CLE	Epítipo lineal común
CS	Componente de superficie de ETEC
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera
DTH	Respuesta de hipersensibilidad tardía
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GLC	Ganglios linfáticos cervicales
GLI	Ganglios linfáticos inguinales
GMPC	Guanosin monofosfato cíclico
HBSS	Solución salina balanceada Hanks
HUS	Síndrome urémico hemolítico
IL	Interleucina
IN	Intranasal
INF	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
LT	Toxina termolábil
MALT	Sistema linfoide asociado a mucosas
MHC	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
MRHA	Hemaglutinación resistente a manosa
PCF	Factor putativo de colonización
PP	Placas de Peyer
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga
ST	Toxina termoestable
TCR	Receptor de linfocito T
UFC	Unidad formadora de colonia

## RESUMEN

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una importante causa de diarrea aguda infantil en todo el mundo y un problema especialmente grave de salud pública en países en desarrollo. En la actualidad se conoce que existe inmunidad protectora contra un segundo episodio de diarrea ocasionado por ETEC, y es específica del tipo de factor de colonización (CF) de ETEC. Los factores de colonización son los principales factores de virulencia de ETEC y a la fecha están descritos epítomos comunes reconocidos por los sueros de individuos convalecientes. Este trabajo caracteriza la respuesta inmune inducida por la inmunización intranasal del epítomo lineal común (CLE) a los factores de colonización de ETEC acompañado de la subunidad B de la toxina del cólera en modelo murino. Al término de la inmunización los ratones se retaron vía oral con ETEC  $6 \times 10^8$  UFC.

En los resultados se muestra que la inmunización intranasal con el CLE+CTB indujo una respuesta inmune protectora con la disminución de la colonización y la severidad de la diarrea después de la infección por ETEC en el modelo murino. La caracterización de la respuesta inmune mostró un incremento de la subpoblación linfocitaria T CD4+ antígeno-específica para los grupos inmunizados, con mayor densidad celular para el grupo inmunizado con CLE+CTB. El perfil de citocinas, mostró una mayor producción de células productoras de IL-4 e IL-10, respuesta característica del fenotipo Th2. En el caso del INF- $\gamma$ , esto no fue así aunque se observó cierto incremento de esta citocina en el grupo inmunizado con CLE+CTB.

Este proyecto contribuyó en la caracterización de la inmunidad protectora inducida por CLE+CTB por vía intranasal. También demostró que la mayor subpoblación T CD4+ se detectó en placas de Peyer que es el órgano blanco de la infección por ETEC. El perfil autoguiado hacia el blanco de estas células y su papel de la patogénesis y de la regulación de la enfermedad inflamatoria del intestino aún esta en discusión.

# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Epidemiología

En la actualidad se estima que mundialmente se presentan anualmente 1.5 billones de episodios de diarrea y de estos, 3 millones terminan en muertes. Del número de casos totales de diarrea; 210 millones de estos son ocasionados por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), de los cuales 380,000 casos terminan en defunciones [1]. Aunque la diarrea ocasionada por este microorganismo ocurre en todos los grupos etarios, la mortalidad es mayor en niños menores de 5 años; particularmente acompañados de desnutrición, por lo que se presentan con mayor frecuencia en los países en desarrollo [1].

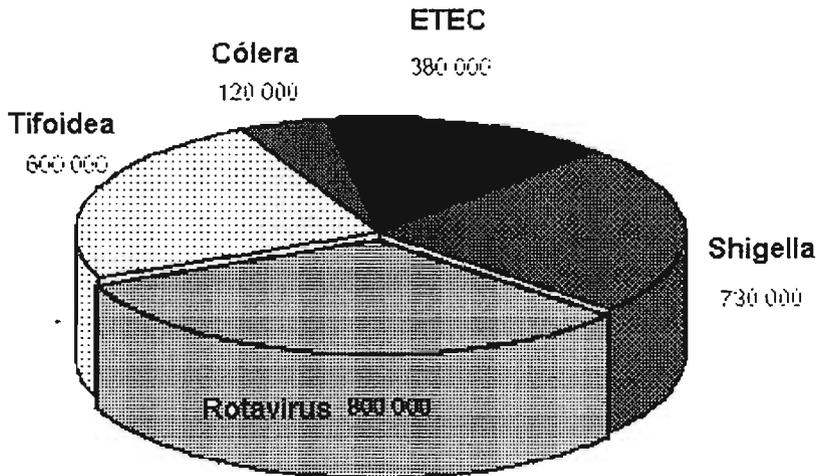


Figura 1. Mortalidad mundial anual debida a Tifoidea, cólera, ETEC, *Shigella* y Rotavirus [2].

ETEC es también el principal agente causal de la diarrea del viajero, ocasionada por la visita a lugares endémicos; estudios de viajeros a África, Asia y América Latina sugieren que el riesgo de adquirir diarrea en viajes breves fue cerca del 50%. ETEC fue aislada como causa de estos episodios diarreicos en el 35% [1]. Estudios realizados en viajeros a México que reportaron diarrea por ETEC fue cerca del 20% [3].

En México, el reporte de la Secretaria de Salud para el año 2002 mostró que las enfermedades intestinales infecciosas son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de 1 año y la principal causa en niños de 1 a 4 años con una tasa de 7.42 [4].

En el año 2000 ocurrió un importante brote de diarrea asociado con el desbordamiento del canal de aguas negras en Chalco, México. La prevalencia por ETEC fue del 62.2% (213/739) asociado a este [5].

Todas estas evidencias presentadas resaltan que la diarrea causada por ETEC en población susceptible en México y en los países en desarrollo es la cuarta causa de morbilidad (figura 1) lo que apoya su estudio y justifica el diseño de medidas preventivas como el diseño de nuevos candidatos a vacunas.

## 1.2 Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por más de 100 especies caracterizadas por ser un grupo variado de bacilos gramnegativos, no esporulados, móviles por flagelos peritricos o no móviles y las especies de mayor importancia clínica se muestran en la tabla 1.

-

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se asocian a diferentes patologías tales como: abscesos, neumonía, septicemia, infecciones del tracto urinario, infecciones intestinales e infecciones de heridas. Un gran número de especies son causantes de infecciones nosocomiales y han sido claramente documentados como patógenos entéricos a especies pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* [6].

Género	Número de Especies	Género	Número de Especies
<i>Citrobacter</i>	11	<i>Providencia</i>	5
<i>Enterobacter</i>	14	<i>Salmonella</i>	5
<i>Escherichia</i>	5	<i>Serratia</i>	7
<i>Klebsiella</i>	7	<i>Shigella</i>	4
<i>Proteus</i>	4	<i>Yersinia</i>	10

**Tabla 1.** Géneros de mayor importancia clínica de la familia *Enterobacteriaceae* [6, 7].

a) Hábitat

La localización de las bacterias del género *Enterobacteriaceae* es muy variable, se pueden encontrar en plantas, semillas, agua, intestino humano y de animales, dependiendo del género y especie de las mismas [6, 7].

b) *Escherichia sp.*

El género *Escherichia sp.* está compuesto por las especies: *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. blattae* y *E. vulneris* y se considera a *Escherichia coli* como la especie tipo.

*Escherichia coli* forma parte de la flora normal de individuos sanos; sin embargo algunas cepas son capaces de causar enfermedades intestinales y extraintestinales en individuos sanos e inmunocomprometidos. Las cepas patógenas pueden producir infecciones entéricas

(diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteremias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones pulmonares y de heridas) [6, 7].

## 1.2 Clasificación

### a) Cepas patógenas de *E. coli*

Las cepas patógenas de *E. coli* se subdividen de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad en cuatro tipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* productora de toxina-Shiga (STEC) antes denominada *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) [6]. En la tabla 2 se muestran las principales características de las cepas patógenas de *E. coli*.

Cepa	Sitio Afectado	Síndrome Clínico	Adhesinas	Exotoxinas	Patogénesis
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	Intestino delgado	Diarrea del viajero, diarrea infantil en países en desarrollo	Factores antigénicos de colonización (CFs)	Toxina termoestable (STa; STb) Toxina termolábil (LT-I; LT-II)	Hipersecreción de fluidos y electrolitos debido a las enterotoxinas
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	Intestino grueso	Enfermedad muy parecida a la shigelosis	??	??	Invasión y destrucción de los enterocitos
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC)	Intestino delgado	Diarrea infantil	Pili de unión (Bfp) Intiminas	??	Adherencia y destrucción de enterocitos
<i>E. coli</i> Toxina-Shiga (STEC)	Intestino grueso	Colitis hemorrágica, posible causa del síndrome urémico hemolítico (HUS)	Intimina	Toxinas Shiga-like (SLT-I; SLT-II)	Inhibición de la síntesis proteica por la acción de enterotoxinas citotóxicas

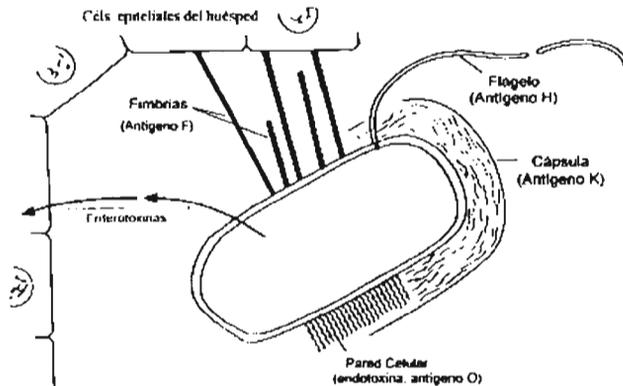
**Tabla 2.** Resumen de los síndromes clínicos y factores de virulencia de *E. coli*. ST= Toxina termoestable, LT = toxina termolábil [8].

## b) Características estructurales y antigénicas

De forma general se puede decir que *Escherichia coli*, cuenta con diferentes capas en su estructura externa principalmente: membrana citoplásmica, pared celular y en algunos casos la presencia de cápsula; aunque la importancia antigénica de la estructura radica en la estructura capsular, flagelos y el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina.

En 1947, Kauffmann propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* en base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares) (Figura 2). Actualmente, la serotipificación de las cepas patógenas de *E. coli* se basa en los antígenos O y H (tabla 3) [6].

La estructura de *Escherichia coli* comprende principalmente el antígeno O que es un polisacárido termoestable ( $121^{\circ} \text{C}/2 \text{ h}$ ) que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular; el antígeno K, corresponde al polisacárido capsular que envuelve la pared celular y en cuanto al antígeno K, existen dos grupos que corresponden con las variedades K(A) y K(L), estos últimos pierden la capacidad de aglutinación a  $100^{\circ} \text{C}/1 \text{ h}$ , mientras que son necesarias exposiciones de  $121^{\circ} \text{C}/2 \text{ h}$  para inhibir la aglutinación de la variedad K(A); por último, los antígenos flagelares H poseen naturaleza proteica y son termolábiles, de forma que se desnaturalizan al calentarlos a  $100^{\circ} \text{C}$  durante 30 min por lo que pierden su capacidad inmunogénica [6, 9].



**Figura 2.** Esquema de *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia [9].

### c) Serotipos

Los antígenos O y H son estables y son un marcador fenotípico confiable característico de las cepas; en la actualidad se conocen cerca de 53 antígenos H y 175 antígenos O (tabla 3). Debido a que combinaciones de diferentes serotipos se asocian a episodios de diarrea pueden ser útiles con fines de investigación [6].

ETEC		EPEC		EIEC	STEC		
O6:NM	O78:H12	O55:NM	O126:NM	O28:NM	O1:NM	O79:H7	O121:H19
O6:H16	O128:H7	O55:H6	O126:H27	O29:NM	O2:H6	O83:H1	O128:NM
O8:H9	O148:H28	O55:H7	O127:NM	O112:NM	O2:H7	O91:NM	O128:H2
O15:H11	O153:45	O86:NM	O127:H6	O124:NM	O5:NM	O91:H10	O128:H45
O20:NM	O159:NM	O86:H34	O127:H9	O124:H7	O9:NM	O91:H21	O137:H41
O25:NM	O159:H4	O111:NM	O127:H21	O124:H30	O14:NM	O103:H2	O145:NM
O25:H42	O159:H20	O111:H2	O128:H2	O136:NM	O22:H5	O104:NM	O153:H2
O27:NM	O167:H5	O111:H12	O128:H12	O143:NM	O22:H8	O104:H21	O153:H25
O27:H7	O169:H41	O111:H21	O142:H6	O144:NM	O26:NM	O111:NM	O157:NM
O27:H20		O114:NM	O157:H45	O152:NM	O26:H11	O111:H2	O157:H7
O49:NM		O114:H2		O164:NM	O45:H2	O111:H8	O163:H19
O63:H12		O119:H6		O167:NM	O48:H21	O113:H21	O165:NM
O77:H11		O125:H21		ONT:NM	O50:H7	O118:H2	O165:H25
					O55:H7	O118:H16	O172:NM

**Tabla 3.** Serotipos de las cepas patógenas de *E. coli*. NM= No móvil, NT= No tipificable [6].

### 1.3 Mecanismo de transmisión y patogenicidad.

La transmisión de ETEC generalmente ocurre por la ruta fecal-oral, principalmente por ingestión de alimentos o agua contaminada. Se estima que la dosis infectiva se encuentra entre  $10^7$  y  $10^8$  bacterias para los adultos; a dosis mayores la diarrea puede llegar presentarse a tan solo 24 horas de la infección. En niños, se sugiere que las dosis infectivas de ETEC son menores [10, 11].

Para que se establezca la infección por ETEC, se requiere el ingreso al organismo de la bacteria y esta debe superar las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, tales como: pH ácido, peristaltismo, moco y actividad enzimática hasta llegar al intestino delgado; en dónde atraviesa la capa de moco, se adhiere a la superficie de las células epiteliales intestinales y comienza la colonización; la bacteria tiene la capacidad de liberar sus enterotoxinas que provocan una serie de eventos en el interior de la célula activando la enzima adenilato ciclasa e incrementando la síntesis de AMPc; esto afecta principalmente la bomba de  $\text{Cl}^- \text{Na}^+$  permitiendo la salida de estos iones al lumen intestinal con la posterior salida de agua y esto se manifiesta en la diarrea [10]; esta, generalmente es de carácter acuoso, de volumen considerable sin provocar sangrado. La sintomatología de la infección por ETEC está caracterizada por la presencia de dolor abdominal, náuseas, malestar general, vómito y fiebre en algunas ocasiones [6, 7, 10]. La severidad de los cuadros diarreicos está en función de la virulencia de la cepa, susceptibilidad del huésped y dosis infectiva principalmente [6, 7].

#### 1.4 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia se pueden considerar como todas aquellas características bioquímicas y genéticas que se interpretan como la capacidad del microorganismo para llevar a cabo la infección; por lo anteriormente dicho, se han identificado como principales factores de virulencia para ETEC sus enterotoxinas; termoestable (ST) y termolábil (LT) y los factores de colonización o adhesinas (CFs) [6, 7].

##### a) Toxinas

En ETEC se identificaron dos familias de enterotoxinas, la termoestable (ST) y otra termolábil (LT), estas toxinas son responsables de la patogenicidad de la cepa siendo más patógenas las que producen ambas toxinas (LT/ST) [12]. Algunas de las características diferenciales entre ambas toxinas tales como peso molecular, resistencia al calor, antigenicidad, enzima que activan y la localización de los genes que codifican para las mismas se muestran en la tabla 4.

<b>Característica</b>	<b>LT</b>	<b>ST</b>
Peso Molecular	86,500 Da	1,000 – 6,000 Da
Inactivación por calor	Si	No
Presencia de anticuerpos contra toxinas después de la infección natural	Si	No
Enzima estimulada en el enterocito	Adenilato ciclasa	Guanilato ciclasa
Genes plasmídicos	Si	Si

**Tabla 4.** Comparación de las propiedades biológicas, farmacológicas e inmunológicas de las toxinas LT y ST de ETEC. LT= Toxina termolábil, ST= Toxina termoestable [12].

#### a.1) Toxina termo estable (ST)

Es una toxina proteica de bajo peso molecular que tiene un mecanismo de acción similar a la LT (véase más adelante), aunque no se conoce del todo bien. Se sabe que la ST interactúa con un receptor específico que se encuentra sobre las células epiteliales del intestino delgado y el colon; esta unión desencadena un serie de eventos que terminan en la activación de la guanilato ciclasa y la acumulación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), provocando la salida de agua de la célula hacia el lumen intestinal, de forma similar al AMPc [12, 13,14].

#### a.2) Toxina Termolábil (LT)

La toxina termolábil se encuentra estrechamente relacionada con la toxina del cólera ya que guarda gran similitud estructural (80% de identidad en aminoácidos), funcional y en el mecanismo de acción; ambas toxinas están compuestas por la subunidad catalítica (A) unida a cinco subunidades B [12], que interactúan específicamente con el receptor GMI que se encuentra en la superficie del enterocito. Una vez que se lleva a cabo la unión de la subunidad B, la subunidad A se introduce a la célula epitelial intestinal y se hidroliza en A1 y A2, la subunidad A1 tiene actividad de ADP-ribosil transferasa responsable de la transferencia de una molécula de ADP-ribosa del NAD a la subunidad alfa de una proteína G, designada como Gs, esta proteína activa a la adenilato ciclasa, cuya actividad provoca la acumulación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) en el interior de la célula, este mediador altera la bomba los canales de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> propiciando la salida de agua y electrolitos al lumen intestinal (figura 3) [13, 14].

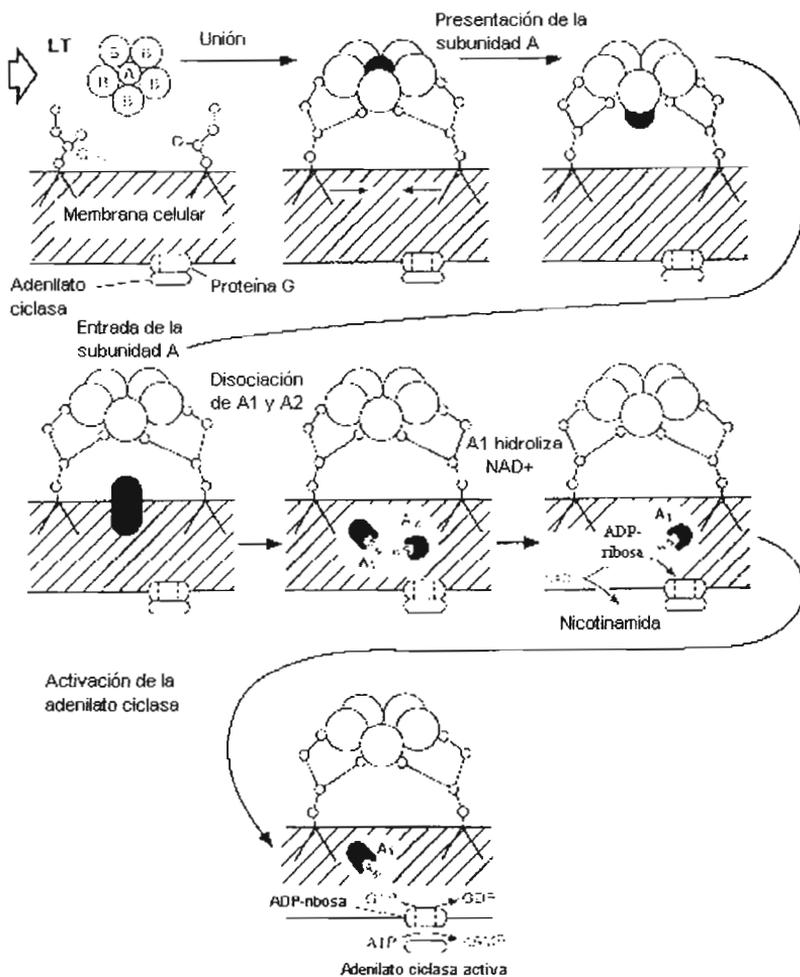


Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina termolábil (LT) de ETEC [15].

#### b) Factores de colonización

ETEC se adhiere a las superficies de células epiteliales debido a proteínas superficiales conocidas como factores de colonización (CFs). A la fecha se han descrito más de 20 diferentes CFs (tabla 5), siendo los mejor caracterizados el factor antigénico de

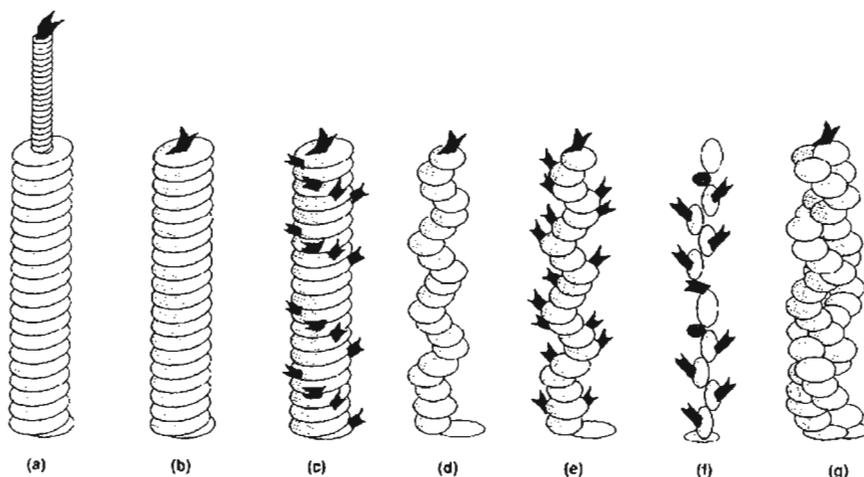
colonización I (CFA/I), y los componentes estructurales de superficie de ETEC 1-6 (CS1-CS6) [16].

CF	CS	Morfología		Tamaño (kDa)	Toxinas	Serogrupos
<i>Familia CFA I</i> CFA I	CFA/I	F	7 nm	15.0	ST+LT, LT	O4, O7, O15, O20, O25, O63, O78, O110, O126, O128, O136, O153, O159
CS1	CS1	F	7 nm	16.5	ST+LT	O6, O139
CS2	CS2	F	6 nm	15.3	ST+LT	O6
CS4	CS4	F	7 nm	17.0	ST+LT	O25
PCFO166	CS14	F	7 nm	15.5	ST	O20, O71, O98, O166
CS17	CS17	F	7 nm	17.5	LT	O8, O15, O48, O114, O146
CS19	CS19	F	7 nm	16.0	ST+LT	O8
<i>Grupo CS5</i> CS5	CS5	H	5 nm	21.0	ST	O6, O29, O92, O114, O115, O167
CS7	CS7	H	3-6 nm	21.5	ST+LT	O15, O103, O114
PCF09	CS13	F		27.0	LT	O9, O143
CS20	CS20	F	7 nm	20.8	ST+LT	O17
PCF020	CS18	F	7 nm	25.0	ST+LT	
<i>Tipo IV</i> CFA III	CS8	F	7 nm	18.0	LT	O25
Longus	CS21	F	7 nm	22.0	ST+LT, ST, LT	O2, O6, O8, O20, O25, O49, O128, O139, O148
8786	CS15	NF	2-3 nm	16.3	ST	O117
<i>Diferentes</i> CS3	CS3	f	2-3 nm	15.1	ST+LT	O8, O9, O78, O80, O115, O128, O139, O168
CS6	CS6	NF		14.5	ST+LT, ST, LT	O25, O27, O92, O148, O153, O159
PCF0148	CS11	f	3 nm		ST+LT	O148
PCF0159	CS12	F	7 nm	19.0	ST+LT	O159
2230	CS10	NF		16.0	ST	O25

**Tabla 5.** Características de los factores de colonización de ETEC patógenas en humanos. F= fimbria; f= fibrilla; NF= No fimbrial; H= helicoidal o dos fibrillas formando una hélice; CFs= factores de colonización; CS= antígenos de superficie de coli, PCF= factor putativo de colonización [16].

Las cepas de ETEC tienen gran especificidad por su huésped y el tropismo por el tejido que colonizan. Este tropismo es resultado de la expresión diferencial de CF's con especificidades a receptores diferentes [10,16].

Los CFs fueron clasificados estructuralmente (figura 4) en fimbrias y estructuras fibrilares, definiéndose como fimbrias a las estructuras rígidas, filamentosas hechos por más de 100 copias de la subunidad proteica, mientras que las estructuras fibrilares son de naturaleza flexible y más delgadas [16].



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura de los factores de colonización (CFs) en *E. coli*. (a) Fimbria de *E. coli* uropatogénica, (b) Fimbria CFA I, (c) Fimbria rígida enrollada, (d) Modelo de fibrilla de CF donde el sitio de unión se encuentra en el extremo terminal, (e) Modelo de Fibrilla de CF donde todas las subunidades tienen sitios de unión a receptor, (f) Modelo de fibrilla de K99, (g) Modelo de fimbrias CS5 y CS7 en forma de doble hélice [16].

Existen también otras clasificaciones de los factores de colonización dependientes de las relaciones genéticas y antigénicas (tabla 4) [16]. De esta clasificación, los miembros de la familia CFA/I se encuentran genéticamente relacionados y aunque parecen estar antigénicamente sin asociación existen reportes acerca de la identificación de epítopos comunes en esta familia de fimbrias [10, 17].

Los genes que codifican para los CFs forman parte de operones que contienen entre 8 y 11 genes; los operones involucrados en la síntesis de CFA/I, CS1, CS2, CS3 y CS6 fueron completamente caracterizados lo que permitió que algunas de las fimbrias puedan ser expresadas en otros organismos con la finalidad de diseñar vacunas contra ETEC [16]. Se conoce que existen diferentes factores que influyen en la expresión de los CFs, de entre los más importantes se encuentran la temperatura y las condiciones de crecimiento [16, 17]. De forma opuesta algunas investigaciones demostraron en medios de cultivo que metales como el Hierro tienen la capacidad de inhibir la expresión de CFA/I [18].

Es importante mencionar que la prevalencia de CFs de aislamientos de ETEC en pacientes con diarrea difiere entre las diferentes regiones geográficas (figura 5) [16].

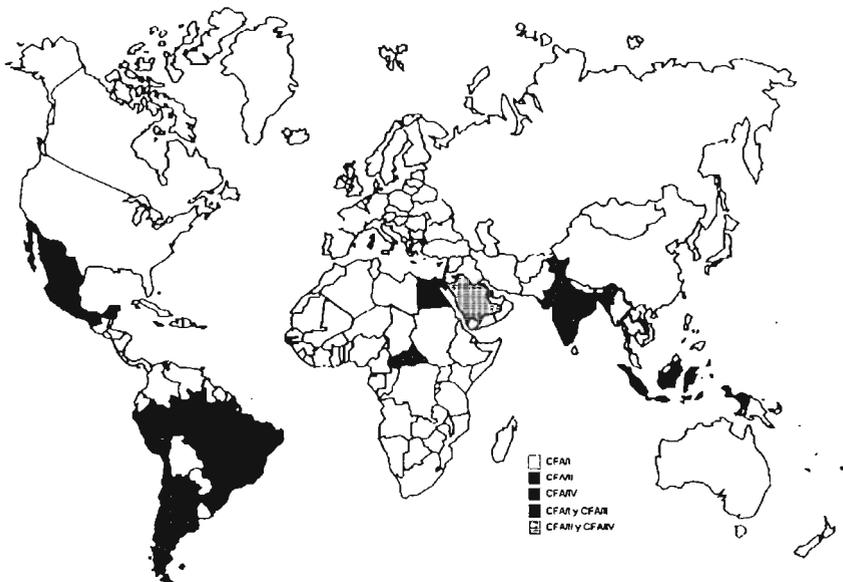


Figura 5. Distribución geográfica de los factores de colonización de ETEC humana [16, 17, 19].

En población Mexicana existen trabajos que señalan que la prevalencia de factores de colonización en cepas de ETEC aisladas de casos de diarrea son CFA/II seguido de CFA/III y CFA/IV [20, 21]. Una parte relevante de estos trabajos es el perfil toxigénico de la cepa de ETEC, reportándose, que las cepas de ETEC aisladas poseen predominantemente un perfil toxigénico ST/LT seguidas de aquellas productoras de LT y por último las que solamente expresan ST.

### 1.5 Inmunidad y protección

Como ya se mencionó con anterioridad, ETEC es una bacteria no invasiva y su eliminación por parte del huésped depende tanto de los mecanismos de inmunidad innata como específica. [22, 23].

#### a) Inmunidad Innata

Uno de los principales sitios de entrada para la mayoría de los microorganismos patógenos para el ser humano es la vía de las mucosas, ya sea de tracto respiratorio o gastrointestinal, y es en estos sitios donde se presentan los mecanismos de la inmunidad innata, los más importantes se mencionan a continuación de forma breve. La respuesta celular innata está integrada por las células fagocíticas profesionales (macrófagos y neutrófilos) encargadas de internalizar y destruir a los microorganismos; además se encargan de la secreción y producción de citocinas que estimulan la inflamación y las respuestas mediadas por linfocitos. Las células asesinas naturales (NK) destruyen células infectadas por virus y producen interferón gama (IFN- $\gamma$ ) que es un activador de macrófagos.

El sistema del complemento constituye una de las primeras líneas de defensa innata proteica que se pueden activar frente al microorganismo, ocasionando su lisis y favoreciendo su opsonización para la fagocitosis; es necesario recordar que el lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas es un importante activador del complemento por la vía alterna [22, 23]. Los monocitos/macrófagos juegan un papel crucial en la activación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Producen gran cantidad de moléculas reguladoras de la respuesta inmune: TNF- $\alpha$ , IL-1, 6, 8, 12, IFN- $\gamma$  o proteínas del complemento.

En cuanto la infección por ETEC, el primer mecanismo de inmunidad innata al cual se enfrenta la bacteria son las condiciones de acidez, moco, sales biliares y actividad enzimática además del peristaltismo lo largo del tracto digestivo.

#### b) Inmunidad Específica

La respuesta inmune específica o adquirida se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante y la respuesta inmune celular en la que los linfocitos T son fundamentales, pero es importante mencionar que no son eventos aislados y que existe colaboración para que se lleve a cabo el proceso de inmunidad. Ambas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos linfoides periféricos (principalmente ganglios linfáticos y bazo) mediante la interacción con la célula presentadora de antígeno (APC) que llega a estos órganos a través de la circulación linfática y desencadena tres principales fases [22, 23].

1. *Fase de reconocimiento*: Consiste en la unión del antígeno a los receptores específicos (CD) existentes en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B que median la inmunidad humoral, expresan moléculas de anticuerpos sobre su superficie, las cuales se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma nativa; los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, expresan los llamados receptores de célula T (TCR), que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre la APC. El reconocimiento por los linfocitos T CD4+ se lleva a cabo con moléculas del MHC clase II y los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos presentados por moléculas del MHC clase I.

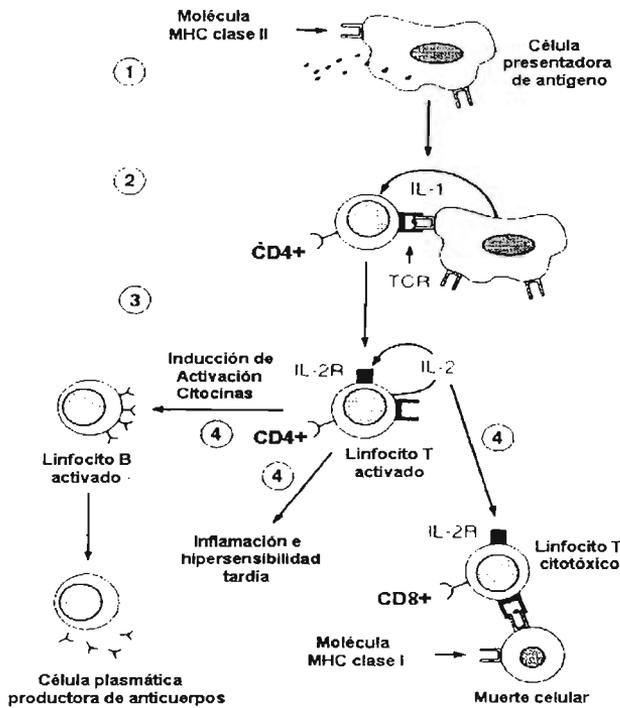
2. *Fase de activación*: Secuencia de eventos que se producen en los linfocitos como resultado del reconocimiento antigénico específico. Todos los linfocitos experimentan dos cambios fundamentales:

a) *Proliferación*: Expansión de los clones antígeno-específicos y amplificación de la respuesta protectora, en la que asume una función preponderante el linfocito T CD4+, capaz de activar a los linfocitos B y T CD8+.

b) *Diferenciación*: Etapa en la cual se forman las células efectoras y las de memoria. Las primeras producen diversas sustancias que pueden interactuar con el antígeno, como los anticuerpos y citocinas; las segundas son los linfocitos parcialmente diferenciados, es decir, que no llegan a convertirse en células efectoras.

3. *Fase efectora*: En esta fase, los linfocitos T diferenciados en células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de eliminación de los

patógenos, mientras los linfocitos B las ejecutan en los propios órganos periféricos. Muchas de estas acciones efectoras promueven la participación de células no linfoides y de mecanismos de inmunidad innata, a saber: anticuerpos opsonizantes que favorecen la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos PMN; anticuerpos que activan el sistema de complemento; inmunoglobulinas E que estimulan la degranulación de los mastocitos; citocinas segregadas por los linfocitos T, necesarios para estimular la inmunidad natural [22, 23]. En la figura 6 se resumen los eventos que se llevan a cabo en la respuesta inmune específica.

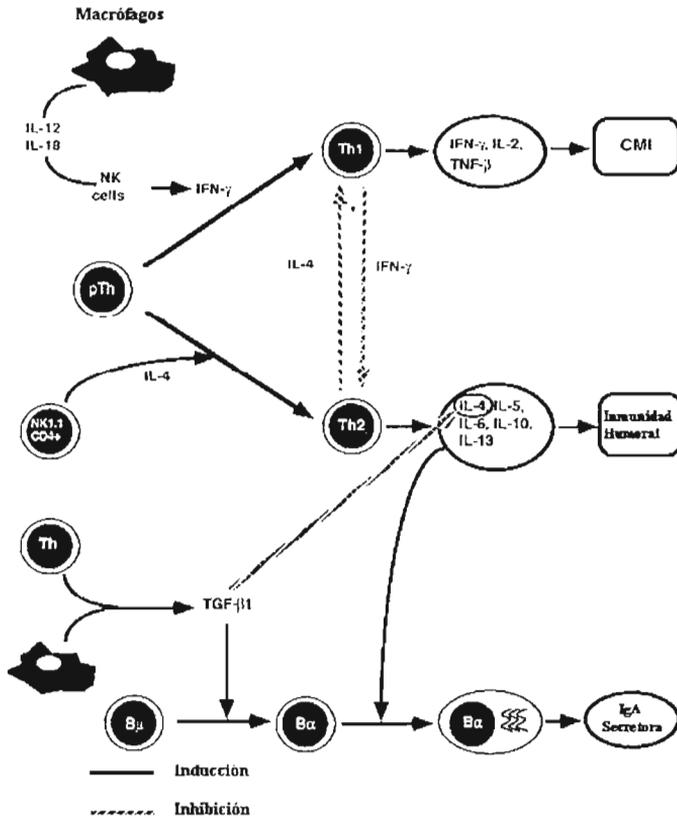


**Figura 6.** Respuesta inmune específica. 1) Procesamiento y presentación del antígeno por APC. 2) Presentación de antígeno a linfocito T CD4+, Interacción TCR-Antígeno-MHC II. 3) Activación y proliferación celular. 4) Activación de Linfocito B, Inflamación y DTH, activación del linfocito T citotóxico [22].

En la fase efectora de los linfocitos T CD4+ o linfocitos T colaboradores (Th) podemos diferenciar dos fenotipos dependiendo del perfil de citocinas que expresan, Th1 y Th2. Componentes bacterianos y virales tienen la capacidad de estimular a células de la respuesta inmune innata como los macrófagos para la producción de citocinas como IL-12 ó IL-18 y dirigir la diferenciación de los linfocitos Th hacia el fenotipo Th1 las cuales expresan IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  que son citocinas que median la respuesta inmune celular como la hipersensibilidad tardía (DTH), la activación de macrófagos y respuestas inflamatorias. Sin embargo, este tipo de respuesta también favorece la producción de algunas subclases de IgG que favorecen la opsonización y neutralización de virus [22, 23].

El fenotipo linfocitario Th2 se favorece por la presencia de IL-4 y muchas proteínas solubles tienen la capacidad de inducir este fenotipo; estas células secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y estimulan la producción de IgG1 e IgE (figura 7).

Tanto las respuestas de tipo Th1 como Th2 o ambas en conjunto son necesarias para la producción de IgA. Las respuestas de tipo Th2 se ha demostrado que son importantes en la diferenciación terminal de los linfocitos B (figura 7) [22, 23].



**Figura 7.** Funciones de las citocinas en la defensa del huésped. En la inmunidad específica las citocinas estimulan la proliferación y la diferenciación de los linfocitos estimulados por el antígeno y de la activación de células efectoras específicas como macrófagos [22].

La inmunidad humoral es la principal respuesta inmunitaria específica protectora frente a bacterias extracelulares, los anticuerpos realizan varias funciones que tienen como fin la eliminación de las bacterias, una de las principales funciones de los anticuerpos en contra de ETEC es la inhibición de la adhesión de la bacteria al epitelio intestinal, lo cual se logra mediante la unión de los anticuerpos a la fimbria y la inhibición de la unión a su receptor en las células epiteliales lo que provoca que la bacteria sea eliminada del huésped [22, 23].

### c) Respuesta Inmune frente a la infección

Varios estudios se han realizado para tratar de determinar las características de la respuesta inmune que se presenta frente a la infección natural por ETEC. Stoll y cols. [24] evaluaron la respuesta inmune local y sistémica a la infección adquirida de forma natural por ETEC en un área endémica; en este estudio se evalúan los anticuerpos contra algunos factores de colonización mas prevalentes y toxinas de la bacteria en diferentes muestras como saliva, suero, lavado intestinal y leche materna. La mayoría de los pacientes tuvo un incremento significativo en títulos de IgA contra LT, CFA (I o II) y LPS en estas diferentes muestras estudiadas, que alcanzó su pico máximo a los nueve días de la infección y decayó de manera importante al día 28; también se detectaron títulos altos de IgG en suero presentando el valor máximo al día 9 y manteniendo títulos constantes hasta el día 56. En este se sugiere que, aunque la respuesta humoral local (a nivel de mucosas) es de corta duración, el primo contacto con ETEC provoca una estimulación de la respuesta inmune de memoria. Wenneras y cols. [25] mostraron que la infección natural por ETEC produce un incremento de células secretoras de anticuerpos específicas para los factores de colonización, correspondientes a IgA predominantemente aunque también se producen del tipo IgG e IgM, este patrón es concordante en las diferentes muestras estudiadas como son los anticuerpos séricos, fecales y lavados intestinales.

En el año de 1990 Cravioto y cols. llevaron a cabo un estudio con población infantil mexicana y encontraron que el tipo de CFA que porta la cepa de ETEC durante la colonización inicial tiene relación a la adquisición de inmunidad natural contra una subsecuente infección por cepas productoras del mismo CFA [26]. López-Vidal y cols [20] en el mismo año también en población infantil mexicana, describen que la tasa

enfermedad/infección disminuye conforme la edad avanza, lo que sugiere el desarrollo de inmunidad protectora adquirida en la infección.

Un trabajo más reciente realizado por Steinsland y cols. [21] evaluó la protección conferida por la infección primaria por ETEC y la reinfección con cepas con el mismo perfil toxigénico y de factores de colonización, demostrando que la inmunidad fue conferida principalmente por los factores de colonización y la toxina termolábil de forma sinérgica

Existen diferentes estudios que muestran que la infección inicial con ETEC puede inducir la protección contra la reinfección por cepas de ETEC homólogas en cuanto a su perfil toxigénico y de factores de colonización [27], lo que corrobora trabajos previos [28] en los que se demostró un efecto protector sinérgico de los anticuerpos contra las enterotoxinas y los anticuerpos contra los factores de colonización de ETEC. A partir de estos estudios y muchos más han dirigido sus esfuerzos que apuntan a los factores de colonización como blancos para el diseño de vacunas contra la infección por ETEC.

#### d) Sistema linfoide asociado a mucosas (MALT)

El sistema inmune asociado a mucosas consiste en una serie de moléculas, células y estructuras linfoides organizadas que proveen inmunidad frente a patógenos que invaden las superficies de mucosas; es necesario recordar que uno de los primeros mecanismos de la respuesta inmune innata son las barreras mecánicas. La superficie de las mucosas es prominente, tanto en el tracto gastrointestinal genitourinario y respiratorio, además proveen portales de entrada para los patógenos [22, 23, 29].

Los sitios inductivos de mucosas en humanos son principalmente las placas de Peyer en el tracto gastrointestinal y el tejido linforeticular asociado a amígdalas y adenoides en la cavidad oro faringea; estos sitios se encuentran como centinelas y representan los sitios de inicio de la respuesta inmune de mucosas (figura 8). De entre las semejanzas que presentan estos dos sitios inductores se encuentran las células M y aunque su función no ha sido completamente establecida aún, se sugiere que están involucradas en la captura, transporte, procesamiento y posible presentación de antígenos. La interacción de células B y T con células epiteliales inductoras de la diferenciación a células M, lo que indica que estas interacciones son importantes para mantener las células M en el epitelio folicular [22, 23, 29].

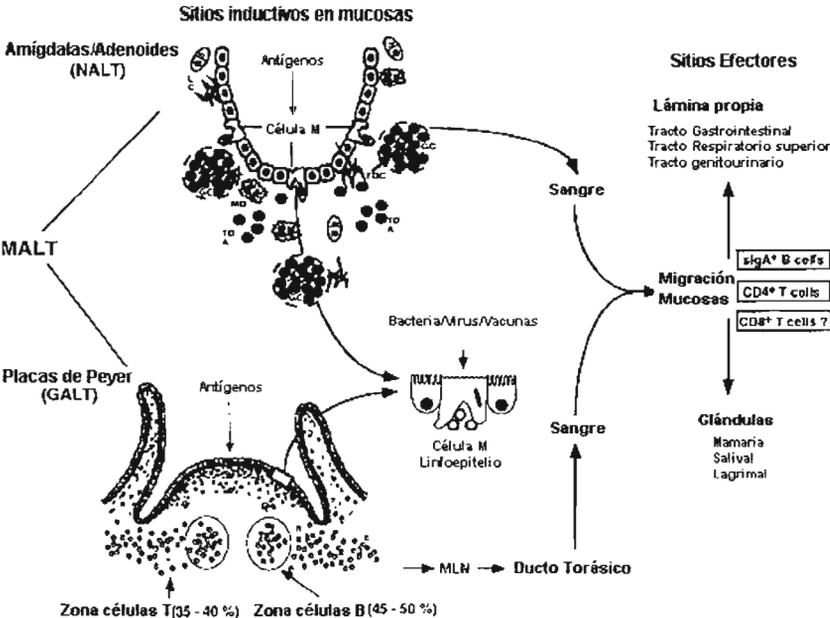


Figura 8. Células M y la inducción de inmunidad en mucosas [29].

Un aspecto de gran importancia es, que la exposición de antígenos en mucosas, activa a linfocitos T y B los cuales migran desde el sitio de inducción hasta varios sitios efectores de la mucosa. El sistema inmune común de mucosas involucra la migración de linfocitos antígeno-específicos a sitios efectores en mucosas diferentes del sitio inicial donde se llevó a cabo la exposición al antígeno. Debido a esto, diferentes rutas de inmunización como la oral, rectal, vaginal e intranasal pueden inducir respuestas inmunes generalizadas a nivel de mucosas; aunque se reportaron diferencias en cuanto a la vía de administración [29].

#### e) Modelos para evaluación de patogenicidad y vacunas

Debido a la importancia epidemiológica ocasionada por ETEC fue indispensable el desarrollo de modelos animales para conocer la patogenicidad del microorganismo así como para evaluar vacunas experimentales antes de su prueba en voluntarios humanos. A la fecha se han diseñado y ensayado diferentes modelos y entre los más importantes se encuentran los siguientes:

El primer modelo desarrollado para el estudio de la actividad de enterotoxinas fue el modelo de ratón adulto sellado (sealed adult mice), este modelo consiste en sellar el canal anorectal del ratón con cianoacrilamida y posteriormente llevar a cabo la administración oral de las bacterias o toxinas; el ratón es sacrificado, se remueve el intestino y se evalúa la acumulación de fluidos. Este modelo aunque tiene facilidades en cuanto a manejo de los animales tiene la desventaja principal de que se crea estrés en el ratón y con severas consideraciones éticas [30].

El segundo es la rata, como modelo fue desarrollado también para estudiar la diarrea ocasionada por ETEC; este modelo consiste en ligar diferentes regiones del intestino delgado e inocular la bacteria, posteriormente se evalúa el volumen de fluido acumulado por gramo de tejido intestinal este modelo se sometió a un proceso quirúrgico que afectó al animal con resultados poco confiables [31].

Gran número de los estudios iniciales acerca de la patogenicidad de ETEC estuvieron estrechamente relacionados con los estudios de *Vibrio cholerae* por la similitud de las infecciones y bajo esto; el cuarto modelo desarrollado fue el modelo RITARD [32] por sus siglas en inglés (removable intestinal tie-adult rabbit diarrhea); este modelo consiste en llevar a cabo un procedimiento quirúrgico en el que se liga la unión ileocecal de forma reversible; realizar la inoculación bacteriana en el yeyuno y después de dos horas se retira la ligadura y se evalúa la presencia de diarrea en el conejo. Es necesario hacer notar que aunque este modelo fue ampliamente utilizado tiene la limitante del proceso quirúrgico, que por menor que este sea produce un grado de estrés que puede afectar la respuesta inmune en el animal. Asimismo la cepa de conejo no se ha logrado unificar lo que se traduce en una gran variabilidad intra e interensayo.

El cuarto modelo propuesto fue para evaluar la infección por ETEC así como vacunas experimentales es el de Hámster sirio dorado [33], en el cual la infección se da en forma natural y por tanto no existe ningún procedimiento quirúrgico que añada un factor de estrés en el animal. En este modelo se ha probado la inmunización por vía intranasal y la infección por vía oral, evaluando posteriormente la excreción bacteriana a diferentes tiempos por coprocultivos. Sin embargo, cuenta con la desventaja de que no existen

reactivos biológicos disponibles comercialmente para este modelo, lo que limita el estudio de la respuesta inmune.

Por lo que para llevar a cabo el desarrollo de un modelo adecuado para el estudio de la infección por ETEC se debe tratar de que el proceso infeccioso se desarrolle de forma natural, que el manejo de los animales sea sencillo, reproducible, sin riesgos quirúrgicos con aprobación de los comités de ética y que se trate de no estresar al animal, etc.

El quinto modelo, seleccionado para realizar el estudio, fue el modelo murino de inmunización vía intranasal y reto por vía oral; este modelo representó la principal ventaja de que la infección se lleva de forma natural, previa inhibición de la acidez gástrica y que se pueden evaluar anticuerpos en mucosas, excreción bacteriana por coprocultivos, respuesta inmune celular en diferentes órganos del sistema inmune además de ser de fácil manejo.

### 1.7 Desarrollo de vacunas contra la diarrea ocasionada por ETEC

Debido a la importancia epidemiológica de ETEC, y el gran número de estrategias para la elaboración de una vacuna eficaz y segura contra la infección por esta enterobacteria. Una de las vacunas que a la fecha fue probada en voluntarios humanos de diferentes regiones geográficas fue la desarrollada en la Universidad de Gotemburgo en Suecia y está basada en la subunidad B de la toxina del cólera combinada con 5 cepas formalinizadas de ETEC que en su conjunto expresan los factores de colonización de mayor prevalencia epidemiológica en países en desarrollo, esta vacuna ha sido probada en estudios de fase I y fase II en diferentes poblaciones como Sueca, Israelí y Egipcia principalmente, en los

cuales se demostró que la vacuna fue eficaz para prevenir la diarrea ocasionada por ETEC aunque con varios reportes de efectos adversos tales como diarrea, nauseas y vómito en la población mas susceptible, además de presentó variabilidad de protección entre sus lotes [34, 35, 36].

Otras estrategias se basaron en el desarrollo de vacunas con bacterias vivas, como el trabajo desarrollado en el centro para desarrollo de vacunas (CVD) en la Universidad de Maryland, en los Estados Unidos de América (EUA), en el cual se llevó a cabo el desarrollo de vacunas que utilizaron como vector a *Shigella* sp para la expresión de factores de colonización y enterotoxinas de ETEC [37]. Actualmente, se cuenta con una vacuna con nueva tecnología de administración; un parche de inmunización transcutánea compuesto por un subcomponente de colonización y la subunidad B de la toxina termolábil (CS6 y B-LT); también fue probado en voluntarios humanos [38] y confirió una protección baja contra en la diarrea en los mismos.

Existen otro tipo de estrategias desarrolladas que incluyen vacunas formadas por factores de colonización encapsulados en microesferas, expresión de la subunidad B de LT en plantas de tabaco, papas, tomates y bananas, estos trabajos se encuentran en fase experimental y aunque sus resultados demostraron una buena eficacia en la estimulación de una respuesta inmune protectora será necesario realizar una evaluación del costo-beneficio de las mismas [1, 39, 40], así como la inmunidad a largo plazo.

López-Vidal [41], llevó a cabo la caracterización de epítomos lineales comunes para diferentes fimbrias de ETEC, mediante la síntesis de octapéptidos continuos que abarcaron

la secuencia completa de CFA/I por el método de Geysen en el que la síntesis de péptidos se llevó a cabo en palillos de polietileno de forma que cada uno de ellos correspondía a uno de los pozos de una placa de ELISA. Esta configuración permitió el estudio del reconocimiento por anticuerpos contra sueros de niños menores de cinco años que habían padecido la infección por ETEC, sueros de adultos de zonas endémicas y no endémicas, sueros hiperinmunes que fueron preparados mediante la inmunización de conejos con cepas de ETEC portadoras de diferentes factores de colonización y suero monoclonal anti-CFA/I. y el ensayo se realizó de forma similar a un ELISA. La mayoría de los sueros de los niños pertenecientes a la etapa convalescente reconocieron todos los octapéptidos, siendo mayor el reconocimiento para tres de estos, mismos que fueron reconocidos por el suero de un adulto perteneciente a un área endémica. Mientras que, el anticuerpo monoclonal anti-CFA/I no identificó ningún péptido. El reconocimiento de los octapéptidos se denominó epítomos.

La identificación de epítomos continuos y comunes en CFA/I por sueros hiperinmunes heterólogos fue muy variable y dependía de cada uno de los sueros encontrándose que los factores de colonización con mayor similitud y que presentaron respuesta antigénica cruzada fueron CFA/I, CS1, CS3, CS4 y el factor putativo de colonización O166 (PCFO166) y que en estos parte de la secuencia del epítomo lineal común (CLE) estuvo reconocida. El CLE fue seleccionado debido a que fue reconocido por el 100% de los sueros de niños después de la infección natural y por sueros de adultos de áreas endémicas para ETEC. A partir de este hallazgo en nuestro laboratorio se desarrolló la vacuna peptídica (CLE) de los factores de colonización con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) cuya administración fue la vía intranasal.

# **JUSTIFICACIÓN**

## 2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se estima que mundialmente ocurren 210 millones de episodios de diarrea anuales ocasionados por *Escherichia coli* enterotoxigénica, de los cuales 380,000 episodios terminan en defunciones, principalmente en niños menores de 5 años.

Diversos tipos de vacunas contra la diarrea ocasionada por ETEC demostraron eficacia protectora pero con efectos secundarios. Otro problema importante a considerar en el diseño de estas vacunas deberá incluir la variabilidad en la prevalencia de los diferentes factores de colonización que se expresan en los diversos serotipos. La alternativa presente comprende la secuencia proteica común reconocida por la respuesta inmune a la infección natural por ETEC en los humanos y entre los diferentes CFs acompañando de la subunidad de B de *Vibrio cholerae* por exposición intranasal es una alternativa interesante a evaluar.

# **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

- Caracterizar la respuesta inmune inducida por la inmunización intranasal del epítipo lineal común a los factores de colonización de ETEC acompañado de la subunidad B de la toxina del cólera en modelo murino.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Inmunización intranasal de ratones BALB/c con el epítipo lineal común con y sin la subunidad B de la toxina del cólera.
- Realizar el reto por vía gástrica con la cepa de *Escherichia coli* enterotoxigénica H10407.
- Evaluar la excreción de *Escherichia coli* enterotoxigénica H10407 por coprocultivos e identificación por la prueba de hemaglutinación en presencia de D-manosa.
- Determinar la activación de células T aisladas de bazo, ganglios linfáticos cervicales, ganglios linfáticos inguinales y placas de Peyer por proliferación celular.
- Caracterizar la respuesta inmune mediante la determinación de las subpoblaciones linfocitarias y el perfil de citocinas de las células T por citometría de flujo.

# **METODOLOGÍA**

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Bacteria**

La cepa de ETEC que se utilizó fue la H10407 (O78:H11:CFA/I:LT<sup>+</sup>:ST<sup>+</sup>), fue crecida en medio tripticase soya (TSB) (BBL, Microbiology Systems) suplementado con 15% (p/v) de glicerol. Después de 24 hrs las bacterias fueron concentradas y almacenadas a -70° C hasta su uso. Para la infección la cepa de ETEC H10407 fue cultivada en placas de agar CFA a 37° C de 18 a 24 hrs. Se realizó la prueba de hemaglutinación del grupo A en presencia de D-manosa para determinar la presencia de CFA/I como fue reportado [42]. Brevemente, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica ( $10^{10}$  UFC/mL) y se colocaron 10µL en un portaobjetos, posteriormente se agregó un volumen de 10µL de una suspensión al 5% de eritrocitos humanos del grupo A con y sin 1% de D-manosa, se mezclaron ambas suspensiones y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 5 minutos a 0° C para leer la presencia o ausencia de la hemaglutinación. Posterior a la identificación, las bacterias fueron suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril pH 7.2 en agitación suave y almacenadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. El inóculo bacteriano fue ajustado  $1.2 \times 10^9$  UFC/ml mediante la escala estándar de McFarland; equivalente al tubo número 4 de dicha escala.

### **4.2 Epítipo lineal común (CLE) y subunidad B de la toxina del cólera (CTB)**

El CLE (patente en proceso) es un péptido sintético de 20 aminoácidos y su síntesis fue realizada por Bio-Syntesis, inc., con una pureza mayor al 70% corroborada por HPLC y espectrofotometría de masas. La cantidad de 1 mg de CTB en un volumen final de 4mL de PBS fue obtenida de Merieux, Francia.

### **4.3 Animales**

Ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, libres de patógenos fueron obtenidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del INCMNSZ en cajas de microaislamiento, provistos con alimento estéril y agua suficiente. La investigación fue conducida de acuerdo con los estatutos federales y regulaciones relacionadas a los animales y los experimentos que involucran animales. Los ratones fueron distribuidos al azar para la formación de cuatro grupos con quince animales en cada uno de ellos.

#### **4.3.1 Inmunización**

La inmunización se realizó vía intranasal (IN) en tres ocasiones a los 0, 7 y 28 días. Se administró un volumen de 7.5  $\mu$ L por goteo en los orificios de la nariz con micropipeta (Pipetman P-200 Rainin Instrument Inc., Woburn, MA) de la solución a evaluar en el siguiente orden: Grupo 1-PBS (control); Grupo 2-CLE (50  $\mu$ g/mL); Grupo 3-CTB (6  $\mu$ g/mL); Grupo 4-CLE+CTB (50 y 6  $\mu$ g/mL respectivamente).

#### **4.3.2 Reto**

El reto (infección) se realizó una semana después de la última inmunización. Antes del reto los animales se mantuvieron en ayuno durante 48 hrs. Los ratones fueron administrados intramuscularmente con cimetidina (Tagamet®) a una dosis de 30mg/kg para neutralizar el ácido gástrico. Después de 1 hora de la administración de la cimetidina, los ratones fueron retados oralmente con un inóculo de  $6 \times 10^8$  UFC de la cepa H10407 de ETEC. Los ratones del grupo control recibieron solamente PBS de forma oral. Posterior al reto, los animales se colocaron en sus respectivas cajas y se les suministró alimento y agua.

### **4.3.3 Seguimiento de los ratones retados con ETEC H10407**

#### *a) Excreción de ETEC*

Para evaluar la excreción de ETEC en heces se practicaron coprocultivos por exudado rectal y el hisopado fue inoculado en medio MacConkey (Gibco); las placas fueron incubadas durante 24 hrs a 37° C. El coprocultivo se realizó desde el día anterior al reto (día 0) hasta siete días después del mismo, se llevó la selección al azar de 5 colonias por cuadrante del cultivo las cuales fueron identificadas por la prueba de hemaglutinación en presencia de D-manosa; de igual forma a lo expuesto en el punto 5.1. El porcentaje de excreción bacteriana se evaluó por cuadrantes considerando la cantidad de cuadrantes en los cuales las 5 colonias seleccionadas fueron ETEC y se consideró la siguiente escala: 1, 25%, 2, 50%, 3, 75% y 4, 100%.

#### *b) Evaluación de la diarrea*

La diarrea de los animales fue evaluada de acuerdo a la gravedad: 0, sin diarrea; 1, pérdida de la consistencia de las heces pero sin la cola mojada; 2, región perianal y cola húmedas y; 3, cola, patas y abdomen bajo mojados y con apariencia inactiva [33].

### **4.4 Obtención, conteo y viabilidad celular**

Las células del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos inguinales y las placas de Peyer fueron obtenidas de los ratones el día 7 después del reto con ETEC H10407. Se realizó una poza de los órganos iguales para cada grupo de ratones. El bazo, los ganglios linfáticos cervicales y los ganglios linfáticos inguinales de los ratones inmunizados y retados fueron perfundidos con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y conteniendo 1% de una solución

antibiótica y antimicótica (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y desagregados por acción mecánica, posteriormente se llevó cabo una concentración de las células centrifugando la suspensión a 1,000 rpm durante 10 min. El tejido correspondiente a las placas de Peyer fue cortado en pequeños fragmentos (3mm aproximadamente) y colocado en solución salina balanceada Hanks (HBSS) con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 5mM. El tejido se sometió a agitación vigorosa durante 1h a 37° C; posteriormente, la suspensión fue filtrada a través de una malla de nylon para eliminar los detritos y centrifugada a 1,000 rpm durante 10 min para concentrar. Las suspensiones resultantes de ambos procesos fueron lavadas dos veces con medio RPMI-1640 y se evaluó la viabilidad por exclusión de colorante azul de tripano; posteriormente, las suspensiones fueron ajustadas a  $1 \times 10^6$  células /mL en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor.

#### **4.5 Ensayo de Proliferación celular**

Las suspensiones celulares ajustadas, obtenidas de cada órgano, fueron distribuidas en placas para cultivo celular de 96 pozos a una concentración final de  $1 \times 10^5$  células/pozo. Un volumen de 100µL de los antígenos solubles (CLE, CTB, CLE+CTB y fitohemaglutinina) fueron adicionados a una concentración final de 5 µg/ pozo; el volumen final de cada pozo fue de 200 µL. Las placas fueron incubadas a 37° C por cuatro días en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

#### **4.6 Marcadores de superficie celular**

Al término de la proliferación celular, las células de cada pozo fueron transferidas a tubos para citometría de flujo y fueron lavadas en dos ocasiones con PBS centrifugando a 1,000

rpm durante 10 minutos. Posteriormente las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales de rata y que reconocen marcadores de superficie celular de ratón, tales como  $\alpha$ -CD3 acoplado a ficoeritrina (R-PE),  $\alpha$ -CD8 acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y  $\alpha$ -CD4 acoplado a FITC, (Pharmigen BD). Para el marcaje de moléculas de superficie CD3, CD4 y CD8, a cada tubo conteniendo la suspensión celular se agregó 2 $\mu$ L de la mezcla de anticuerpos correspondiente (CD3-CD8 y CD3-CD4, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante), los tubos fueron incubados durante 30 min a 4° C en la oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se analizaron por citometría de flujo (ver punto 4.8)

#### **4.7 Citocinas Intracelulares**

Después de la proliferación durante 4 días, las células de los pozos fueron lavadas dos veces con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado al calor, 1% de solución antibiótica y antimicótica (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) conteniendo 3mg/mL de berfeldina A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), posteriormente fueron incubadas durante 16 horas más y posterior a este tiempo las células fueron transferidas a tubos para citometría y tratadas con una solución fijadora y permeabilizadora citofix/citoperm (BD Bioscience, NJ, USA), después las células fueron lavadas con citoperm y solución de lavado (BD Bioscience, NJ, USA) centrifugando durante 10 min a 1,000 rpm. Finalmente, cada tubo conteniendo la suspensión celular fue incubado con los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  acoplado a FITC ,  $\alpha$ -IL-4 acoplado a R-PE e  $\alpha$ -IL-10 acoplado a alopiocianina (APC), (Pharmigen BD) durante 30 min a 4° C (las cantidades fueron las recomendadas por el fabricante). Después de la tinción, las células fueron

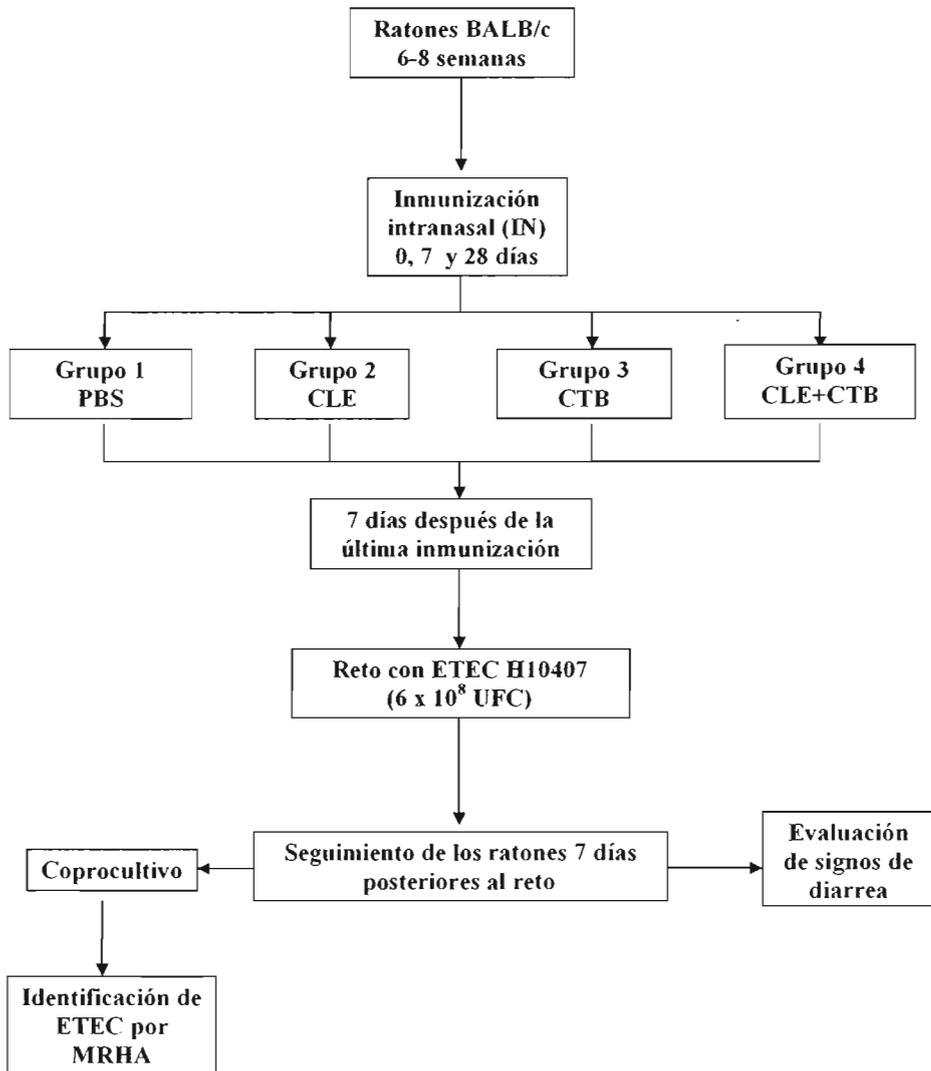
lavadas dos veces en PBS centrifugando durante 10 min a 1,000rpm y fijadas con una solución al 4% de p-formaldehído. Las células fueron mantenidas a 4° C en la oscuridad durante 16 h antes de su análisis.

#### **4.8 Análisis de fluorescencia, granularidad y tamaño por CF**

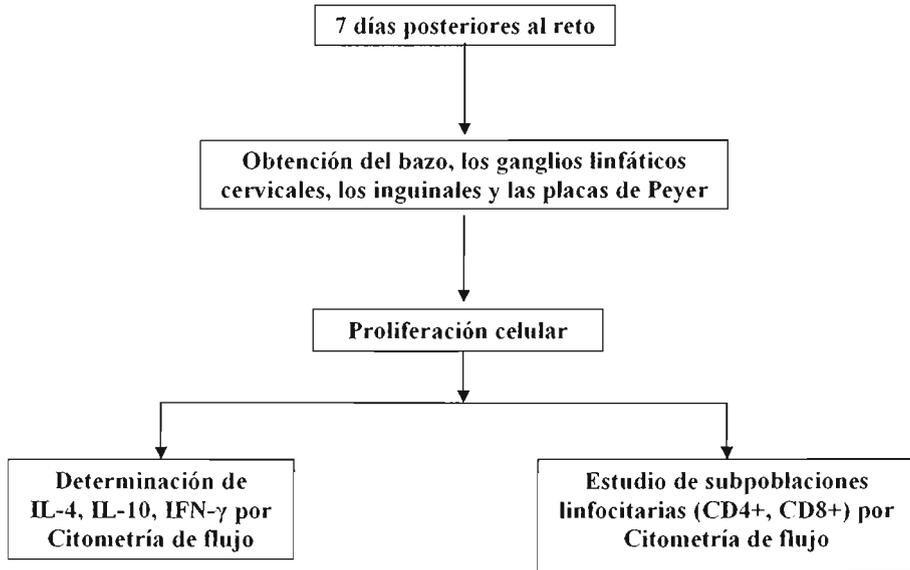
Las células fueron leídas en el citómetro de flujo, en el caso de los marcadores de superficie se seleccionó la población linfocitaria mediante el tamaño, granularidad y CD3+. Para determinar el porcentaje de linfocitos, se registró un total de 10,000 eventos para cada muestra. En el caso de las citocinas intracelulares la población linfocitaria fue seleccionada mediante el tamaño y granularidad. Los resultados obtenidos del citómetro de flujo FACS Epics Altra y se analizaron 10,000 eventos con Expo 2.0 software (Coulter, CA, USA).

#### 4.9 Esquema general de la metodología

##### Fase I



**Fase II**



# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Seguimiento de los ratones post-reto con ETEC.

Después del reto por vía oral con  $6 \times 10^8$  ETEC por ratón, para los grupos de ratones estudiados, se realizó el seguimiento durante siete días, en los que se estudiaron la presencia de diarrea y el tiempo de excreción de ETEC por coprocultivo. En la tabla 6 se muestra los resultados de la presencia de diarrea, y los porcentajes de coprocultivos positivos a ETEC.

Día	Grupo	Presencia de	
		ETEC en heces	Diarrea
0	Todos	-	0
1	Todos	++++	0
3	Control	+++	1
	CLE	++	1
	CTB	++	1
	CLE + CTB	+	0
4	Control		0
	CLE	-	1
	CTB		0
	CLE + CTB		0
7	Todos	-	0

**Tabla 6.** Seguimiento de los ratones después de la infección con ETEC H10407. Donde - = negativo; + = 25%, ++ = 50%; +++ = 75%; ++++=100%; 0 = sin diarrea; 1 = pérdida de la consistencia de las heces pero sin la cola mojada; 2 = región peri anal y cola húmedas y 3 = cola, patas y abdomen bajo mojados y con apariencia inactiva.

En relación a la excreción de ETEC evaluada por la selección de 5 colonias individuales de cada uno de los cuadrantes del cultivo obtenido de cada animal, se observó que al día 1, en todos los grupos de animales se presentaron coprocultivos positivos en el 100%, ya que de las 20 colonias seleccionadas de cada animal de cada grupo de estudio fueron ETEC. En el tercer día los coprocultivos positivos fueron del 75% para el grupo control; 50% en los

grupos inmunizados con CLE y CTB y del 25% en el grupo inmunizado con CLE+CTB. A partir del cuarto día los coprocultivos para ETEC fueron negativos en todos los grupos estudiados.

La presencia de diarrea en los ratones posterior a la infección con ETEC fue observada únicamente con un cambio de consistencia de las heces para los grupos control, CLE y CTB en el día 3 y solo el grupo inmunizado con CLE continuó en el cuarto día. A partir del quinto día, la consistencia en las heces fue normal en todos los grupos.

### 5.2 Obtención de linfocitos.

Una vez obtenidos los órganos se realizaron pozas correspondientes de cada grupo de animales. El rendimiento de los linfocitos obtenidos por órgano estudiado se muestra en la tabla 7 cuya viabilidad celular fue superior al 90%.

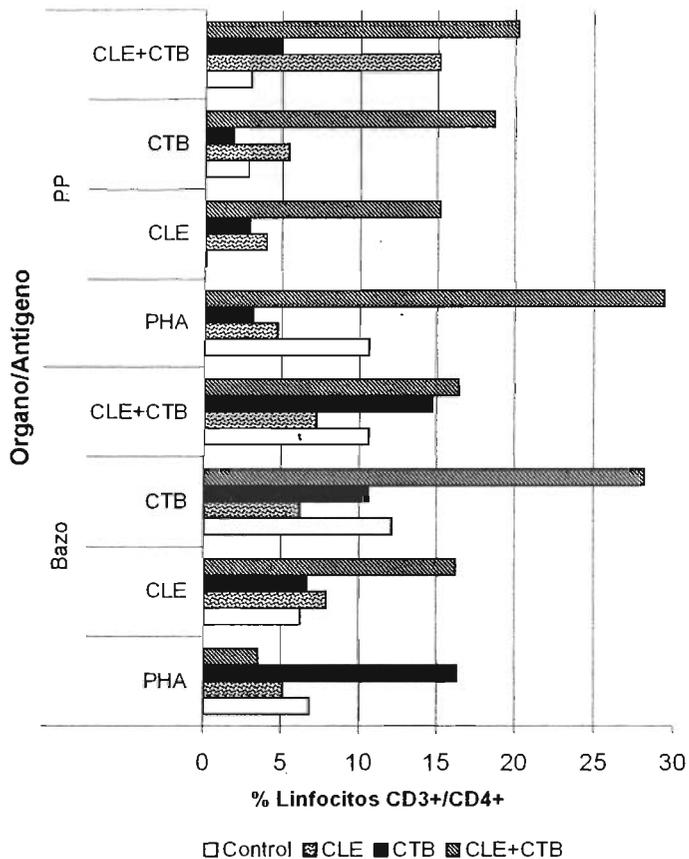
Órgano \ Grupo	Rendimiento de linfocitos (células x 10 <sup>6</sup> /mL)			
	Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	7.8	8.2	9.7	9.3
GLI	4.3	5.0	5.8	7.0
GLC	5.2	7.4	4.4	5.8
PP	2.5	1.4	2.7	2.0

**Tabla 7.** Rendimiento linfocitario de los órganos de los ratones estudiados. GLI = Ganglios linfáticos inguinales, GLC = Ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer.

### 5.3 Determinación de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

Posterior a la infección con ETEC y al seguimiento de 7 días; se obtuvieron los ganglios linfáticos inguinales, los ganglios linfáticos cervicales y las placas de Peyer; sus linfocitos

fueron proliferados con los antígenos vacunales y fitohemaglutinina y se determinaron las subpoblaciones linfocitarias.



**Figura 9.** Porcentaje de linfocitos T CD4+ en el bazo y las placas de Peyer para los antígenos: PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera y la combinación CLE+CTB.

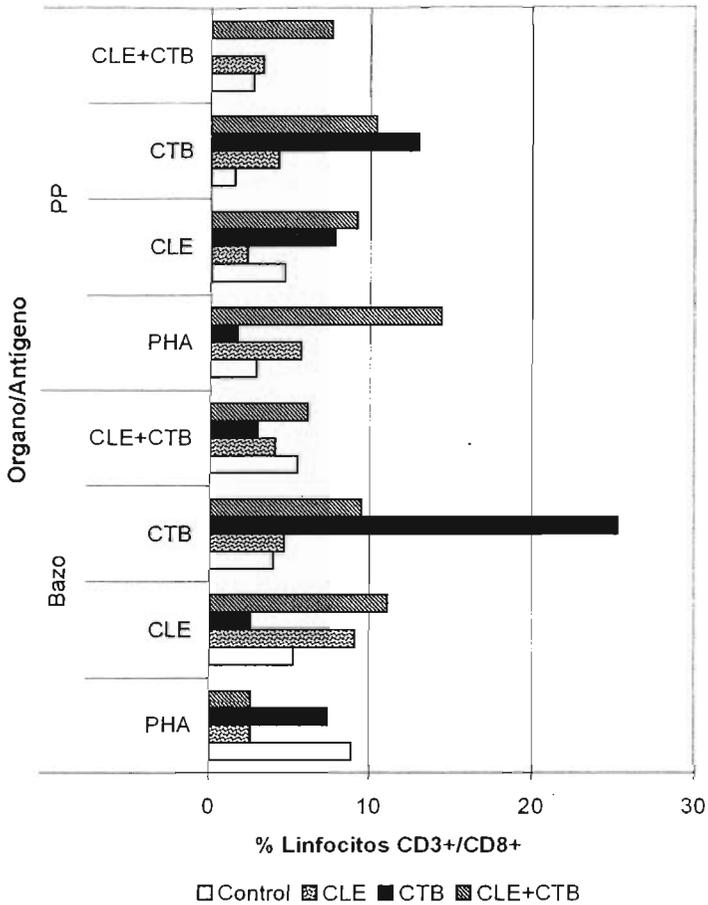
Tanto en el bazo como en las placas de Peyer el incremento para la subpoblación de linfocitos T CD4+ fue mayor en el grupo inmunizado con CLE+CTB con respecto al grupo control (figura 9), esta diferencia encontrada fue independiente del antígeno con el cual las

células fueron proliferadas. El mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ fue obtenido en el grupo vacunado con CLE+CTB en presencia de la fitohemaglutinina para las placas de Peyer el cual fue de 29.4%, el incremento observado fue de 1.5 veces comparado con el grupo control. En relación a la mayor respuesta de linfocitos T CD4+ en el bazo, mismo grupo utilizando el CTB como antígeno de proliferación fue de 28.2% que representó un incremento de 1.3 veces comparado con el grupo control.

Adicionalmente, en la figura 10 se muestran los porcentajes de linfocitos T CD8+ del bazo y las placas de Peyer, por antígenos. Es importante señalar que sólo se muestran las proliferaciones celulares de mayor magnitud.

La respuesta de linfocitos T CD8+ (figura 10) fue inferior comparada con la proliferación observada para los linfocitos T CD4+ (figura 9) en todos los grupos de estudio. En la figura 10 se muestra que el incremento de linfocitos T CD8+ fue elevado especialmente en el grupo inmunizado con CLE+CTB; exceptuando el porcentaje de linfocitos T CD8+ en el bazo para el grupo inmunizado con CTB en presencia del CTB y PHA como antígenos de proliferación. En las placas de Peyer se obtuvo un incremento mayor en el grupo inmunizado con CTB estimulados con CTB.

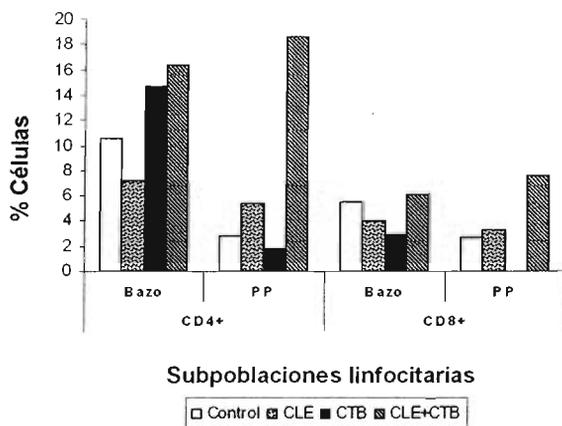
En las placas de Peyer el incremento de linfocitos T CD8+ fue mayor para el grupo inmunizado con CTB, en las placas de Peyer el incremento fue del 7.7 veces y de 5.3 veces en el bazo cuando los linfocitos fueron estimulados con CTB.



**Figura 10.** Porcentaje de linfocitos T CD8+ en el bazo y las placas de Peyer (PP) para los antígenos PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera y la combinación CLE+CTB.

La proliferación en los ganglios linfáticos cervicales e inguinales fue pobre, por lo que la grafica solo se señalan aquellos que presentaron igual o mayor proliferación al compararse con la PHA como lo fueron las placas de Peyer y el bazo.

Dado que nuestro estudio esta específicamente dirigido a caracterizar la respuesta inmune de la vacuna compuesta por el péptido de CLE y el adyuvante mucosal CTB, en la figura 11 y tabla 10 (apéndice) se conjuntaron los resultados de las proliferación de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ tanto para las placas de Peyer como del bazo, ya que se observó fueron los órganos con mayor grado de proliferación celular.



**Figura 11.** Subpoblaciones linfocitarias específicas a CLE+CTB del bazo y las placas de Peyer en todos los grupos estudiados.

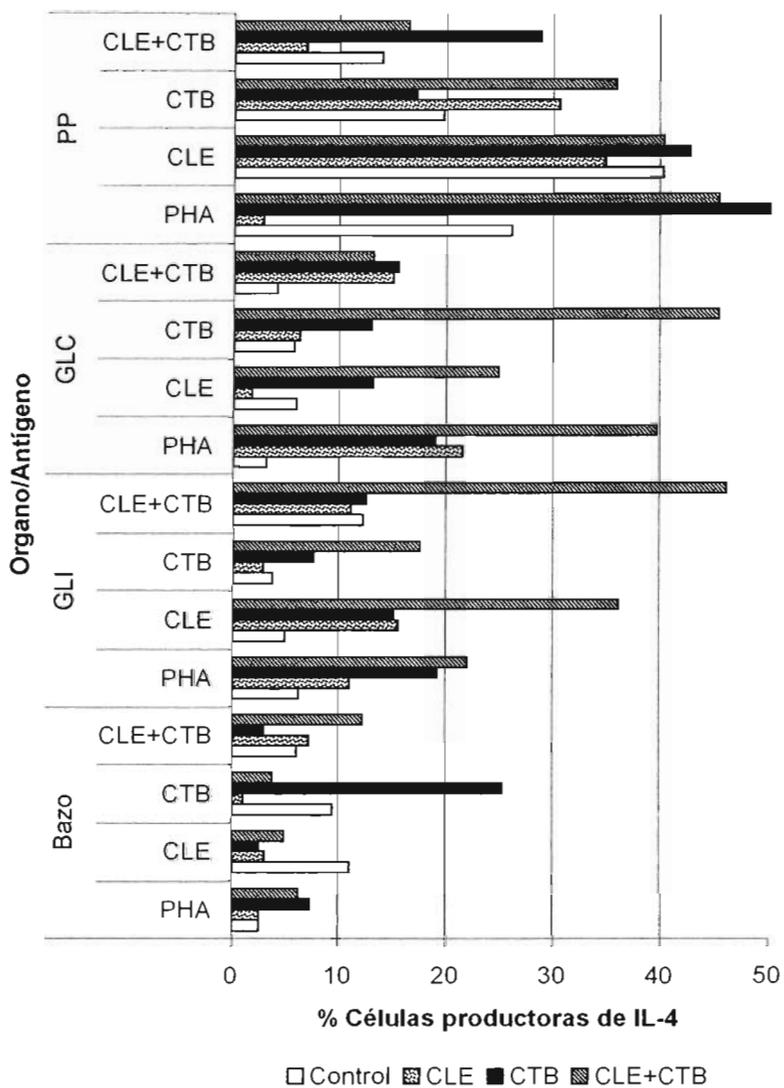
Como se muestra en la figura 11, el porcentaje de linfocitos T CD4+ fue mayor que el porcentaje de linfocitos T CD8+ tanto en el bazo como en las placas de Peyer en los grupos estudiados. Con respecto a la respuesta de linfocitos T CD4+ y T CD8+ fueron superiores para el grupo inmunizado con CLE+CTB en comparación con los otros grupos. Con respecto al grupo control, el grupo inmunizado con CLE+CTB presentó un incremento de linfocitos T CD4+ de 0.5 (5.8%) veces en el bazo y 5.7 (15.9%) veces en las placas de Peyer. Este incremento se observó también para los linfocitos T CD8+ en el grupo

CLE+CTB con 0.1 (0.6%) veces en el bazo y 1.8 (4.9%) veces en las placas de Peyer; al compararse con el grupo control (figura 11).

#### 5.4 Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo.

Una vez determinados los porcentajes de proliferación de los linfocitos T CD4+ y T CD8+, lógicamente la siguiente pregunta fue determinar que citocinas eran las participantes, por lo que en la figura 12 se muestra el porcentaje de células productoras de la citocina IL-4 para los diferentes grupos estudiados con cada antígeno de proliferación por órgano, determinado por citometría de flujo.

En la figura 12 se muestra el porcentaje de células productoras de IL-4 del bazo, los ganglios linfáticos inguinales y cervicales y las placas de Peyer de los diferentes grupos de estudio. Se observó un claro incremento de células productoras de IL-4 en todos los órganos estudiados, el incremento en los cuatro órganos de estudio fue mayor a la proliferación con PHA, dicho incremento fue mayor nuevamente en el grupo inmunizado con CLE+CTB; y en algunos para el grupo inmunizado con CTB. En las placas de Peyer el grupo que presentó el mayor incremento de células productoras de IL-4 en comparación con el grupo control fue el inmunizado con CTB, siendo de 1.1 veces mayor cuando los linfocitos fueron estimulados con CLE+CTB.

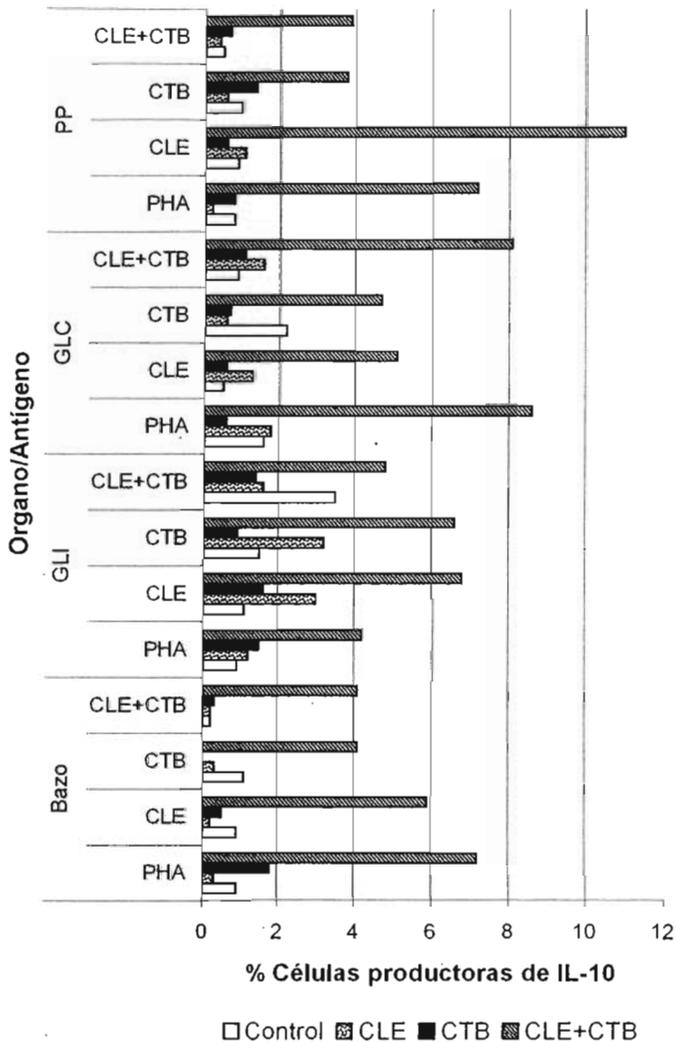


**Figura 12.** Porcentaje de IL-4 en el bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos cervicales de los grupos en estudio. IL-4= Interleucina 4, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

En los ganglios linfáticos cervicales (GLC) la mayor respuesta de células productoras de IL-4 fue obtenida para el grupo inmunizado con CLE+CTB; en presencia de CTB se observó el incremento de 6.8 veces con respecto al control. En los ganglios linfáticos inguinales (GLI), el incremento presentado para el grupo inmunizado con CLE+CTB fue de 6.2 veces en presencia de CLE como antígeno de proliferación.

Por último, en el bazo la proliferación de células productoras de IL-4 fue menor que en el resto de los órganos estudiados, pero aún así se aprecian claras diferencias entre los grupos; el mayor incremento en el porcentaje de células productoras de IL-4 fue determinado para el grupo inmunizado con CTB siendo de 1.7 veces mayor con respecto al grupo control con el antígeno de CTB. Finalmente es importante señalar que el porcentaje fue variable dependiendo del órgano de estudio y del antígeno con el cual fueron proliferadas las células.

La figura 13 muestra el porcentaje de células productoras de la citocina IL-10 para los diferentes grupos estudiados con cada antígeno de proliferación por órgano, así como se observa que la respuesta fue claramente menor que la obtenida para la citocina IL-4 y los porcentajes de células productoras de IL-10 fueron menores que para IL-4 (figura 12) en todos los grupos estudiados e independientemente del antígeno de proliferación. La diferencia que existe entre el grupo inmunizado con CLE+CTB fue clara y los demás grupos, siendo mayor el incremento de células productoras de IL-10 en las placas de Peyer con respecto al resto de los órganos.

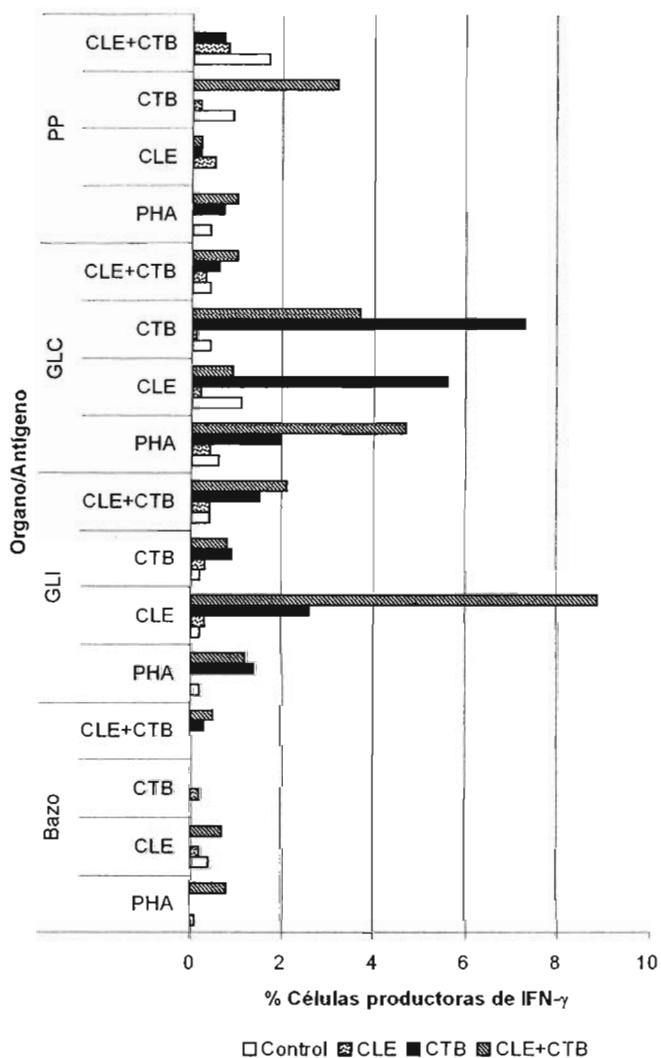


**Figura 13.** Porcentaje de IL-10 en el bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos cervicales de los ratones. IL-10= Interleucina 10, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitoheماغlutinina, CLE= Epítoto lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

En cuanto a las placas de Peyer, el grupo inmunizado con CLE+CTB mostró el mayor incremento en la producción de IL-10, recalculado en 11.2 veces mayor en comparación con el grupo control, al antígeno CLE. En los ganglios linfáticos cervicales se detectó un incremento de 9.2 veces mayor en porcentaje de células productoras de IL-10 en el grupo inmunizado con CLE+CTB con respecto al control utilizando el CLE como antígeno de proliferación.

La respuesta en los ganglios linfáticos inguinales, al igual que en el resto de los órganos estudiados fue mayor para el grupo inmunizado con CLE+CTB, con un incremento de 5.2 veces comparado con el grupo control, utilizando el CLE como antígeno de proliferación. La respuesta observada en el bazo fue similar a la presentada en los demás órganos estudiados y se observó claramente el predominio del incremento de células productoras de IL-10 para el grupo inmunizado con CLE+CTB; cuyo incremento fue de 19.5 veces utilizando CLE+CTB como antígenos de proliferación, comparado con el grupo control. De esta forma, tanto en la figura 9 como en la 10 se observó el incremento en las subpoblaciones linfocitarias productoras de IL-4 e IL-10.

La figura 14 muestra el porcentaje de células productoras de la citocina IFN- $\gamma$  para los diferentes grupos estudiados con cada antígeno de proliferación y del órgano.



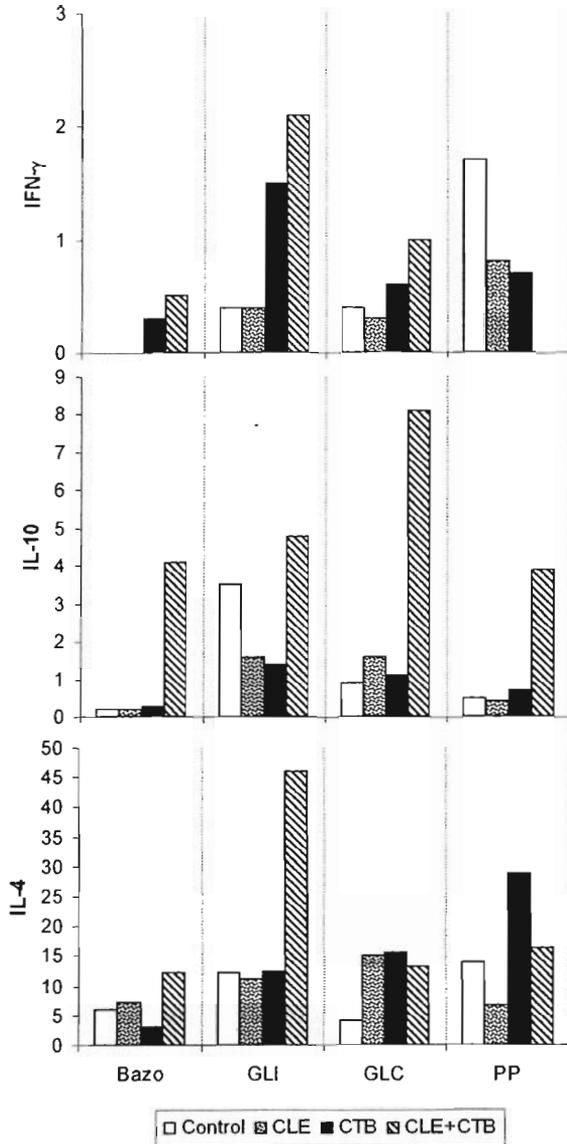
**Figura 14.** Porcentaje de IFN- $\gamma$  en el bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos cervicales de los ratones. IFN- $\gamma$ = Interferón gama, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epitopo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

De forma general, la respuesta para IFN- $\gamma$  (figura 14) fue pobre para todos los grupos independientemente del órgano estudiado y del antígeno para la proliferación, así como para el control positivo con PHA. También se observó que la proliferación en el bazo y en las placas de Peyer fue casi nula lo que se corrobora con el porcentaje de células productoras de INF- $\gamma$  en presencia de PHA.

Sin embargo, en los ganglios linfáticos cervicales, la mayor respuesta fue obtenida en el grupo inmunizado con CTB, con el incremento de 17.3 veces en la producción de IFN- $\gamma$  cuando los linfocitos proliferaron en presencia de CTB con respecto al grupo control. En los ganglios linfáticos inguinales el grupo inmunizado con CLE+CTB presentó el incremento aproximado de 40 veces utilizando CLE como antígeno de proliferación comparado con el grupo control.

De las figuras 12 a 14 y las tablas 11 a 13 (apéndice) al igual que en el caso de las subpoblaciones linfocitarias; se tomaron los resultados correspondientes a los valores de proliferación en presencia del CLE+CTB, de esta forma, las citocinas que se evaluaron fueron producto de linfocitos específicos a ambos antígenos de la vacuna.

En la figura 15 y tabla 14 (apéndice) se muestra el porcentaje de células productoras de citocinas en cada grupo de estudio dependiendo del órgano.



**Figura 15.** Citocinas intracelulares de linfocitos específicos a CLE+CTB del bazo, los ganglios linfáticos inguinales, los ganglios linfáticos cervicales y las placas de Peyer en todos los grupos estudiados.

Como se aprecia en la figura 15, la producción de IL-4 mostró un incremento considerable para el grupo inmunizado con CLE+CTB principalmente en el bazo y los ganglios linfáticos inguinales (1 y 2.8 veces respectivamente) en comparación con el grupo control. La respuesta en los ganglios linfáticos cervicales y las placas de Peyer fue mayor para el grupo inmunizado solo con CTB, aunque, el grupo CLE + CTB mostró un aumento en la producción de IL-4 en comparación al grupo control (2.1 y 0.2 veces respectivamente).

En cuanto a la respuesta para IL-10, se observó un incremento de esta citocina en todos los grupos con respecto al control, aunque este incremento fue menor que el observado para IL-4. El grupo que mostró un mayor aumento fue el inmunizado con CLE + CTB en comparación con el grupo control siendo de 19.5, 0.4, 8 y 6.8 veces mas en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos inguinales y las placas de Peyer respectivamente. El mayor porcentaje de células productoras de IL-10 fue obtenido en los ganglios linfáticos cervicales (8.1%) para el grupo CLE+CTB.

Finalmente aunque los porcentajes de células productoras de IFN- $\gamma$  fueron muy pobres en todos los órganos estudiados se observó un incremento en los ganglios linfáticos cervicales e inguinales con respecto al grupo control de 1.5 y 4.3 veces respectivamente. Tanto en el bazo como en las placas de Peyer no se observaron diferencias en la respuesta de IFN- $\gamma$ .

# DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Seguimiento de los ratones

En cuanto al periodo de excreción de cultivo puro observado al primer día después del reto se explica como una multiplicación bacteriana temprana, y ausente de otros signos de diarrea. Las diferencias observadas al tercer día post-reto se explican como la capacidad no solo de infectar a los animales sino además de colonizarlos como lo observamos claramente para el grupo control en contraste con los grupos inmunizados ya sea con CLE o el CTB, que con inconsistencia en la heces y la presencia de ETEC solo fue del 75%, lo que sugiere que se induce una respuesta inmune sistémica y local que aunque no fue muy elevada se diferenció del grupo no inmunizado por los resultados en sus coprocultivos. En cuanto a los ratones inmunizados con CLE+CTB se observó aun más la disminución de la colonización y ausencia de otros signos de diarrea, lo cual implica que la respuesta inmune inducida por ambos antígenos fue sinérgica y efectiva, y a pesar de que no inhibió la infección si evito la presencia de diarrea o inconsistencia de la heces. Este hallazgo es muy importante ya que es la primera vez que se demuestra que la inmunización intranasal con estos antígenos presenta una capacidad protectora contra la infección oral causada por ETEC.

Debido a que el CTB es bioquímica e inmunológicamente muy parecido a la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de ETEC [12, 13, 14], además de ser un eficaz adyuvante de mucosas, evoca una respuesta inmune cruzada contra LT; por lo que la vacuna que estamos proponiendo tiene como blanco la estimulación de una respuesta inmune protectora dirigida hacia la disminución de la colonización y la neutralización de la acción de la toxina LT de ETEC.

Ya en estudios anteriores en infección natural [27, 28] y vacunas con bacterias completas muertas y complementadas con CTB en conejos y voluntarios humanos mediante su administración oral previa neutralización de la acidez del estómago [35, 36, 37], se demostró la sinergia en la protección debida a la presencia o incremento en los niveles de anticuerpos contra los factores de colonización y contra las toxinas de ETEC.

Para el día 4 después del reto las ausencias por excreción de ETEC y diarrea presentadas para casi todos los grupos de estudio fue evidente, a excepción del grupo inmunizado con el CLE; lo que indica que se trata de un modelo para diarreas agudas y además como sucede en el humano la infección es de tipo auto limitante; quizás otro factor importante es la función del ciego en retraer los excesos de líquidos producidos en la lumen intestinal, así como no olvidar la infección especie específica [10], como ha sido de gran debate ya por varias décadas acerca de la limitantes de los modelos experimentales, seguramente si existiera la caracterización de cepas de ETEC causantes de diarrea en este modelo, la observación y aportación experimental podría contribuir a mayor numero de resultados experimentales. Por otro lado, el promedio en días de la infección sintomática por ETEC difícilmente supera las 48 h con severidad media y auto limitante; sin embargo, habrá que recordar que el impacto del numero de diarreas ocurridas niño/año por este patógeno en menores de 5 años es de tres, que aunado a la desnutrición, y las diarreas ocasionadas por otras bacteria, virus y protozoarios son de impacto en la morbilidad y mortalidad.

Por consiguiente para el séptimo día los animales habían superado la fase aguda de la diarrea; sin embargo, la diferencia de la severidad y porcentaje de excreción fue notoriamente disminuida para el grupo inmunizado con la combinación de los antígenos.

Son muchos los esfuerzos que se han realizado para diseñar modelos animales que permitan evaluar patogenicidad y respuesta inmune a la infección por ETEC [30, 31, 32]. López-Vidal y cols. diseñaron un modelo de hámster sirio dorado (HSD) para evaluar la severidad de diarrea debida a la infección por ETEC [33], dicho modelo tiene la capacidad de simular la infección como se presentaría de forma natural, esta es una gran ventaja debido a que no existe manipulación quirúrgica que pudiera someter al animal a un estado de estrés, lo cual restaría validez a los resultados arrojados por dicho modelo. Sin embargo, debido a la ausencia de reactivos biológicos en esta especie que les permitieran realizar la caracterización de la respuesta inmune fue necesario usar otro modelo para contestar dicho objetivo.

En los resultados que obtuvimos pudimos ver que el modelo de ratón es susceptible a la infección por ETEC, debido a que el cuadro diarreico que se presentó fue severidad moderada con respecto al modelo HSD que utilizamos como referencia; sin embargo, el principal objetivo de este trabajo fue la caracterización de la respuesta inmune, para lo cual el modelo murino, y en especial la cepa BALB/c, fue utilizado en distintos trabajos con este mismo fin, debido a la semejanza en respuesta inmune con el humano.

## 6.2 Subpoblaciones linfocitarias

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudiar que la vacuna de tipo peptídica basada en un epítipo lineal común de los factores de colonización de ETEC reconocido por sueros de niños en la etapa convaleciente de la infección por ETEC junto con la subunidad B de la toxina del cólera administrados intranasalmente tuvo la capacidad de inducir la respuesta inmune protectora que disminuyó la severidad de la diarrea ocasionada por ETEC

comparado con los otros grupos controles, así como, caracterizar la respuesta inmune inducida por esta vacuna.

En este trabajo se demostró que la administración por la vía intranasal del CLE+CTB tuvo la capacidad de estimular al sistema inmune local y realizar el “homing” hacia sitios distales tales como las placas de Peyer y el bazo, mediante la detección de la respuesta inmune en diferentes órganos linfoides secundarios, a través de la caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T y el perfil de citocinas en el bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos cervicales y los ganglios linfáticos cervicales.

En los mecanismos de la respuesta inmune específica se tuvo como primer evento el reconocimiento del antígeno por las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T y dependiendo del tipo de molécula del MHC que expresaron en su superficie, la especificidad de reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4+ o CD8+; el evento de presentación de antígeno se llevó a cabo en los ganglios linfáticos y el bazo principalmente; los linfocitos T específicos para el CLE+CTB presentado, indujeron una serie de mecanismos de proliferación y diferenciación a células efectoras que tuvieron la capacidad de migrar hacia órganos distantes del sitio donde fueron activados.

Se han realizado gran cantidad de trabajos que demostraron que el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) es un sistema común, es decir que la estimulación en un sitio determinado de la mucosas (sitio inductor) induce una respuesta a nivel local o a distancia (sitio efector), esto representó una gran ventaja en el diseño de vacunas, facilitándose principalmente la forma de administración por mucosas [29, 43, 44].

En los resultados obtenidos, realizado el sacrificio, la densidad de linfocitos T fue mayor en las placas de Peyer, lo que nos hace suponer que debido a que en este sitio fueron principalmente reclutados para combatir la infección por ETEC. Wenneras y cols en 1994 reportaron que la administración oral de la vacuna compuesta por bacterias inactivas tiene la capacidad de inducir una respuesta de linfocitos T a nivel intestinal y muy pobre a nivel sistémico [45], en nuestro trabajo, la administración por vía intranasal tiene la capacidad de incrementar las poblaciones de linfocitos T en sitios distantes como en las placas de Peyer y el bazo.

La diferencia encontrada entre la proliferación para linfocitos T CD4+ y CD8+ fue de acuerdo a lo esperado, por lo que en cuanto a mecanismos de defensa específica para microorganismos extracelulares principalmente por la colaboración entre linfocitos T CD4+ incrementó la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos en los linfocitos B [22, 23]. Es necesario mencionar que aunque las células de los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos cervicales también fueron proliferadas de igual forma que las de placas de Peyer y del bazo, probablemente la baja proliferación fue debida a que el sitio de arresto celular no lo asoció prioritariamente en estos sitios, aunque la subpoblación fue localizada en los mismos.

### 6.3 Perfil de citocinas

Realizada la caracterización de las subpoblaciones linfocitarias, se caracterizó el perfil de citocinas inducidas por CLE+CTB en los linfocitos del bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos cervicales y los ganglios linfáticos inguinales, con importante producción de IL-4 e IL-10, no así para IFN- $\gamma$ . Estos hallazgos se apoyan en el

conocimiento de que tanto IL-4 como IL-10, son citocinas determinantes de la diferenciación de los linfocitos T hacia un fenotipo Th2. El incremento de dichas citocinas indica que los linfocitos T están colaborando con los linfocitos B para su proliferación y diferenciación a células plasmáticas. Por varias décadas es bien conocido que la respuesta inmune protectora en contra de la infección causada por ETEC es de este tipo, por lo cual este resultado favorece su aprobación de la respuesta inmunitaria y en un breve tiempo se diseñaran los primeros estudios en voluntarios humanos.

En relación a los hallazgos encontramos que la producción de IFN- $\gamma$  fue mucho menor que la de IL-4 e IL-10, incluso en algunos casos fue indetectable, en el caso de los ganglios linfáticos cervicales e inguinales se detectó que las células productoras de IFN- $\gamma$  en el grupo vacunado con CLE+CTB se incrementaron 4.3 veces y 1.5 veces, respectivamente, con respecto al grupo control. Esto sugiere que, si bien, existe un incremento mayoritario de citocinas de un tipo de respuesta Th2, también existe una cierta participación de linfocitos T tipo Th1, aunque el incremento de células productoras de IFN- $\gamma$  fue limitado.

Wenneras y cols.[45] llevaron a cabo el estudio de células T específicas a los factores de colonización después de la inmunización con una vacuna de bacterias inactivas complementada con la subunidad B de la toxina del cólera, se encontró que el incremento de linfocitos T específicos a cada uno de los factores de colonización incluidos en la vacuna fue preferentemente del tipo Th1 ya que se encontraron niveles altos de IFN- $\gamma$ ; otros reportes señalan que la administración de proteínas junto con adyuvantes de mucosas demostró que estos antígenos normalmente inducen una respuesta de tipo Th2 [46].

Posteriormente, Pascual y cols. [47] demostraron que la inmunización oral de ratones con una vacuna de *Salmonella* atenuada que expresa CFA/I indujo una respuesta mixta Th1/Th2 para CFA/I caracterizada por una respuesta temprana de tipo Th2 seguida por el desarrollo de una Th1. Lo cual sugiere la presencia de epítomos para ambas subpoblaciones de linfocitos y que también fue observada con nuestros antígenos, que a diferencia de estas vacunas la inducción es paralela, lo cual podría ser atractiva para una inmunidad compartida o sinérgica. En el diseño racional de vacunas para la inducción de inmunidad de mucosas de forma efectiva se deben considerar cuidadosamente los tipos de respuesta que se deseen dirigir.

La respuesta obtenida por el CTB como adyuvante de mucosas ha sido ampliamente estudiada y caracterizada, se sabe que este componente proteico tiene la capacidad de dirigir el tipo de respuesta hacia Th2 cuando es administrado por mucosas [46], claro que es necesario mencionar que el tipo de respuesta que se presenta es dependiente del tipo de antígeno administrado, la vía de administración y la dosis principalmente [22, 23, 46].

De esta forma, con los resultados que obtuvimos sugerimos que el principal tipo de respuesta obtenida debida a la vacunación con CLE + CTB fue por linfocitos T CD4+ principalmente de tipo Th2, con esto se espera que se estimule la proliferación y diferenciación de células B a células productoras de anticuerpos.

El uso de la vía intranasal como vía de administración tiene como principales ventajas, la gran superficie altamente vascularizada, la eliminación del uso de jeringas con el riesgo que esto conlleva, la disminución de las dosis administradas (en comparación con la vía oral),

administración fácil y se puede aplicar a una gran cantidad de población, la inducción de anticuerpos y células de la respuesta inmune [48]. Existen trabajos que demostraron que la administración por vía intranasal estimuló la producción de IgA a nivel intestinal [43, 44].

Por otro lado, en la actualidad el campo del diseño de vacunas peptídicas ha sido ampliamente explorado debido a que representa la generación de la respuesta inmune protectora, aplicado principalmente en vacunas contra la infección por parásitos intestinales y vacunas contra el cáncer.

Actualmente, contamos con la caracterización de péptido en condiciones fisiológicas tanto de pH como de temperatura, con una estructura  $\beta$ - plegada y formando trímeros basado en estudios de dicroísmo circular y dispersión dinámica de la luz. Análisis por computación mediante el uso de algoritmos de afinidad estructural demostraron teóricamente una alta afinidad para el reconocimiento por moléculas clase II del sistema inmune, lo cual apoya los resultados de la respuesta inmune Th1/Th2 reportados en este trabajo.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

- La vacuna compuesta por el epítipo lineal común y la subunidad B de la toxina del cólera disminuyó la colonización y la severidad de la diarrea causada por ETEC en el modelo murino.
- La vacuna contra la infección por ETEC compuesta por el epítipo lineal común y la subunidad B de la toxina del cólera indujo proliferación de linfocitos T específicos, con predominancia de la subpoblación de linfocitos T CD4+.
- La vía de administración intranasal fue efectiva para la estimulación de la respuesta inmune en las placas de Peyer, el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos cervicales.
- Una importante respuesta de IL-4 e IL-10 característica de Th2 se obtuvo en todos los órganos estudiados en el grupo vacunado con el epítipo lineal común y la subunidad B de la toxina del cólera.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] World Health Organization (WHO), State of the art of new vaccines Research & Development Initiative for Vaccine Research; Geneva, April 2003.
- [2] Report of Technical Review. World Health Organization, Geneva 1998. Global Program for Vaccines and Immunization.
- [3] Zhi-Dong J, Mathewson J, Ericsson CD, Svennerholm AM, Pulido C, Dupont HL. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in patients with travelers, Diarrhea Acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. *J Infect Dis* 2000;181:779-782.
- [4] Datos elaborados a partir de Datos de Defunciones INEGI/Secretaria de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO 2002.
- [5] Cortéz-Ortiz IA, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar EA, Tenorio-Lora JM, Torres-Mazadiego BO, Montiel-Vázquez E. Brote Causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Sal Pub Méx* 2002;11(1);297-302.
- [6] *Enterobacteriaceae*. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª Edition. ASM Press. Washington DC, USA. 2003. pp. 636-696.
- [7] *Enterobacteriaceae*. En: Koneman EW, Tenover FC, Tenover RC, 2ª Edición. *Manual de Bacteriología Clínica*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1992. pp. 203-250.
- [8] *Escherichia coli*. En: <http://www.life.umd.edu/bsci424/pathogenDescriptions/Escherichia.htm>
- [9] Estructura antigénica de enterobacterias. En: [http://www.ratsteachmicro.com/Enterobacteriaceae%20Notes/HCOE\\_CAI\\_Review\\_Notes\\_Enterobacteriaceae.htm](http://www.ratsteachmicro.com/Enterobacteriaceae%20Notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Enterobacteriaceae.htm)
- [10] Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements AM. New Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. *Microbiol Rev* 1983;47(4):510-550.
- [11] Dosis Infecciosa ETEC. En: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap13.html>
- [12] Betley MJ, Miller VL, Mekalanos JJ. Genetics of Bacterial enterotoxins. *Ann Rev Microbiol* 1986;40:577-605.
- [13] Sears CL, Kaper JB. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996;60(1):167-215.

- [14] Middlebrook JL, Dorland RB. Bacterial Toxins: Cellular mechanisms of Action. *Microbiol Rev* 1984;48(3):199-221.
- [15] Mecanismo toxina LT. En: <http://textbookofbacteriology.net/cholera.html>
- [16] Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiol* 1996;4(11):444-452.
- [17] Krogfelt KA. Bacterial Adhesion: Genetics, Biogenesis and Role in Pathogenesis of Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. *Rev of Infect Dis* 1991;13:721-735.
- [18] Karjalainen TK, Evans DG, Evans DJ, Graham DY, Lee CH. Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 1991;11:317-323.
- [19] McConell MM, Hibberd ML, Penny ME, Scotland SM, Cheasty T, Rowe B. Surveys of human enterotoxigenic *Escherichia coli* from three different geographical areas for possible colonization factors. *Epidemiol Infect* 1991;106:477-484.
- [20] López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, Ponce de León A, Ramos A, Svennerholm A-M, Ruiz-Palacios GM. Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* are they a risk factor for acute diarrhea in the community? *J Infect Dis* 1990;162:442-447.
- [21] Steinsland H, Valentiner-Branth P, Gjessing HK, Aaby P, Molbak K, Sommerfelt H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: Longitudinal study. *Lancet* 2003;362:286-291.
- [22] Respuesta inmune. In: Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5ª Edition. Elsevier Sciences. China. 2003. pp. 163-366.
- [23] Respuesta inmune. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5<sup>th</sup> Edition. Garland Publishing. NY, USA. 2001. pp. 93-424.
- [24] Stoll BJ, Svennerholm AM, Gothefors L, Dipak B, Huda S, Holmgren J. Local and Systemic Antibody responses to naturally acquired Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea in an Endemic Area. *J Infect Dis* 1986;153(3):527-534.
- [25] Wenneras C, Firdausi Q, Prodeep KB, Bladley S and Svennerholm A-M. Intestinal Immune Responses in patients Infected with Enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. *Infect Immun* 1999;66:3311-3316.
- [26] Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De la Roca JM, Hernández JM, Pérez G, Vázquez V. Risk of Diarrhea during the first year of Life associated

with inicial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol 1990;131(5):886-904.

- [27] Ahren C, Svennerholm AM. Experimental Enterotoxin-Induced *Escherichia coli* Diarrhea and Protection induced by Previous Infection with bacteria of the same Adhesin or enterotoxin Type. Infect Immun 1985;50(1):255-261.
- [28] Ahren C, Svennerholm AM. Synergistic Protective Effect of antibodies Against *Escherichia coli* Enterotoxin and Colonization Factor Antigens. Infect Immun 1982;32(1):74-79.
- [29] Van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. Vaccines for Mucosal Immunity to Combat. Emerg Infect Dis 2000;6(2):123131.
- [30] Richardson SH, Giles CG, Kruger KS. Sealed Adult Mice: New Model for enterotoxin Evaluation. Infect Immun 1984;43(1):482-486.
- [31] Stefan L. A rat model an in vivo assay of enterotoxic diarrhea. FEMS Microbiol Lett 1982;15:239-242.
- [32] Spira WM, Sack RB, Froehlich JL. Simple Adult Rabbit Model for *Vibrio cholerae* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea. Infect Immun 1986;10:153-159.
- [33] Arredondo LJ, Zaragoza S, Domínguez M, Willms K, López-Vidal Y, Cravioto A. Desarrollo de un nuevo Modelo Animal Experimental Hámster Sirio Dorado para el estudio de la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Enf Infec Microbiol. 1997;17(2):43-46.
- [34] Peltola H, Siitonen A, Kyronseppa H, Simula I, Mattila L, Pekka O, Kataja J, Cadoz M. Prevention of Travelers diarrhea by oral B-subunit whole-cell cholera vaccine. Lancet 1991;338:1285-1289.
- [35] Qadri F, Ahmed T, Ahmed F, Sack B, Sack A, Svennerholm AM. Safety and Immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera Toxin B subunit vaccine in Bangladeshi children 18-36 months of age. Vaccine 2003;21:2394-2403.
- [36] Cohen D, Orr N, Haim M, Ashkenazi S, Robin G, Green MS, Ephros M, Sela T, Slepon R, Ashkenazi I, Taylor DN, Svennerholm AM, Eldad A, Shemer J. Safety and Immunogenicity of Two Different Lots of the Oral Killed Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Cholera Toxin B subunit Vaccine in Israeli Young Adults. Infect Immun 2000;68(8):4492-4497.
- [37] Barry EM, Altboum Z, Losonsky G, Levine MM. Immune responses elicited against multiple enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae and mutant LT expressed in attenuated *Shigella* vaccine strains. Vaccine 2003;21:333-340.

- [38] Gütereña-Burgueño F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, Roberts ZJ, Nesterova GV, Alving CR, Glenns GM. Safety and Immunogenicity of a Prototype Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Administered Transcutaneously. *Infect Immun* 2002;70(4):1874-1880.
- [39] Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 2004; article in press.
- [40] Lee JY, Yu L, Henderson D, Langridge WH. Plant-synthesized *Escherichia coli* CFA/ fimbrial protein protects Caco-2 cells from bacterial attachment. *Vaccine* 2004; article in press.
- [41] López-Vidal Y, Epítapos continuos y comunes presentes en las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). *Gac Med Mex* 1997;133(6):511-525.
- [42] López-Vidal Y. Colonization Factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (Monoclonal Antibodies and Methods for Epidemiological Studies).1990. Goteborg, Suecia. Tesis Doctoral.
- [43] Macdonald TT. The Mucosal Immune System. *Parasite Immunology* 2003;25:235-246.
- [44] Cripps AW, Kyd JM, Foxwell AR, Vaccines and Mucosal immunization. *Vaccine* 2001;19:2513-2515.
- [45] Wenneras C, Svennerholm AM, Czerkinsky C. Vaccine-specific T cells in Human peripheral blood after Oral immunization with an inactivated Enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Infect Immun* 1994;62(3):874-879.
- [46] Hong-Yin Wu, Russell MW. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1998;16(2/3):286-292.
- [47] Pascual DW, Hone DM, Hall S, Van Ginkel F, Yamasoto M, Walters N, Fujihashi K, Poel RJ, Shaoguang W, Vancott JL, Kiyono H, McGhee JR. Expresion of recombinant Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization factor Antigen I by *Salmonella typhimurium*, Elicits a Biphasic T helper cell response *Infect Immun* 1999;67(12):6249-6256.
- [48] Zuercher AW. Upper Respiratory Tract Immunity. *Viral Immunology* 2003;3:279-289.

# APÉNDICE

## APÉNDICE

Órgano	Grupo Antígeno	Linfocitos CD4+ (%)			
		Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	PHA	6.8	5.1	16.3	3.5
	CLE	6.2	7.9	6.6	16.2
	CTB	12.1	6.2	10.6	28.2
	CLE+CTB	10.6	7.2	14.7	16.4
GLI	PHA	0.1	0.1	0.4	1.4
	CLE	0.5	0.2	0.2	1.8
	CTB	0.5	0.8	0.6	0.5
	CLE+CTB	0.5	0.5	0.2	1
GLC	PHA	0.5	0.2	0.3	0.3
	CLE	0.2	0.2	0.2	0.3
	CTB	0.7	0.3	0.3	0.5
	CLE+CTB	0.2	0.4	0.2	0.5
PP	PHA	10.6	4.7	3.1	29.4
	CLE	0.1	4	2.9	15.2
	CTB	3	15.2	4.9	20.2
	CLE+CTB	2.8	5.4	1.8	18.7

**Tabla 8.** Porcentaje de linfocitos CD4+ en bazo, placas de Peyer, Ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos cervicales. GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítopo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

Órgano	Grupo Antígeno	Linfocitos CD8+ (%)			
		Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	PHA	8.9	2.6	7.4	2.6
	CLE	5.3	9.1	2.6	11.1
	CTB	4	4.7	25.3	9.5
	CLE+CTB	5.5	4.1	3	6.1
GLI	PHA	0.8	1	0.2	0.7
	CLE	3.7	0.3	0.2	0.7
	CTB	2	0.2	0.3	1
	CLE+CTB	0.7	ND	0.4	0.9
GLC	PHA	0.5	0.3	0.4	0.3
	CLE	0.2	0.2	0.2	0.5
	CTB	0.4	0.3	0.4	0.3
	CLE+CTB	0.2	0.3	0.4	0.6
PP	PHA	2.9	5.7	1.7	14.4
	CLE	4.7	2.3	7.8	9.2
	CTB	1.5	4.3	13	10.4
	CLE+CTB	2.7	3.3	ND	7.6

**Tabla 9.** Porcentaje de linfocitos CD8+ en bazo, placas de Peyer, ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos cervicales. GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera., ND= No determinado

Linfocitos (%)	Órgano	Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	CD4	10.6	7.2	14.7	16.4
	CD8	5.5	4.1	3	6.1
PP	CD4	2.8	5.4	1.8	18.7
	CD8	2.7	3.3	ND	7.6

**Tabla 10.** Subpoblaciones linfocitarias específicas a CLE+CTB de bazo y placas de Peyer en todos los grupos estudiados. PP = placas de Peyer. CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera. ND= No determinado

Órgano	Grupo Antígeno	IL-4 (%)			
		Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	PHA	2.6	2.6	7.4	6.3
	CLE	11.1	3.1	2.6	5
	CTB	9.5	1.1	25.3	3.8
	CLE+CTB	6.1	7.3	3	12.3
GLI	PHA	6.3	11.1	19.2	22
	CLE	5	15.6	15.2	36.2
	CTB	3.8	2.9	7.7	17.6
	CLE+CTB	12.3	11.2	12.6	46.2
GLC	PHA	3.2	21.5	19	39.7
	CLE	6	1.8	13.2	24.9
	CTB	5.8	6.3	13	45.5
	CLE+CTB	4.2	15.1	15.5	13.2
PP	PHA	26.1	2.8	51.4	45.5
	CLE	40.3	34.8	42.8	40.4
	CLE+CTB	19.7	30.6	17.2	35.9
	CTB	14	6.9	28.8	16.5

**Tabla 11.** Porcentaje de IL-4 en bazo, placas de Peyer, ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos cervicales de los grupos en estudio. IL-4= Interleucina 4, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epitopo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

Órgano	Grupo Antígeno	IL-10 (%)			
		Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	PHA	0.9	0.3	1.8	7.2
	CLE	0.9	0.2	0.5	5.9
	CTB	1.1	0.3	0	4.1
	CLE+CTB	0.2	0.2	0.3	4.1
GLI	PHA	0.9	1.2	1.5	4.2
	CLE	1.1	3	1.6	6.8
	CTB	1.5	3.2	0.9	6.6
	CLE+CTB	3.5	1.6	1.4	4.8
GLC	PHA	1.6	1.8	0.6	8.6
	CLE	0.5	1.3	0.6	5.1
	CTB	2.2	0.6	0.7	4.7
	CLE+CTB	0.9	1.6	1.1	8.1
PP	PHA	0.8	0.2	0.8	7.2
	CLE	0.9	1.1	0.6	11
	CLE+CTB	1	0.6	1.4	3.8
	CTB	0.5	0.4	0.7	3.9

**Tabla 12.** Porcentaje de IL-10 en bazo, placas de Peyer, ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos cervicales de los ratones. IL-10= Interleucina 10, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

Órgano	Grupo Antígeno	IFN- $\gamma$ (%)			
		Control	CLE	CTB	CLE+CTB
Bazo	PHA	0.1	0	0	0.8
	CLE	0.4	0.2	0	0.7
	CTB	0	0.2	0	0
	CLE+CTB	0	0	0.3	0.5
GLI	PHA	0.2	0	1.4	1.2
	CLE	0.2	0.3	2.6	8.9
	CTB	0.2	0.3	0.9	0.8
	CLE+CTB	0.4	0.4	1.5	2.1
GLC	PHA	0.6	0.4	2	4.7
	CLE	1.1	0.2	5.6	0.9
	CTB	0.4	0.1	7.3	3.7
	CLE+CTB	0.4	0.3	0.6	1
PP	PHA	0.4	0	0.7	1
	CLE	0	0.5	0.2	0.2
	CLE+CTB	0.9	0.2	0	3.2
	CTB	1.7	0.8	0.7	0

Tabla 13. Porcentaje de IFN- $\gamma$  en bazo, placas de Peyer, ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos cervicales de los ratones. IFN- $\gamma$ = Interferón gama, GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, PHA= Fitohemaglutinina, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Citocina (%)	Órgano	Control	CLE	CTB	CLE+CTB
IL-4	Bazo	6.1	7.3	3	12.3
	GLI	12.3	11.2	12.6	46.2
	GLC	4.2	15.1	15.5	13.2
	PP	14	6.9	28.8	16.5
IL -10	Bazo	0.2	0.2	0.3	4.1
	GLI	3.5	1.6	1.4	4.8
	GLC	0.9	1.6	1.1	8.1
	PP	0.5	0.4	0.7	3.9
INF- $\gamma$	Bazo	0	0	0.3	0.5
	GLI	0.4	0.4	1.5	2.1
	GLC	0.4	0.3	0.6	1
	PP	1.7	0.8	0.7	0

**Tabla 14.** Citocinas intracelulares de linfocitos específicos a CLE+CTB de bazo, ganglios linfáticos inguinales, ganglios linfáticos cervicales y placas de Peyer en todos los grupos estudiados. GLI = ganglios linfáticos inguinales, GLC = ganglios linfáticos cervicales, PP = placas de Peyer, CLE= Epítipo lineal común, CTB= Subunidad B de la toxina del cólera.