

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR Gb₃ PARA LAS TOXINAS DE SHIGA (STX) EN
CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Escherichia coli*
ENTEROHEMORRÁGICA. (EHEC).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
MARÍA DE LOS ANGELES ROMERO MONTES**

**ASESOR
DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**



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.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios, San Judas Tadeo y La Virgen María que se hacen presentes en cada momento de mi vida y que me ayudan a realizar cada actividad en mi vida.

Gracias a esos 2 Ángeles maravillosos que me han ayudado y apoyado en cada momento de mi vida, gracias a su sabiduría, orientación, regaños, preocupación, consejos, abrazos ternura, cariño, amor lagrimas y fortaleza, a MIS PADRES Mercedes Montes Cruz y Miguel Ángel Romero Rodríguez no me dejaron ni me dejan caer en los momentos de flaqueza; que sin ellos no seria nada y que gracias a ellos existo y soy quien soy. Los Amo con todo mi ser y este trabajo es de ustedes y para ustedes.

A mis hermanos Miguel que con su apoyo muy particular y peculiar, me ha dado fuerzas para seguir adelante aun habiendo momentos tanto de tristeza como de alegría y que admiro tanto tu inteligencia como el corazón tan grande que tienes, gracias manito, a mi flaco de oro Axel carnalito, que me has apoyado en muchos sentidos y por ser mi padrino de graduación me diste y me das alegrías muy grandes y admiro la fortaleza y nobleza de tu ser. Y aunque seamos muy diferentes los 3, estoy muy orgullosa de los 2 gracias por cuidarme protegerme y ser mis carnales. Los amo con todo mi corazón.

A mi primo Agustín M.C. de la T. que estuvo presente en muchas etapas importantes de mi vida, que crecimos juntos y que tuve un apoyo muy valioso e incondicional, gracias por esos desvelos y preocupación que sin ti no lo hubiera logrado, gracias, siempre serás muy especial.

A mi ahijado Ángel que espero que este trabajo te sirva de ejemplo te anime, te inspire y ayude a saber que si se puede y que es una gran satisfacción y orgullo poder concluir un ciclo tan maravilloso como es la universidad te quiero mucho y siempre estas en mi mente y mi corazón. A ti Cony que sabes cuan especial fue nuestra relación y lo es, te quiero mucho nena por todos los momentos que pasamos y que vivimos dios te bendiga a tus bebes y esposo igual.

A Claudia mi mejor amiga de la facultad, que pasamos muchos momentos tanto de alegrías como de tristezas, de presión en los exámenes y de satisfacción al acreditar las materias, el apoyo que me has dado es invaluable y gracias por llegar a mi vida te amo vieja.

A mis compañeros y amigos Humberto, Emmanuel, Antonio y Carlos que fueron mis compañeros de facultad y amigos de por vida, gracias porque sin ustedes el camino hubiese sido mas largo y pesado, así como a cada uno de mis compañeros que en algún momento compartimos clases y pasamos momentos agradables.

A ti mi Ángel que estuviste presente en clases y que posteriormente te hiciste presente en mi vida para no irte mas, llegaste en un momento muy importante de mi vida para compartirlo contigo, gracias por tu apoyo, tu confianza, por hacer mi camino mas agradable y ligero, por hacerme tan feliz y por tu grandeza de ser. Te amo Ernesto.

A mi bebé cuyo que si querer ni saber, me acompaño en momentos muy importantes de mi vida y paso de mascota a un ser muy importante en mi vida y que cumplió su ciclo de vida en el momento indicado siempre te amare y te llevare en mi corazón.

A mamá chelo mi gran abuelita que Dios me la conserva con vida y que sea por muchos años mas, gracias por ser tan linda y por ese carácter que me encanta.

A mi tía Hortensia porque fuiste una parte muy importante en mi formación, principalmente como persona y una parte de mi ser es por ti, gracias.

A mi tío Ricardo y mi tía Reina que me ayudaron y me apoyaron cuando los necesite, sin dudarlo y abrieron las puertas de su casa, Gracias.

A mis tíos Silverio, Socorro, Juani, Oscar, Esther, prima Fabiola, que confiaron en mi dejando en mis manos la salud de sus mascotas gracias por ser parte de mi formación.

A mis tíos y padrinos Alfredo y Agustina que me apoyaron, que me dieron un aliento de confianza y me extendieron la mano para cualquier circunstancia, gracias.

A mis tíos Hermilo, Mari, José, Juana Inés, primos y primas de que en algún momento de la vida me apoyaron y me animaron en seguir adelante.

A los señores que depositaron su confianza al darme la oportunidad de trabajo y que hasta la fecha seguimos trabajando juntos y he crecido tanto en lo profesional como en lo personal porque su experiencia y su sabiduría son invaluable, Señor Eduardo Tapia y Señora Esther Garay muchas gracias.

A todos los que pertenecen a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en salud animal (UIMSA) Dr. Alejandro Martínez, Dr. Marco A. Muñoz, que me apoyaron y compartieron sus conocimientos para la realización de mi trabajo.

Al M. en C. Alejandro Buendía que aun con las diferencias que pudieron surgir me apoyo y ayudo en los cortes histológicos de este trabajo, gracias Ale.

Al profesor German Garrido por compartirme sus conocimientos y enseñarme la sencillez y una buena forma de trabajo, gracias por su valioso apoyo en los cortes histológicos, una de las bases de mi trabajo.

Al M. en C. Néstor Cuenca Verde por su valioso apoyo, M.V.Z. Patricia Arangure, Elena Estrada, que en algún momento trabajamos juntos, formamos un buen equipo y las horas se hicieron mas ligeras, gracias por llegar a mi vida y tener nuevos amigos.

Al M.V.Z. Esp. Daniel Reyes Soto que compartimos muchos momentos dentro y fuera de la facultad y crecimos durante un tiempo juntos; por tu gran apoyo y entrega incondicional, siempre serás importante en mi vida. Gracias Negrito, te quiero mucho.

A Sergio Quevedo, por todo el apoyo que me has brindado y por ser tan buen amigo, fuiste y eres una parte fundamental para la realización de mi trabajo y para que mi camino se hiciera mas ligero, te quiero mucho amigo mío, gracias de verdad.

A Lucky gracias por todos estos años preciosa que compartimos desde el C.C.H. hasta la actualidad y que ahora tienes una familia hermosa, tu hermana, Aris y Zoe, los amo y agradezco a Dios que sean mis amigos.

A Idalia Longinos R. que aun con distancias y sin tiempo para vernos, en algún momento te haces presente. Gracias flaca por estos 20 años de conocernos y por todo tu apoyo en los momentos difíciles, Dios te bendiga a ti y a tu familia.

A B.A.R. que fuiste y eres un punto medular en mi vida y por todo lo que hemos vivido se a formado lo que ahora somos, sabes que siempre estarás en mi corazón. Te amo my friend.

A Agustín Pérez C. Por todo tu apoyo, entusiasmo, ánimos y por hacerme ver la vida de diferente manera, gracias amigo mío, te quiero mucho.

A Sandra y Ángel que confiaron en mi en mis inicios de consulta y depositaron en mis manos a una vida muy importante, Marcelino y que afortunadamente todo salio muy bien.

Gracias a los conejos que fueron una parte fundamental para la realización de este trabajo de investigación, gracias por dar su vida, sin estos animalitos simplemente no hubiera sido posible esto.

A todos aquellos que me falten mencionar o que ya no estén con nosotros pero que son parte de mi formación, gracias.

Y finalmente a todos y cada uno de mis profesores, que con su esfuerzo en clases, regaños, momentos agradables y experiencia transmitieron durante mi formación todo lo que soy ahora como profesionista y aprendí a amar y respetar mi carrera como tal, es invaluable todo lo que dan y lo que se esfuerzan por cada día formar un profesionista mas, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

A mi Asesor de Tesis Dr. Guillermo Valdivia Anda por su apoyo, por compartir sus conocimientos, por su valiosa ayuda para la realización de mi tesis y ayudarme a concluir un ciclo escolar tan importante como lo es mi profesión, gracias Doctor.

A mis sinodales por su valiosa colaboración en las correcciones finales de mi tesis:

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

M.V.Z. Víctor Quintero Ramírez

M.V.Z. Guadalupe Flores Ortíz

Gracias a mi casa y segundo hogar la UNAM.

ÍNDICE

	PAGINA
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVOS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

Las cepas de *E.coli* se han subdividido en seis grupos patogénicos, esto va de acuerdo a su grado de daño en el hospedador.

Estos seis grupos son los siguientes: ECET (enterotoxígena), ECEP (enteropatógena), ECEI (enteroinvasiva), ECEH (enterohemorrágica), ECEA (enteroagregativa) y ECDA (difusamente adherente).

La cepa que pertenece al grupo enterohemorrágica (principalmente O157:H7), se le ha asociado con la enfermedad de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), además de la presentación de diarrea hemorrágica, principalmente en humanos siendo esto una enfermedad de suma importancia a nivel de salud pública. Es importante en veterinaria ya que afecta a mamíferos y los bovinos son su principal reservorio y este a su vez uno de los transmisores para el humano.

Esta cepa produce una toxina denominada como Stx de tipo 1 y 2, la cual se ha demostrado que su principal receptor es el Gb₃/CD77.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de los factores auxiliares de virulencia (E/A, Stx 1 y Stx 2) de seis cepas de referencia de *E.coli* para la expresión de receptores Gb₃/CD77.

Dichas cepas son: K12, EDL 933 IBT, EDL 933 MED, EDL 933 Δ-LER, 933 J y 933 W

Se utilizó un modelo en conejos previamente diseñado para trabajos anteriores. La técnica quirúrgica utilizada, fue modificada, obteniendo resultados diferentes a lo que se esperaba. Se inocularon las 6 cepas de referencia de *E. coli* en diferentes conejos y se evaluó posteriormente dicha participación de los factores auxiliares de virulencia que presentaban cada una de las cepas.

Se demostró que la técnica que se utilizó para la evaluación de los factores, no fue la más adecuada, ya que el factor E/A tuvo un efecto inductor del Gb₃/CD77 en las células del riñón como una reacción de modulación para algunas cepas, por otro lado este mismo factor (E/A) indujo mayor cantidad de receptores a nivel de apéndice cecal y esto pudo haber sido directo o por modulación.

Se observó que la toxina tipo Stx 2 es más potente que la de tipo Stx 1 para inducir la presentación de receptores Gb₃/CD77 principalmente en células renales a nivel de glomérulo y túbulo contorneado proximal (T.C.P.) a diferencia del apéndice cecal, en donde se observó una reacción mínima.

ABREVIATURAS

E/A (attaching and effacing). Lesión provocada por la toxina de shiga o Stx en el epitelio intestinal, daño y pérdida del epitelio

A.C. Apéndice Cecal

CST. Caldo soya tripticaseína

CD77. Receptor para la toxina Stx al igual que el Gb3.

ND. No determinado

T.C.P. Tubulo contorneado proximal

T.C.D. Tubulo contorneado distal

Stx 1,2. Shigatoxina tipo 1 y tipo 2.

SUH. Síndrome Urémico Hemolítico

Este trabajo fue financiado por:

**Programas de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)
NO. IN216005.**

Cátedra de Investigación FESC No. IN. 2.14.

**Programa de Apoyo a Proyectos para el mejoramiento de la Enseñanza
(PAPIME) en 208304.**

Proyecto de Mejoramiento de la Enseñanza MII 021.

**Este trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones de la
Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA),
de la FESC campo IV.**

Así como con el equipo y las instalaciones de Laboratorio Clínico DIVET

INTRODUCCIÓN.

Gastroenteritis.

Las *E. coli* patógenas son caracterizadas por la expresión de factores de patogenicidad, como factores de adherencia, invasinas y cápsulas entre otras. En los últimos años se han identificado 6 categorías de *E. coli* causantes de Enfermedad diarreica aguda: *E. coli* enterotoxigénica (ECET) genera una enterotóxina, *E. coli* enteropatógena (ECEP) generada por adherencia íntima a la célula huésped, *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) por invasión a la célula, *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) adherencia a la íntima de la célula huésped, *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg), *E. coli* enteroadherente (ECDA) generada por una producción de enterotoxina. (Patrick R. Murray, 1994).

En animales domésticos las colibacilosis son muy frecuentes, incidiendo esencialmente en animales de pocos días de edad y en recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de aves y conejos. Mientras que en terneros, lechones, corderos y gazapos *E. coli* suele producir diarrea, en aves provoca fundamentalmente infecciones respiratorias (aerosaculitis) y septicemias. Además *E. coli* puede causar en rumiantes, ganado porcino, perros y gatos colisepticemias en neonatos hipogamaglobulinémicos, infecciones urinarias y mamitis.

ECET (enterotoxigénica). La enfermedad producida por esta bacteria, se ve con más frecuencia en los países en desarrollo. Las infecciones se adquieren fundamentalmente a través de consumo de alimentos o de agua contaminada con restos fecales. No ocurre la transmisión de persona a persona. Produce 2 clases de enterotoxinas: termolábiles (52°-70°) (LT-I, LT-II) y termoestables (35°-40°)(STa y STb). Mientras que la LT-II no se asocia con la enfermedad humana, la LT-I es funcional y estructuralmente similar a la toxina colérica y se asocia con la enfermedad en el ser humano. Está formada por una subunidad A y por 5 subunidades B idénticas. Las subunidades B se unen al mismo receptor que la toxina colérica (gangliósidos GM₁) y a otras glucoproteínas de superficie en las células epiteliales del intestino delgado. Después de la endocitosis, la subunidad A de LT-I se transloca a través de la membrana de la vacuola. La subunidad A tiene actividad ADP (Adenosín difosfato)-robosiltransferasa e interacciona con una proteína de membrana (Gs) que regula la adenilatociclasa. El resultado neto de esta interacción es un aumento de los valores de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), con un incremento de la secreción de cloro y una disminución de la absorción de cloro y de sodio. Estos cambios se manifiestan como una diarrea acuosa. La exposición a la toxina estimula también la secreción de prostaglandinas y la producción de citocinas inflamatorias, lo que da lugar a una mayor pérdida de líquidos.

La diarrea secretora producida por ECET ocurre tras un periodo de incubación de 1 a 2 días, y dura una media de 3 a 4 días. Síntomas: espasmos abdominales, nauseas, vomito (raro) y diarrea acuosa. No se observan cambios histológicos de la mucosa intestinal ni inflamación. En animales domésticos, las colibacilosis causadas por los ECET son muy frecuentes, afectan fundamentalmente a animales de pocos días de edad y recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado porcino y bovino. (Patrick R. Murray, 1994).

ECEP (enteropatogena). Es la principal causa de diarrea infantil en los países pobres. La enfermedad es rara en niños mayores y en adultos, presumiblemente porque desarrollan una inmunidad protectora. La infección se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado con la destrucción posterior de la microvellosidad (E/A histopatología). Estas cepas forman microcolonias en la superficie de las células epiteliales con las bacterias unidas a las células del huésped mediante pedestales en forma de copa. Inicialmente ocurre una unión laxa mediada por los pilis que forman haces (Bfp), seguida de una secreción activa de proteínas por el sistema de secreción bacteriano de tipo III en la célula epitelial del huésped. Una proteína, el receptor de la intimina translocada (Tir) se inserta en la membrana epitelial y funciona como un receptor para una adhesina bacteriana de la membrana externa, la intimina. La diarrea resulta de la mala absorción que se produce por la destrucción de la microvellosidades. Las cepas de *E. coli* que causan diarrea en conejos poseen la isla de patogenicidad LEE y provocan lesiones intestinales de adhesión y borrado, por lo que se incluyen dentro de los ECEP. También se han descrito cepas de ECEP que pueden causar diarrea en perros, algunas de las cuales poseen el plásmido EAF que codifica para la adhesina BFP. No obstante, se ha observado que la intimina de las cepas de perros no se encuentra relacionada serológicamente con la de las cepas humanas. (Patrick R. Murray.1994).

ECEI (enteroinvasiva). Son pocos los estudios epidemiológicos en los que se ha estudiado el papel jugado por los EIEC y, excepto en los llevados a cabo en Brasil, México y Tailandia, las cepas invasivas no se detectaron o su frecuencia de aislamiento fue muy baja. Sin embargo, se han producido algunos brotes causados por este tipo de cepas en EE.UU., Checoslovaquia y en España. La mayor parte de los pacientes infectados desarrollan una diarrea acuosa indistinguible de la provocado por otros grupos de *E. coli* diarreagénicos. Solamente algunos pacientes presentan disentería, que se manifiesta con sangre, mucus y leucocitos en las heces y fiebre. Los ECEI son muy parecidos a *Shigella* ya que generalmente son incapaces de fermentar la lactosa, no son móviles, lisina descarboxilasa negativos y además poseen antígenos O que presentan reacción cruzada con los de *Shigella*. Los genes necesarios para la invasividad son llevados por un plásmido (pInv) de 120 MDa en *Shigella sonnei* y por un plásmido de 140 MDa en las otras especies de *Shigella* y en *E. coli*. Además también están implicados genes cromosómicos que regulan la transcripción de algunos de los genes plasmídicos. El modelo actual de patogénesis de *Shigella* y ECEI comprende los siguientes pasos: (1) penetración por endocitosis dentro de las células de la mucosa intestinal del colon, (2) lisis de la vacuola endocítica, (3) multiplicación intracelular, (4) movimiento intracelular y (5) diseminación lateral a las células adyacentes. Los genes plasmídicos *mxi* y *spa* codifican para un aparato de secreción de proteínas de tipo III similar al que poseen los ECEP y ECVT. Este aparato se requiere para la secreción de múltiples proteínas de la membrana externa (OMP) que están implicadas en el proceso invasivo y que se denominan proteínas Ipa (invasión plásmid antigens) (IpaA a IpaD). IpaC promueve la entrada de la bacteria en la célula, mientras que IpaB lisa la vacuola fagocítica e induce apoptosis en macrófagos. VirG (IcsA) es una proteína de superficie que es esencial para que se produzca la condensación de actina que facilita el movimiento de la bacteria a través del

citoplasma. Los EIEC producen una enterotoxina de 63 kDa (ShET2) que se encuentra codificada en el gen plasmídico *sen*. (Patrick R. Murray, 1994).

ECEA ó ECEAgg (enteroagregativo). Estas cepas se han visto implicadas en una diarrea acuosa, persistente y con deshidratación, en los niños de los países en desarrollo. Las bacterias se caracterizan por su autoaglutinación en forma de “ladrillos apilados”. Este proceso está mediado por unas fimbrias formadoras de haces (fimbrias de adherencia agregación I y II [AAF/I y AAF/II]), que se transportan en un plásmido. ECEA estimula la secreción de moco que atrapa a las bacterias en una biopelícula que recubre el epitelio del intestino delgado. Se observa acortamiento de las microvellosidades, infiltración mononuclear y hemorragia. No se ha demostrado ninguna citotoxina, pero es probable que este presente. (Patrick R. Murray, 1994).

ECDA (difusamente adherente). Se ha reconocido por su adherencia característica en cultivos celulares. ECDA estimula el alargamiento de las microvellosidades con las bacterias embebidas en la membrana celular. La enfermedad resultante es una diarrea acuosa que se observa fundamentalmente en los niños de 1 a 5 años. (Patrick R. Murray, 1994).

ECEH (enterohemorrágica). Son las cepas que causan con más frecuencia enfermedad en los países desarrollados. La ingestión de menos de 100 bacilos puede producir la enfermedad. La gravedad de la enfermedad varía desde una diarrea leve y no complicada hasta una colitis hemorrágica con dolor abdominal grave, diarrea sanguinolenta, sin fiebre o con ella. (Patrick R. Murray, 1994).

El síndrome hemolítico urémico (SHU), es un trastorno que se caracteriza por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, siendo una complicación que se ve en el 10% de los niños menores de 10 años. Esta enfermedad es más frecuente en los meses cálidos, y la mayor incidencia se da en los niños menores de 5 años. La mayoría de los casos se han atribuido al consumo de carne de vaca o de otros productos cárnicos poco cocinados, agua, leche no pasteurizada, o zumos de frutas ej. Sidra contaminada, vegetales y frutas contaminadas. (Patrick R. Murray, 1994).

Inicialmente se desarrolla en los pacientes, tras un período de incubación de 3 a 4 días, una diarrea no sanguinolenta con dolor abdominal. Se observan vómitos en la mitad de los pacientes. En los dos primeros días desde el inicio la enfermedad puede progresar a una diarrea sanguinolenta con dolor abdominal grave. La resolución de los síntomas ocurre generalmente entre los 4 y los 9 días en la mayoría de los pacientes que no reciben tratamiento; sin embargo, el SHU es una complicación grave, especialmente en los niños pequeños. La muerte puede ocurrir de 3 al 5% con SHU y pueden quedar secuelas graves, (ej. Insuficiencia renal, hipertensión, manifestaciones del SNC como parálisis), hasta en el 30% de los pacientes. (Patrick R. Murray, 1994).

Las cepas de ECEH expresan la toxina Shiga (Stx-1, Stx-2, o ambas), inducen lesiones E/A en las células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa que transporta los genes de otros factores de virulencia. Stx-1 es esencialmente idéntica a la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae*, Stx-2 tiene una homología del 60%. Ambas toxinas están codificadas por bacteriófagos lisogénicos, tiene una subunidad A y cinco subunidades B que se unen a un glicolípido específico de la célula huésped (globotriaosilceramida, Gb₃). Hay una alta concentración de receptores de Gb₃ en las vellosidades intestinales y en las células endoteliales del

riñón. La destrucción de las vellosidades intestinales da lugar a una disminución de la absorción y un aumento relativo de la secreción de líquidos. (Patrick R. Murray, 1994).

El SHU se ha asociado fundamentalmente con la producción de Stx-2, que destruye las células endoteliales del glomérulo. Esta destrucción da lugar a la disminución del filtrado glomerular y a una falla renal aguda. Las toxinas Stx estimulan también la expresión de citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral α [TNF- α], interleucina-6), que entre otros efectos aumentan la expresión de Gb₃. Se han aislado más de 50 serogrupos de ECEH; sin embargo se cree que la mayoría de los que producen enfermedad en humanos en Estados Unidos son del serotipo O157:H7. Los rumiantes, especialmente el ganado vacuno, constituyen el principal reservorio de este tipo de microorganismos, siendo la carne picada y las hamburguesas los principales vehículos de transmisión. (Patrick R. Murray, 1994).

Propiedades de las cepas de *E. coli* que causan infecciones entéricas.

Cepa	Mecanismo patogénico	Infecciones entéricas	Presentaciones clínicas comunes	Grupo común de edad	Factores comunes de riesgo
ECET	LT y ST	Diarrea, diarrea de los viajeros	Diarrea acuosa profusa; calambres, náuseas, deshidratación	Adultos, niños	Viajes al extranjero
ECEP	Factor de adherencia; ataque y lesión en el epitelio intestinal	Diarrea aguda	Diarrea acuosa, fiebre, vómitos, mucus en las heces	Niños de menos de dos años; adultos	Edad inferior a dos años
ECEI	Invasión y destrucción del epitelio de la mucosa intestinal	Disentería similar a la disentería por Shigella	Disentería, constipación, sangre, mucus y leucocitos en heces; fiebre, calambres	Adultos	Viajes al extranjero
ECEH	toxinas tipo Shiga	Diarrea; colitis hemorrágica	Diarrea (no leucocitos); calambres abdominales; sangre en heces, fiebre, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombrohepática (puede o no estar presente)	Niños	Consumo de carne poco cocida.
ECDA		Adherencia células Hela Hep-2	Diarrea acuosa	Niños de 1 a 5 años	Desconocido
ECEAgg	Ignorado	Diarreas crónicas y agudas	Diarrea acuosa, vómitos	Todas las edades	Desconocido

Factores auxiliares de virulencia en *E. coli*.

Factores de adherencia.

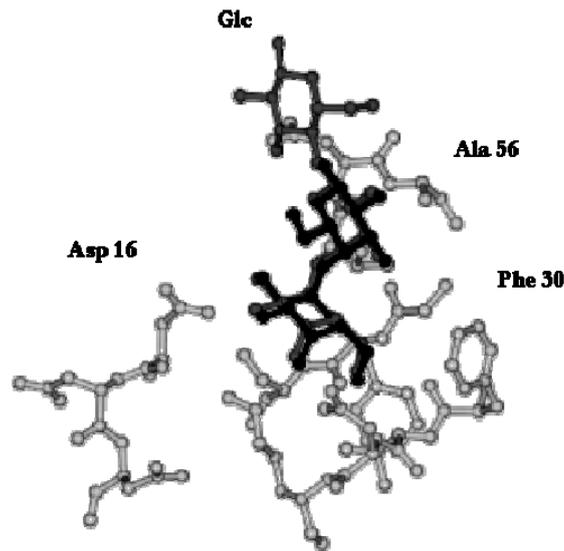
Varios factores desempeñan funciones importantes; la hidrofobicidad de la superficie y la carga eléctrica neta de dicha superficie; las moléculas de adhesión situadas en la bacteria (ligandos) y la interacción de estas con las células receptoras del huésped. Por lo general las bacterias y células huésped tienen carga eléctrica negativa neta en la superficie y, por tanto, son fuerzas electrostáticas que se repelen. Estas fuerzas pueden ser superadas por interacciones hidrófobas y otras más específicas entre bacterias y células del huésped, esto es cuanto más hidrofóbica sea la superficie de la célula huésped mayor será la adherencia. Las bacterias también tienen moléculas específicas en la superficie. Muchas tienen pilis apéndices parecidos a cabellos que se extienden desde la superficie celular bacteriana y ayudan a mediar la adherencia de la bacteria a la superficie de la célula. Algunas cepas de *E. coli* tienen pili de tipo I que se adhieren a los receptores de las células epiteliales que tienen D-manosa. Las cepas que causan infección del conducto urinario comúnmente no muestran adherencia mediada por D-manosa, pero tienen pili P, que se unen a una porción del antígeno P_f del grupo sanguíneo; la estructura mínima para el reconocimiento es un disacárido α -D-galactopiranosil-(1-4) β -D-galactopiranosido (adhesión mediante enlace GAL-GAL). La *E. coli* que causa enfermedades diarreicas muestran adherencia mediada por pili a las células del epitelio intestinal, aunque los pili y los mecanismos moleculares específicos de la adherencia parecen ser diferentes según la variedad de *E. coli* causante de la diarrea. (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2005).

ANTECEDENTES.

Estructura química de los receptores Gb₃.

El receptor Gb₃ es una globotriaosilceramida, que tiene función de glucoesfingolípido neutro (Gal α -1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow ceramida), une a la toxina de shiga y el entrecruzamiento conduce a la apoptosis. (Charles A. Janeway Jr., 2003).

Su estructura química es la siguiente:



Gb₃

Células que expresan Gb₃.

Las células B de centro germinal expresan Gb₃ en su superficie, su función es de un glucoesfingolípido neutro, que une la toxina de shiga a la superficie. El receptor B o BCR, es una inmunoglobulina unida a la membrana que se expresa en la superficie de la célula B y sirve como receptor celular del antígeno. Las células B diferenciadas a células plasmáticas secretan inmunoglobulinas con la misma especificidad antigénica denominadas anticuerpos. La secreción de anticuerpos, que se unen a agentes patógenos o a sus productos tóxicos en los espacios extracelulares del organismo, es la principal función efectora de las células B en la inmunidad adaptativa. (Charles A. y Janeway Jr., 2003).

La célula B expresa una variante de IgM que se localiza en la superficie celular. La IgM de la superficie tiene la misma especificidad antigénica de la molécula del anticuerpo IgM secretado, esto se logra mediante un mecanismo de “splicing” o empalme diferencial del RNA. El RNA de la cadena μ puede incluir una secuencia que codifica para cerca de 25 aminoácidos hidrofóbicos, misma que le permite a la molécula de IgM localizarse en la membrana celular como un receptor transmembranal. Posteriormente, en el desarrollo de la célula B, la regulación del procesamiento del RNA permite la expresión de una variante de IgD unida a la

membrana, nuevamente con la misma especificidad de unión con el antígeno. A lo largo de este proceso, el mismo segmento de la región V se expresa con diferentes segmentos de la región C. Como receptores unidos a la membrana, la IgM o la IgD interactúan con otras moléculas de la superficie celular, conocidas como Ig α e Ig β , que pueden transducir señales después de la unión con el antígeno al interactuar con moléculas de tirosinacinas y otros componentes de maquinaria de transducción de la señal. Estas señales provocan eventos bioquímicos que involucran a fosfatasas intracelulares, cinasas, proteínas de fijación del GTP, mediadores lipídicos, iones de calcio y otros intermediarios que eventualmente conducen a la activación celular. (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2005).

El receptor Gb₃ también está presente en células endoteliales, especialmente en el endotelio de glomérulo renal y de otras áreas de la microcirculación, en células tubulares renales y en glóbulos rojos del grupo sanguíneo Pk. (Paton J, Paton A., 1998 y Besser R. 1999). También se ha hecho la detección de Gb₃ por medio de inmunohistoquímica en cerebro de rata, conejo y humanos resultando esta positiva. (Iku U., 2001).

Células que expresan Gb₃ en el conejo.

En un estudio previo la toxina de Shiga causó efecto enterotóxico y neurotóxico en conejos mediado por el receptor celular Gb₃. Por otro lado en el modelo desarrollado por Valdivia A.G. 1995 se pudo apreciar que el conejo dio un efecto renal más marcado que el reportado para el cerdo y, en base a la bibliografía, que este efecto pudiera ser por la mayor cantidad de Gb₃ a nivel glomerular, principalmente del lado capilar. Por lo que se concluyó que las células que manifiestan Gb₃ en su superficie son las del endotelio vascular, células endoteliales intestinales, células renales y células de S.N.C. (Valdivia A. G., 1995).

Factores que afectan la expresión del receptor.

Se ha determinado que en el conejo el receptor Gb₃ aparece a los 16 días de edad en el intestino, lo que explica el efecto enterotóxico. Observándose que la cantidad de Gb₃ se incrementa hacia el destete, a diferencia con otras especies animales como el ratón que al nacimiento tienen Gb₃ pero su cantidad se disminuye al destete, esto probablemente sea regulado por hormonas. (Valdivia A.G., 1995).

Revisión de la enfermedad de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).

A pesar de que el término SUH fue introducido en 1954 por Passer, se hace una revisión cuidadosa de la vieja literatura que revela algunas observaciones trascendentes. En 1927, Adam (Adam, A. 1927) reportó una epidemia infantil de gastroenteritis producida por un tipo especial de bacteria coniforme con propiedades fermentativas únicas. Posteriores observaciones, describieron una enfermedad similar, con diarrea y que ocasionalmente se complicaba con púrpura, anuria y anormalidades neurológicas. En la necropsia, estos casos evidenciaban trombosis capilar y arteriolar y oclusión del ovillo glomerular por trombos de fibrina (Adam, A. 1927), fue considerada *E. coli* serotipo O111:B4 el agente causal en más del 90% de estos casos (Belnap, W.D. 1955). Varios años después, Konovalciuck (Konowalchuk, J. 1977) observó que las cepas *E. coli* aisladas de heces humanas provenientes de casos con diarrea, producían una toxina similar por *Shigella dysenteriae* (tipo 1), llamada Shigatoxina o Stx, la que resultaba citopática para las células Vero (células de riñón de mono africano). Subsecuentemente, esta toxina recibió diferentes nombres, tales como Toxina Shiga-Like SLTx o Verotoxina

(O'Brien, A.D. 1987). En 1978 Koster y col. (Koster, 1978) propusieron que una toxina circulante fuese la causa de la colitis, hemólisis e insuficiencia renal presente en niños con SUH y evidencia de infección con *Shigella dysenteriae* tipo 1. Pocos años después un estudio de caso-control de Riley y colaboradores (Riley, L.W., 1983) encontró una fuerte asociación entre colitis hemorrágica e ingestión de hamburguesas contaminadas con *E. coli* O157:H7. El aislamiento posterior de la misma cepa *E. coli*, con únicas propiedades fermentativas del sorbitol, en la mitad de 47 niños con diarrea y en ninguno de los sujetos sanos usados como control sugirió una fuerte relación de causa efecto entre la ingestión del alimento contaminado y la colitis hemorrágica (Riley, L.W., 1983). En el mismo período Karmali y col. demostraron la actividad de Stx en filtrados de heces, así como también un aumento en el título sérico de anticuerpos neutralizantes de la Stx en niños con infección por *E. coli* O157:H7 y diarrea esporádica asociada con SUH (Karmali, M.A., 1983). De esta manera a casi 60 años después de las observaciones por Adams y col. (Karmali, M.A., 1983), estos hallazgos suministraron una demostración definitiva del rol directo de una toxina bacteriana (Stx) en la patogénesis del SUH. Las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas en pacientes con SUH generalmente producen ambas toxinas Stx1 y Stx2 (Keusch, G.T. 1997 y Paton, J.C. 1998). En una reciente epidemia de colitis hemorrágica producida por Stx1 ningún paciente desarrolló SUH, lo cual podría sugerir que la Stx2 de la *E. coli* es el patógeno principal en la mayoría de los casos de SUH. (Hashimoto, H., 1999).

Agentes implicados en la activación y daño endotelial.

La secuencia de eventos que unen la infección con *E. coli* a las manifestaciones de la enfermedad no son completamente conocidas. Luego de la ingestión oral de alimentos o agua contaminada, *E. coli* O157:H7 alcanza el intestino y se adhiere firmemente a las células epiteliales de la mucosa intestinal. La adhesión a través de una proteína externa de membrana de 97 kDa llamada intimina (Jerse, A.E. 1991), produce una lesión característica de adhesión y eliminación, destinada a prevenir la expulsión del microorganismo (Donnenberg, M.S., 1993). La rotura consecuente del borde en cepillo es suficiente “per se” para ocasionar diarrea sanguinolenta. Sumado a esto, *E. coli* O157:H7 (así como también otros serotipos productores de Stx como *E. coli* O111, y las no móviles O26:H11 o O103:H2) pueden producir grandes cantidades de Stx, la cual atraviesa las células epiteliales polarizadas gastrointestinales, probablemente a través de la vía transcelular (Acheson, D.W.K., 1996), para luego arribar a la circulación general. La forma de transporte de la toxina desde el intestino hacia los diferentes órganos es aún desconocida, no obstante nunca fue detectada toxina libre en circulación en pacientes con SUH (Uchida, H., 1999). Un reciente estudio observó *in vitro* una rápida unión de la Stx a los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), no así a los hematíes, monocitos, plaquetas y lipoproteínas (te Loo, 2000) El receptor de los PMNs para la Stx, tiene 100 veces menor afinidad por la toxina que el receptor de alta afinidad (globotriaosilceramida) presente en las células endoteliales glomerulares. Como consecuencia de ello, al menos *in vitro*, los PMNs cargados de toxina transfieren el ligando a las células epiteliales glomerulares lo cual promueve la muerte celular (te Loo, 2000).

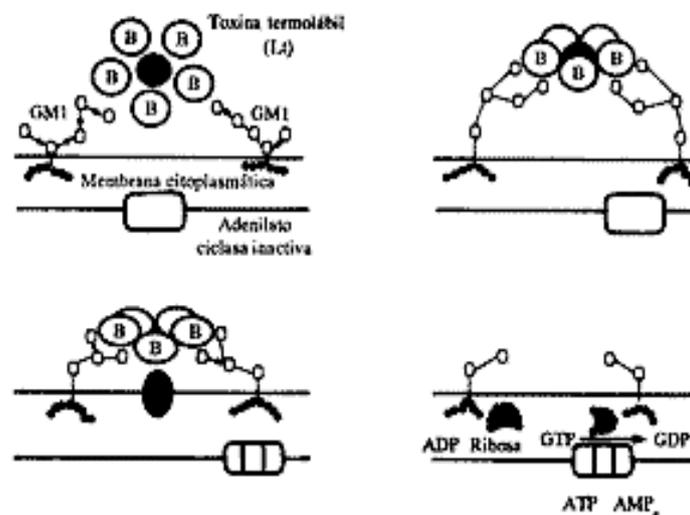
Shigatoxinas.

Las shigatoxinas (Stx) se clasifican de acuerdo a la similitud antigénica con la toxina de shiga. Aquellas cuya actividad citotóxica es neutralizada por antisuero contra la toxina de Shiga son llamadas como tipo 1 (Stx-1), en tanto que las Stx sin neutralización cruzada con el antisuero para Stx son clasificadas como tipo 2 (Stx-2). Existen también subtipos de Stx2 (Stx-2c y Stx-2e) que comparten propiedades de hibridación cruzada de sus genes, pero muestran diferencias significativas en sus actividades biológicas, reactividad serológica y unión al receptor (Calderwood, S.B., 1998). Todos los miembros de la familia de las Stx consisten de pentámeros de 7-8 kd llamados subunidades de unión (subunidades B) asociados en manera no covalente con subunidades enzimáticas de aproximadamente 35 kd (subunidades A). Las Stx se unen a las células blanco a través de un glicolípido neutro Gb₃ y la globotetraocilceramida Gb₄, y producen una inhibición de la síntesis proteica en las células blanco a través de la actividad de una glicosidasa-N específica de las subunidades A que actúan en un sitio adyacente a la adenina- 4324 en el componente 28 S rRNA de los ribosomas eucariotes (Inward, C.D., 1995). Las células del epitelio glomerular humano son sensibles a los efectos citotóxicos de la Stx, en particular cuando la exposición al TNF α incrementa en la superficie celular la expresión de Gb₃, ya que el Gb₃ media en la unión e internalización de la toxina por endocitosis (Van Setten, 1997). Los receptores de la Gb₃ contienen ácidos grasos de cadena corta que conducen a la toxina al retículo endoplásmico en lugar del aparato de Golgi y de esta manera incrementan la citotoxicidad de la toxina (Kiarash, A., 1994, Sandvig, K., 1996 y Arab, S. 1998). Las diferencias genéticas en la composición de los ácidos grasos de la Gb₃ pueden explicar la diferente susceptibilidad individual a los efectos de la toxina (Arab, S. 1998). Los efectos usuales de la Stx son la inhibición de la síntesis proteica y la muerte celular. Las subletales de Stx pueden también alterar la producción de mediadores vasoactivos provenientes del endotelio, tales como endotelina y óxido nítrico, los cuales a su vez pueden contribuir a los cambios microvasculares tales como la colitis hemorrágica y el SUH (Bitzan, M.M., 1998).

Las células mesangiales, las células epiteliales de los tubulos renales, los monocitos y las líneas celulares derivadas de los monocitos, son también susceptibles a los efectos tóxicos de la Stx (Andreoli, S.P. 1999). La Stx-1 produce una inhibición de la síntesis proteica en las células mesangiales humanas, además de dicho efecto se ha demostrado potenciado al incubar dichas células con IL-1 y TNF α (van Setten, 1997). La Stx produce también apoptosis de las células tubulares proximales humanas, este efecto también se ha visto potenciado por IL-1, LPS y TNF α (Hughes, A.K., 1998). Varias líneas celulares incluidos los macrófagos (Harel, Y., 1993), monocitos (van Setten, 1998, Inward, C.D., 1997), líneas celulares derivadas de los monocitos (van Setten, 1998, Inward, C.D., 1997) y las células tubulares (Hughes, A.K., 1998) al ser expuestas a dosis subletales de toxina resultan estimuladas para producir grandes cantidades de citocinas, tales como TNF α , IL-1 e IL-6. Este proceso se acompaña de un incremento en la expresión de mRNA mediado por la translocación nuclear de los activadores nucleares: factor Kappa B y activador de la proteína 1 (Sakiri, R., 1998). Algunas de estas citocinas, tal como IL-8, estimulan la degranulación de los PMNs y la liberación de enzimas oxidantes y proteolíticas como la elastasa (Fitzpatrick, M.M., 1992). El aumento en la regulación de la producción de citocinas, activación de los PMNs y el incremento de la actividad oxidativa, potencian los efectos citopáticos directos de

la Stx, todo lo cual sirve para amplificar el daño vascular y alterar el fenotipo normal de tromboresistencia de las células endoteliales (Andreoli, S.P. 1999).

Existe evidencia experimental que demuestra la coincidencia en los sitios de expresión de la Gb₃ con los sitios de daño tisular producidos por la Stx (Zoja, C. 1992). Luego de una provocación con Stx-1 purificada de *E. coli* O157:H7, los conejos presentan alteraciones neurológicas y entéricas que se manifiestan con edema endotelial y oclusión de las pequeñas arterias y arteriolas, pero sin signos de compromiso renal (Zoja, C. 1992). En humanos, el receptor Gb₃ se expresa en la membrana de las células epiteliales y endoteliales de la mucosa y submucosa gastrointestinal respectivamente y en las células endoteliales y tubulares renales, particularmente en la corteza renal (Boyd, B. 1989). Un estudio reciente demostró que la Stx daña directamente las células del tubulo proximal y que este efecto aumenta ante la presencia de IL-1 y lipopolisacaridos (Kaplan, B, S, 1998). Es por ello que se ha especulado que la distribución gastrointestinal y renal del receptor Gb₃ puede conducir al daño tisular, causando diarrea sanguinolenta e insuficiencia renal. (Kaplan, B, S, 1998).



Mecanismo de acción de la Toxina Shiga

Adhesinas.

E. coli es capaz de permanecer en el tracto urinario o en el tracto digestivo debido a que son capaces de adherirse a las células en estos aparatos y evitar ser eliminados por el empuje de la orina en la micción o por la motilidad intestinal. Poseen numerosas adhesinas muy especializadas. Estas incluyen factores antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III), fimbrias de adherencia y agregación (AAF/I, AAFII), pili que forman haces (Bfp), intimina, pili P (que también se une a los antígenos del grupo sanguíneo P), Proteína Ipa (antígeno del plasmido de invasión) y fimbrias Dr (que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo Dr) (Patrick R. Murray, 1994).

Exotoxinas.

E. coli produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa y STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II). Además las hemolisinas (HlyA) se consideran importantes en la patogénesis de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógeno. (Patrick R. Murray, 1994).

Endotoxinas.

Ante una infección por *E. coli*, las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos o LPS) y la Stx se sinergizan en el daño inicial a los órganos blanco, incluido el riñón (Karpman, D., 1997). Los LPS suceptibilizan a las células endoteliales a la apoptosis cuando son expuestas a cantidades picomolares de Stx (van Setten, 1997, Louise, C.B. 1995). Además los LPS provenientes de *E. coli* productoras de Stx activan a los PMN a liberar TNF α , IL-1, elastasa y radicales libres que son altamente tóxicos para el endotelio microvascular (Forsyth, K.D., 1989).

Consecuencias del daño vascular, pérdida de la trombo resistencia fisiológica.

Todas las propiedades del endotelio vascular normal están virtualmente alteradas en el SUH/PTT. Las células endoteliales sintetizan muchas sustancias involucradas en la coagulación y fibrinólisis, incluyendo prostaciclina, óxido nítrico, trombomodulina, inhibidor del activador tisular del plasminógeno y proteína S. Han sido reportadas alteraciones en los niveles de estas sustancias en el SUH/PTT. Particularmente, ha sido demostrada una capacidad reducida para formar PGI₂ *in vitro* (Remuzzi, G., 1978), y muy probablemente esto también ocurre *in vivo*, como ha sido documentado por la reducción en la excreción urinaria del producto de hidrólisis 6-ceto-PGF_{1 α} el cual refleja la síntesis renal de PGI₂, como ha sido encontrado en niños con SUH en la etapa aguda de la enfermedad (Noris, M., 1992). La relajación de las arterias renales de resistencia dependiente del endotelio, constituye una prueba indirecta de la síntesis alterada de óxido nítrico, que se muestra deteriorada en animales tratados con CsA (Takenaka, T., 1991). Estos animales pueden desarrollar lesiones microvasculares que recuerdan a las del SUH, sumado a la evidencia existente que la síntesis de óxido nítrico esta reducida en el SUH (Siegler, R.L., 1991). El segundo mensajero del óxido nítrico, el GMPc, esta significativamente reducido en la orina de los niños con SUH agudo y se normaliza con la recuperación del cuadro. Si las anormalidades citadas reflejan simplemente la injuria a las células endoteliales o son de importancia fisiológica no esta aún determinado. La pérdida de prostaciclina y óxido nítrico y el incremento en el factor de von Willebrand podría resultar en una pérdida de la trombo resistencia fisiológica del endotelio normal y la consecuente agregación plaquetaria a los diversos lechos vasculares en todo el organismo, creando un círculo de vasoconstricción con depósito de fibrina y plaquetas y posterior trombosis. En este sentido es de interés notar que la Stx es un instrumento para promover la adhesión plaquetaria y trombosis en las células endoteliales en condiciones de alto estrés (Galbusera, M., 1998). Además, las células del endotelio microvascular son remarcablemente más susceptibles que el endotelio de los grandes vasos a la activación plaquetaria y trombosis inducida por la Stx, lo cual esta en relación con la alta expresión de los receptores para la Stx en la micro circulación. (Galbusera, M., 1998).

Hallazgos patológicos.

En el SUH, los microtrombos están confinados casi exclusivamente al riñón es por ello que el fallo renal es la característica predominante. En la PTT, el cerebro es el órgano involucrado principalmente y aparentemente los microtrombos se forman y dispersan repetidamente, produciendo síntomas neurológicos intermitentes. Los pacientes pediátricos, principalmente los niños menores de 2 años, con SUH asociado a Stx, es predominante el patrón de daño glomerular. Los infiltrados leucocitarios y los trombos son frecuentemente observados en la fase temprana de la enfermedad y usualmente se resuelven en 2 o 3 semanas (Kaplan, B.S., 1998). En adultos es raro el compromiso glomerular puro. En tanto que la afección vascular es el hallazgo predominante, asociado con hipertensión arterial severa, frecuente compromiso neurológico con secuelas y alta mortalidad.(Morel-Maroger, 1980).

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar la participación de los factores auxiliares de virulencia (Stx1, Stx2, A/E) de *Escherichia coli* O157:H7 en la expresión de receptores de Gb₃ para las toxinas Stx.

Objetivos particulares.

Determinar la expresión de los receptores para las toxinas Stx1 y Stx2 en el riñón y apéndice cecal del conejo, causados por la infección experimental con la cepa de referencia EDL933.

Determinar la sobre expresión de los receptores para las toxinas causados por el factor A/E, endotoxina y toxinas Stx de *Escherichia coli* O157:H7; en el riñón y apéndice cecal del conejo.

Determinar el posible papel de los factores auxiliares de virulencia (Stx1, Stx2, A/E) en la patogénesis de la infección experimental en el conejo.

Hipótesis.

La infección experimental en el modelo de conejos incrementa los receptores Gb₃, asociándolo a los factores auxiliares de virulencia: A/E así como a las toxinas Stx1 y Stx2 de las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se hizo la identificación previamente de las cepas de *E. coli* mediante las pruebas bioquímicas como Citratos (Bioxon), reducción de Nitratos (Difco), Urea (Bioxon), TSI (Hierro y triple azúcar) (Bioxon), MIO (Movilidad producción de Indol y actividad de Ornitina descarboxilasa) (Bioxon), LIA (Lisina Hierro Agar) (Bioxon), MR-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer) (Bioxon), Sorbitol (Bioxon) y Tinción de Gram, esto para asegurar que el inóculo no estuviera contaminado por otras bacterias y que no desviara los resultados posteriores.

Primero se hizo un sembrado de las cepas donde se utilizó Agar soya tripticaseína, Medio de Mc Conkey, EMB, de la marca Bioxon, Posteriormente se realizaron la pruebas bioquímicas utilizando medios para MIO, TSI, LIA, Citratos, Urea, MR-VP y Sorbitol.

Se hicieron pruebas bioquímicas a las 6 cepas de referencia, y se determinó el género y la especie, con las tablas de clasificación de Enterobacterias (Cowan, S., 1979, Holt, J., 1994).

Las cepas EDL 933 MED, K12, 933 J y 933 W fueron donadas por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM y la cepa EDL 933 IBT y EDL933 Δ -ler, por el Dr. José Luis Puente del Instituto de Biotecnología de la UNAM. (Cuadro # 1).

FACTORES AUXILIARES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* USADAS EN EL TRABAJO CUADRO # 1

CEPA	SEROTIPO	Stx 1	Stx 2	Gen eae	Ag O	LPS
K 12	OR	-	-	-	-	+
EDL 933 IBT	O157:H7	+	+	+	+	+
EDL 933 MED	O157:H7	+	+	+	+	+
EDL933 Δ -LER	O157:H7	+	+	-	+	+
933 J	OR	+	-	-	-	+
933 W	OR	-	+	-	-	+

OR.- antígeno O de tipo rugoso

Obtención de los tejidos.

Se llevó a cabo la inoculación de las cepas faltantes, EDL 933 MED y EDL 933 IBT en el apéndice cecal, por medio de la cirugía previamente descrita. (Valdivia Anda Guillermo, 1995). Las demás cepas como K12, 933 Δ -ler, 933 J y 933 W ya se habían obtenido órganos por medio de trabajos previos. (Cortes Fernández de A. Norhan, 2003, Brambila González Adriana y Martínez Rivas Mariana, 2006). (Cuadro # 2)

CONEJOS INOCULADOS PREVIAMENTE Y PARA EL PRESENTE TRABAJO CUADRO # 2

CEPAS	CST	K12	EDL 933 Δ -LER	EDL 933 J	EDL 933 W	EDL 933 IBT	EDL 933 MED
NÚMERO DE CONEJOS INOCULADOS	*4	*6	*4	*3	*6	●2	*3 ●2

* Conejos inoculados previamente en otros trabajos de tesis de licenciatura. (Cortes Fernández de A. Norhan, 2003, Brambila González Adriana y Martínez Rivas Mariana, 2006).

● Conejos inoculados en el presente trabajo.

Las muestras de los tejidos de los conejos fueron tomados de un trabajo previo correspondiente. (Cortes Fernández de A. Norhan, 2003, Brambila González Adriana y Martínez Rivas Mariana, 2006), en los casos en que no se contaba con el tejido o estaba dañado, se realizó la cirugía de acuerdo a la técnica descrita en Valdivia A.G., 1995, la cual se describe brevemente a continuación.

Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda blancos con un peso entre 1.6 Y 1.7 Kg. para la realización de las cirugías, los animales se obtuvieron de la granja de cunicultura de la FESC Campo # 4.

*Se pusieron a los conejos en ayunas durante 24 h. aproximadamente antes de las cirugías.

*Se limpió y desinfectó el quirófano con una solución de cloruro de benzalconio, tanto mesa de cirugía como mesa mayo y el material de cirugía como batas, gasas y jeringas se esterilizaron previamente en la autoclave. El material de corte se colocó en una solución de cloruro de benzalconio una hora previa a la cirugía. 10 ml en un litro de agua y por último las manos fueron lavadas con agua y jabón quirúrgico.

*Antes de anestesiarse a los conejos se sangraron de la vena yugular para posteriormente procesar las muestras en el laboratorio. En este tiempo se rasuraron del cuello y del abdomen.

*Se tranquilizó a los animales con propionilpromazina (Combelen) a una dosis de .3 ml y posteriormente se anestesió con ketamina (Anesket) a una dosis de 1.2 a 1.3 ml dependiendo del peso de cada animal ya que algunos requirieron de un poco más. Las dosis de tranquilizante y anestésico fueron aplicadas por vía intramuscular.

*Se colocaron los conejos en decubito dorsal en la mesa de cirugía sujetados de las 4 extremidades, nos cambiamos para la realización de las cirugías poniéndonos las pijamas y guantes estériles así como cofia y cubre bocas se hizo la asepsia del área abdominal previamente rasurada, con una solución de benzal.

*Se delimitó el área de cirugía con campos estériles, sobre el abdomen del conejo previamente esterilizado.

Cirugía.

Se procedió a hacer la incisión sobre la línea media del abdomen a partir del proceso Xifoides 4 cms hacia abajo antes de llegar a la cicatriz umbilical. Se incidió piel, tejido subcutáneo, músculo sobre la línea alba y peritoneo hasta llegar a cavidad. Se localizó el apéndice cecal en el cuadrante posterior derecho. Se delimitó y se pusieron gasas alrededor de la incisión humedecidas con S.S.F. estéril y se estuvo rehidratando el órgano todo el tiempo.

Ya localizada la apéndice cecal se localizó e identificó la irrigación anatómicamente del órgano, también se seleccionó la parte para la inoculación, esta se consideró del ápice del saco ciego 3 a 4 cms hacia atrás aproximadamente (figura # 1). Teniendo identificado esto se prosiguió con la hemostasis de la arteria principal que irriga estas porciones, se fueron ligando y seccionando (figura # 2), una vez terminado con la separación de la irrigación arterial se procedió a diseccionar el órgano el cual fue sostenido por unas pinzas de mosquito. La porción que quedó del lado contrario del saco ciego se cerró primero con una sutura de Conell y después con

Cushing, al terminar se rehidrató y se regresó a cavidad abdominal (figura # 3). La porción restante se hizo lo siguiente: se protegió toda el área con gasas humedecidas a manera de que cualquier sustancia no cayera en cavidad abdominal, se lavó el órgano introduciendo una sonda con S.S.F. estéril y salieron todos los desechos que había en ella, estos se depositaron en un frasco donde cayó todo el contenido (figura # 4), una vez terminado con el lavado y sin quedar residuos se sacó la sonda y se retiró el frasco. Después se tomó el inculo y se le inyectó 1 ml dentro del saco, con la precaución necesaria para que no hubiera alguna infección en cavidad abdominal produciendo una peritonitis posterior. Al terminar se limpió y se desinfectó el área de inoculación con unos toques de benzal antes de suturar.



Figura # 1



Figura # 2



Figura # 3



Figura # 4



Figura # 5



Figura # 6

Al terminar con la desinfección se procedió a suturar de igual manera primero con una sutura de tipo Conell y después con Cushing. Al terminar se limpió y se rehidrató el órgano para regresarlo a cavidad abdominal (figura # 5). En este momento tomó un tiempo séptico en donde se cambió el material de cirugía, campos y guantes.

Después se procedió a cerrar cavidad abdominal por estratos (peritoneo, músculo por línea media, tejido subcutáneo y piel) (figura # 6). Al terminar se le aplicó Negasunt (polvo) para evitar cualquier infección en la herida (figura # 7). (Valdivia A.G 1995).



Figura # 7

Postoperatorio

Posteriormente a todos los conejos que se les realizó la cirugía, se dejaron en jaulas con alimento y agua y se tuvieron en observación durante 7 días, al término de estos días se realizó la eutanasia en forma humanitaria, con sobredosis de anestesia, a los que no morían en este lapso. (Valdivia A.G 1995).

Necropsia y obtención de tejidos.

Al momento de la muerte de los conejos se les hizo la necropsia para obtener los órganos como bazo, riñón, intestino delgado, intestino grueso, apéndice cecal y cerebro, los cuales se pusieron en una solución de paraformaldehído para su conservación. Hubo conejos que no murieron en el tiempo que se tenía determinado (7 días) los cuales se les realizó la eutanasia en forma humanitaria con sobredosis de anestesia. (Valdivia A.G 1995).

Proceso histológico de los órganos.

Los órganos utilizados para la evaluación fueron el riñón y apéndice cecal; previamente puestos en paraformaldehído, se sacaron de la solución, y se obtuvieron cortes por medio de la técnica por congelación.

Se incluyeron los órganos ya cortados en porciones, en el medio para congelación llamado crió preservador Tissue Freezing Medium, un día antes y se pusieron en refrigeración a 4°C.

Posteriormente se sacaron del refrigerador y se pusieron en las bases del criotomo para su corte, el criotomo se encontraba a una temperatura entre -24° a -26° C.

Se realizaron los cortes y se montaron en las laminillas, siendo estos, 3 cortes en cada laminilla, se identificaron, se envolvieron en papel servilleta, por último en papel aluminio y se dejaron en el congelador para su posterior procesamiento.

Método para la estandarización de la prueba.

Para la estandarización del anticuerpo monoclonal anti – hum CD/77 (marca Serotec) y del anticuerpo policlonal anti – rata IgM Conjugado HRP (marca Serotec), se hizo lo siguiente:

Se utilizaron muestras de riñón a las cuales se procesaron una sin CD/77, otra con CD/77 a la dilución con PBS 1:2 y otra con CD/77 directo sin diluir y al mismo tiempo se utilizaron diluciones del conjugado 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000. Tomando en cuenta y como resultado final la laminilla que tuviera menor ruido de fondo y mayor marcaje. (Cuadro # 4).

Técnica de inhibición de peroxidasa endógena.

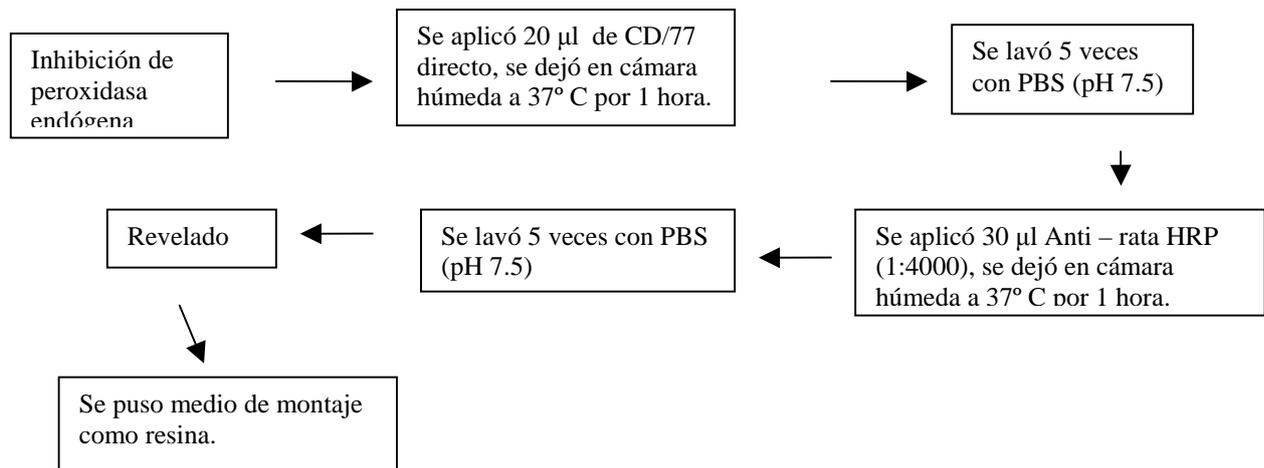
Antes de procesar los tejidos se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos de la siguiente manera:

Se tomaron las laminillas con los tejidos montados y se hidrataron durante media hora.

Después se les agregó una solución de H₂O₂ al 6% y metanol al 80% por 45 minutos.

Por último se enjuagaron con PBS.

Teniendo los tejidos ya listos se siguió el tren de procesamiento siguiente:



El Revelado consistió de:

Reactivo A, que es una solución Buffer

Reactivo B, que es Diaminobencidina

Reactivo C, que es H₂O₂ (peróxido de hidrógeno)

Liquid DAB Substrate Kit (Marca Zymed)

Se preparó en un tubo Eppendorf 1 ml de agua destilada y se agregaron 2 gotas del reactivo A, luego se agregaron 17 µl de reactivo B, se mezclaron y después se agregaron 17 µl de reactivo C, esta solución se agregó a los tejidos al mismo tiempo que se observó al microscopio para ver la reacción de revelado, se detuvo a criterio agregando PBS.

Tinción.

Después se tiñeron las laminillas agregando 20 µl de Hematoxilina y Carbonato de Litio al 1% a cada tejido por 3 minutos, se enjuagó con agua corriente y por último se deshidrataron los órganos sumergiéndolos 3 minutos por solución, las soluciones fueron las siguientes:

OH 80° → OH 96° → OH ABSOLUTO → XILENO I → XILENO II

Se dejaron secar las laminillas por unos minutos, por último se les puso la resina y se cubrieron con los cubreobjetos.

Posteriormente se observaron a microscopio y se leyeron las reacciones obtenidas, teniendo como resultados los siguientes datos en los cuadros de Riñón y Apéndice Cecal. (Cuadro # 5)

RESULTADOS.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS A LAS 6 CEPAS DE REFERENCIA. CUADRO # 3

BACTERIA.	M.I.O.	T.S.I.	L.I.A.	CITRAT.	UREA	MR	VP	SORB.
K12	+ + -	Fermentación de carbohidratos Producción de gas Lactosa (-) No produce acido sulfhídrico	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
EDL 933 IBT	+ + -	Fermentación de carbohidratos Producción de gas Lactosa (+) No produce acido sulfhídrico	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
EDL 933 MED	+ + +	Fermentación de carbohidratos Producción de gas Lactosa (+) No produce acido sulfhídrico	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
EDL 933 Δ-LER	+ + +	Fermentación de carbohidratos Producción de gas Lactosa (+) No produce acido sulfhídrico	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
933 J	+ + -	Fermentación de carbohidratos producción de gas Lactosa (-)	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
933 W	+ + -	Fermentación de carbohidratos No produce gas Lactosa (-)	Descarboxilación de lisina a cadaverina y dióxido de carbono (+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

Todas las pruebas bioquímicas realizadas a las 6 cepas de referencia empleadas en el estudio, se obtuvo que todas confirman al género y especie de *Escherichia coli*, como se observa en el cuadro # 3, esto permitió utilizarlas posteriormente para la inoculación en los conejos.

RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL ANTICUERPO POLICLONAL HRP ANTIRATA IgM (CONJUGADO) Y DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-HUMANO CD/77.

CUADRO # 4

REACTIVOS	RUIDO DE FONDO	MARCAJE	DILUCIONES DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-RATA IgM (CONJUGADO)
Sin anticuerpo monoclonal anti-humano CD77	++	+	1:1000
	++	+	1:2000
	++	-	1:4000
	-	-	1:8000
Con anticuerpo monoclonal anti-humano 1:2 CD77	+	++	1:1000
	+++	++	1:2000
	++	+	1:4000
	++	+	1:8000
Con anticuerpo monoclonal anti-humano CD77 directo.	+++	+++	1:1000
	+	++	1:2000
	+	+++	1:4000
	+	-	1:8000

Para la prueba de estandarización de inmunoperoxidasa, se aprecia que el menor ruido de fondo y mayor marcaje se obtuvo con las diluciones 1:4000 de conjugado y anticuerpo monoclonal anti-humano CD77 sin diluir, por lo tanto es la que se utilizó para el presente trabajo. Estos resultados los podemos apreciar en el cuadro # 4. Por lo tanto la dilución con mejores resultados fue de CD77 directo con conjugado a dilución de 1:4000.

**RESULTADOS DE LA EXPRESION EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS AL APLICAR PBS,
CONJUGADO Y CONJUGADO/CD77
CUADRO # 5**

RIÑÓN	MED Laminilla # 1			MED Laminilla # 2			IBT Laminilla # 3			IBT Laminilla # 4			CST Laminilla # 5		
	pbs	conj	Conj/cd77												
CAPSULA GLOMERULAR	-	+	++				-	-	-	++	+	+	+	-	-
GLOMERULO	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
T.C.P	++	++	+	+	-	++	+	-	-	+	+	++	++	+	++
T.C.D	++	++	+	-	+	-	+	-	+	+	+	++	+	++	+
TUB. COLECOR	/	+	+++	-	-	+	++	++	++	+	++	+	+	+	+
ASA DE LA NEFRONA	/	+	+++	-	-	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+
VASO SANG.	/	++	++++	-	-	-	+	++	++	+	++	+	++	+++	++
AP. CECAL															
DOMO SUPERF.	-	-	-	/	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
LINFO. MUCOSA	+	+	+	+	++	+	-	+	+	++	++	++	-	-	-
LINFO. SUBMUC	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SUPERF. VELLO.	/	/	/	-	-	-	/	/	/	/	+	/	-	-	+
PAR INT. VELLO	/	/	/	-	-	++	/	/	/	/	+	+	-	-	-
LUZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RIÑÓN	CST Laminilla # 6			MED Laminilla # 8			IBT Laminilla # 9			MED Laminilla # 10			933 J Laminilla # 11		
	pbs	conj	Conj/cd77	Pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	-	+	+	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLOMERULO	-	+	+	-	++	++++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
T.C.P	-	+	+	+	+	++	-	-	-	-	+	-	-	+	+
T.C.D	-	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TUB. COLECOR	-	++	++	+	+	++	-	-	-	-	+	++	+	+	+
ASA DE LA NEFRONA	-	+	+	+	+	++	-	-	-	-	+	++	+	+	+
VASO SANG.	-	+	+	+	++	+	-	-	-	-	+	+	+	++	++
AP. CECAL															
DOMO SUPERF.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LINFO. MUCOSA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	+	-	-
LINFO. SUBMUC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	+	-	-
SUPERF. VELLO.	-	-	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-	/	-	-
PAR INT. VELLO	-	-	-	-	-	/	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
LUZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RIÑÓN	933 J Laminilla # 12			933 W Laminilla # 13			933 W Laminilla # 14			933 W Laminilla # 15 >			933 W Laminilla # 16		
	pbs	conj	Conj/cd77	Pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	+	+
GLOMERULO	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	+	+
T.C.P	-	-	-	-	+	-				-	-	-	-	++	++
T.C.D	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	++	++
TUB. COLECOR	-	++	-	-	-	-				-	-	-	-	+	+
ASA DE LA NEFRONA	-	+	-	-	-	-				-	-	-	-	+	+
VASO SANG.	-	+	-	-	-	-				-	-	-	+	+	+
AP. CECAL															
DOMO SUPERF.	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-
LINFO. MUCOSA	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-
LINFO. SUBMUC	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-
SUPERF. VELLO.	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-
PAR INT. VELLO	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-
LUZ	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-

RIÑÓN	Δ - LER Laminilla # 17			Δ - LER Laminilla # 18 *			K 12 Laminilla # 19 *			K 12 Laminilla # 20			K 12 Laminilla # 21		
	pbs	Conj	Conj/cd77	pb	Conj	Conj/cd77	pb	conj	Conj/cd77	pb	conj	Conj/cd77	pb	conj	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GLOMERULO	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T.C.P	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
T.C.D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TUB COLECOR	+	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+
ASA DE LA NEFRONA	+	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
VASO SANG.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
AP. CECAL															
													ND	ND	ND
DOMO SUPERF	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	/
LINFO.MUCOS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	/
LINFOSUBMU	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
SUPERF.VELL	/	/	/	-	-	-	-	-	+	-	-	-	/	/	/
PAR INTVELL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	/	/
LUZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RIÑÓN	K 12 Laminilla # 22			K 12 Laminilla # 23 >			pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77
	pbs	conj	Conj/cd77	pbs	conj	Conj/cd77									
CAPSULA GLOMERULAR	-	-	-	-	-	-									
GLOMERULO	-	-	-	-	-	-									
T.C.P	-	-	-	-	-	-									
T.C.D	-	-	-	-	-	-									
TUB. COLECOR	-	-	-	-	-	-									
ASA DE LA NEFRONA	-	-	-			-									
VASO SANG.	-	-	-	-	-	-									
AP. CECAL															
DOMO SUPERF.	-	-	-	-	-	-									
LINFO..MUCOSA	-	-	-	-	ND	+									
LINFO. SUBMUC	-	-	-	-	ND	+									
SUPERF. VELLO.	-	-	-	-	/	/									
PAR INT. VELLO	-	-	-	-	-	-									
LUZ	-	-	-	-	-	-									

/ Se perdió

ND No determinado

Reacción muy leve +

Reacción leve ++

Reacción Moderada +++

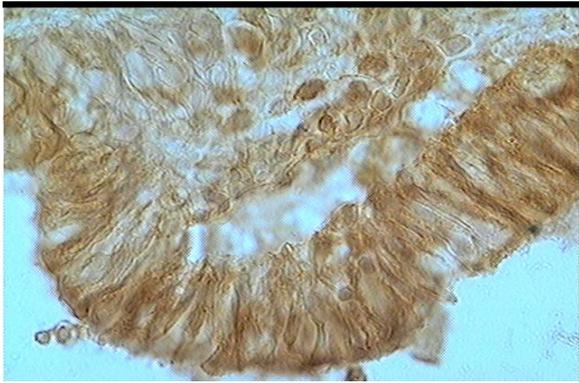
Reacción Severa ++++

En el cuadro # 5 se pudo observar las reacciones de la expresión del receptor Gb₃/CD77 por cepa en Riñón y Apéndice Cecal al hacer el procesamiento de las laminillas con PBS, PBS/conjugado y CD77/conjugado. Los resultados se midieron de forma cualitativa en donde CST y K-12 se utilizaron como controles negativos, las (+) (++) se consideró como una expresión constitutiva y (+++) (++++) se consideró como una reacción de sobreexpresión del receptor Gb₃.

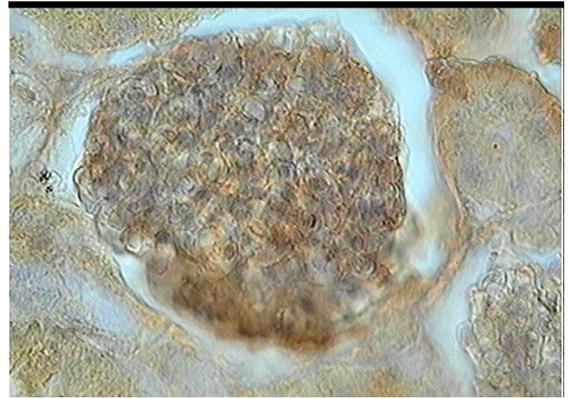
Al momento de aplicar PBS solo y conjugado solo, se observó que se presentó expresión del receptor de forma constitutiva en algunas laminillas como se observa en las numero 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 21 y en otras no se presentó reacción como se observa en las laminillas numero 2, 9, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23.

Donde se aplicó conjugado/CD77, se presentó sobreexpresión del receptor y esto se aprecia en las laminillas # 1, 8 y 17. Esta sobreexpresión fue principalmente notada a nivel de riñón, mientras que en apéndice cecal la expresión fue mínima.

En las siguientes figuras se muestran ejemplos de la forma en como fue medida la expresión constitutiva y la sobreexpresión del receptor Gb3/CD77.



CST (-)



K-12 (-)



EXPRESIÓN CONSTITUTIVA (+)



EXPRESIÓN CONSTITUTIVA (++)



SOBREEXPRESIÓN (+++)



SOBREEXPRESION (++++)

El puntilleo fue el factor determinante para la expresión y sobreexpresión del receptor, a mayor cantidad se considero una sobreexpresión, siendo que en cantidad moderada se considero una expresión mínima constitutiva.

RESULTADOS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR Gb3 0 CD77 AL APLICAR CONJUGADO/CD77.

CUADRO # 6

	MED Conejo # 1	MED conejo # 2	IBT conejo # 3	IBT conejo # 4	CST conejo # 5	CST conejo# 6	MED conejo # 8	IBT conejo # 9	MED conejo # 10	933 J conejo # 11
RIÑÓN	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	++	/	-	+	-	+	+++	-	-	-
GLOMERULO	+	/	-	+	+	+	++++	-	-	-
T.C.P	+	/	-	++	++	+	++	-	-	-
T.C.D	+	/	+	++	+	++	+	-	-	-
TUB. COLECOR	+++	/	++	+	+	++	++	-	++	-
ASA DE LA NEFRONA	+++	/	++	++	+	+	++	-	++	-
VASO SANG.	++++	/	++	+	++	+	+	-	+	-
AP. CECAL										
DOMO SUPERF.	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
LINFO. MUCOSA	+	+	+	++	-	-	+	-	-	-
LINFO. SUBMUC	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SUPERF. VELLO.	/	-	/	/	+	-	/	-	-	-
PAR INT. VELLO	/	++	/	+	-	-	/	-	-	-
LUZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	933 J Conejo # 12	933 W conejo # 13	933 W conejo # 14	933 W conejo # 15	933 W conejo # 16	Δ - LER conejo # 17	Δ - LER conejo # 18	K 12 conejo # 19	K 12 conejo # 20	K 12 conejo # 21
RIÑÓN	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	-	-	/	-	+	+++	-	-	-	-
GLOMERULO	-	-	/	-	+	+++	-	-	-	-
T.C.P	-	-	/	-	++	+++	-	-	-	-
T.C.D	-	-	/	-	++	+++	-	-	-	-
TUB. COLECOR	-	-	/	-	+	/	-	-	-	+
ASA DE LA NEFRONA	-	-	/	-	+	/	-	-	-	-
VASO SANG.	-	-	/	-	+	+++	-	-	-	++
AP. CECAL										
DOMO SUPERF.	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	/
LINFO. MUCOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
LINFO. SUBMUC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
SUPERF. VELLO.	-	-	-	-	-	/	-	ND	-	/
PAR INT. VELLO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	/
LUZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	K 12 Conejo # 22	K 12 conejo # 23
RIÑÓN	Conj/cd77	Conj/cd77
CAPSULA GLOMERULAR	-	-
GLOMERULO	-	-
T.C.P	-	-
T.C.D	-	-
TUB. COLECOR	-	-
ASA DE LA NEFRONA	-	-
VASO SANG.	-	-
AP. CECAL		
DOMO SUPERF.	-	-
LINFO. MUCOSA	-	+
LINFO. SUBMUC	-	+
SUPERF. VELLO.	-	/
PAR INT. VELLO	-	-
LUZ	-	-

/ Se perdió el tejido
ND No determinado
 Reacción muy leve +
 Reacción leve ++
 Reacción Moderada +++
 Reacción Severa ++++

En el cuadro # 6 podemos observar los resultados al utilizar conjugado/CD77 y se aprecia de manera más práctica las diferencias que hubo por cada cepa inoculada en cada conejo.

Se presento sobreexpresión en las cepas EDL 933 MED (conejos # 1 y 8) y EDL 933 Δ -ler (conejo # 17) y la expresión mínima constitutiva se aprecia en las cepas EDL 933 IBT (conejos # 3 y 4), 933 W (conejo # 16) CST (conejos # 5 y 6) y para las cepas 933 J y K-12 se presento una reacción leve a nula. La cepa K-12 y el CST se utilizaron como controles negativos.

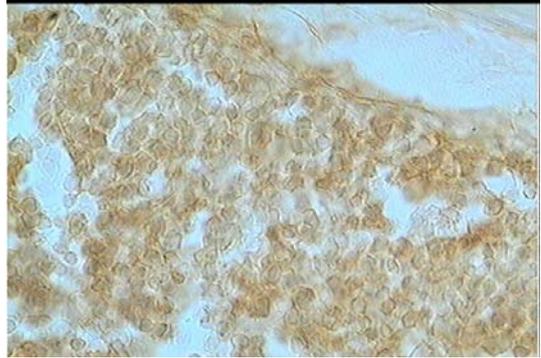
En las siguientes figuras se muestran las células normales y de tejido destruido probablemente por la patogenicidad de la bacteria.

Figura # 8



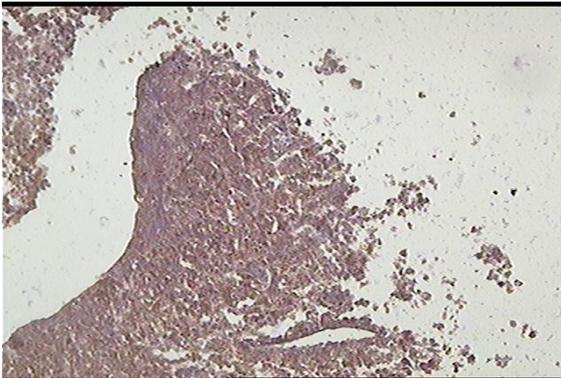
CST A.C. DOMO

Figura # 9



CST A.C. NODULO LINFOIDE DE SUBMUCOSA.

Figura # 10



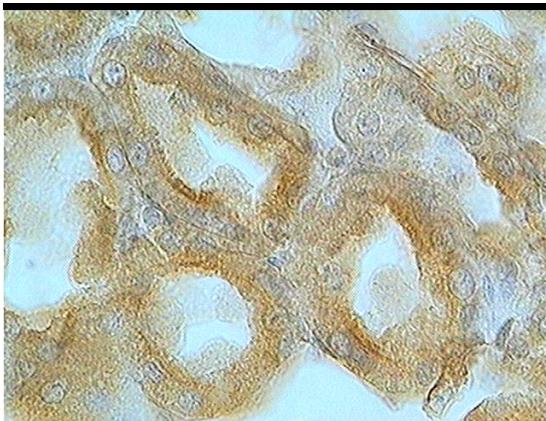
DESTRUCCIÓN DE VELLOSIDADES EN A. C.

Figura # 11



DESTRUCCIÓN DE VELLOSIDADES EN A. C

Figura # 12



TUBULOS RENALES

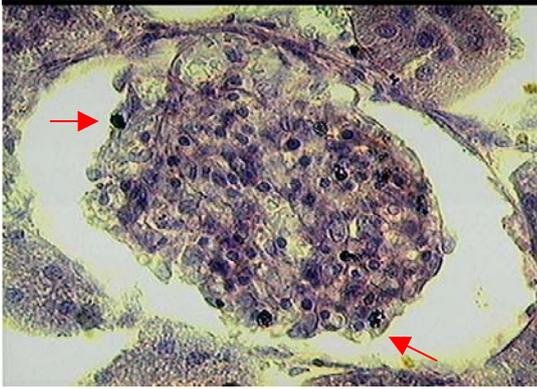
Figura # 13



GLOMERULO RENAL

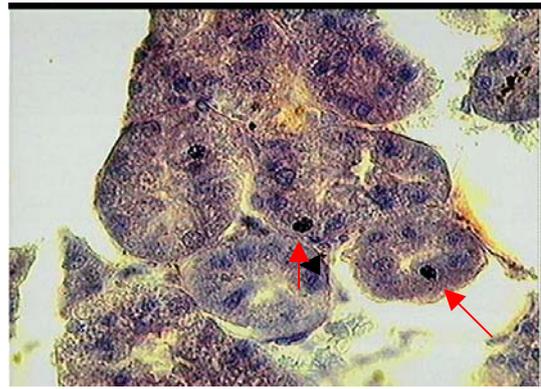
Figuras de células en donde se presentó expresión del receptor Gb3/CD77.

Figura # 14



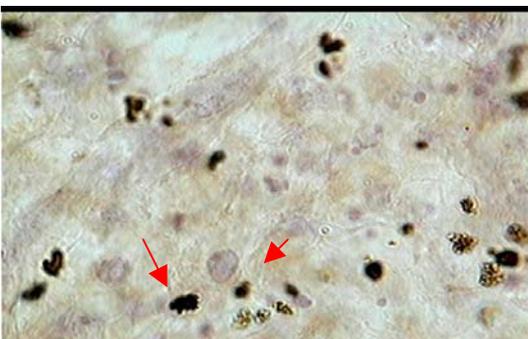
OVILLO GLOMERULAR EDL 933

Figura # 15



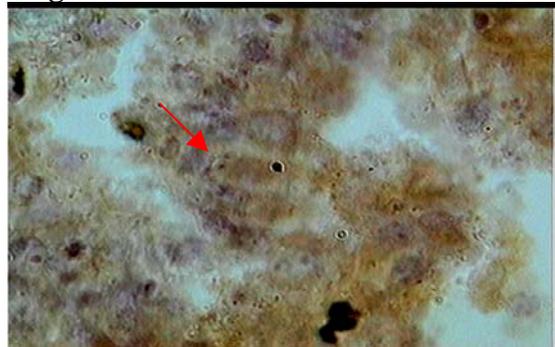
TUBULOS RENALES EDL 933

Figura # 16



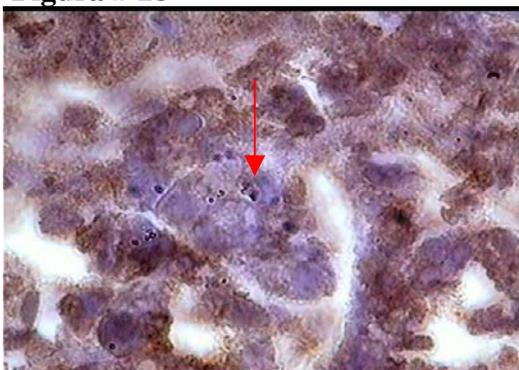
NODULO LINFOIDE DE LA MUCOSA DEL A.C. EDL 933

Figura # 17



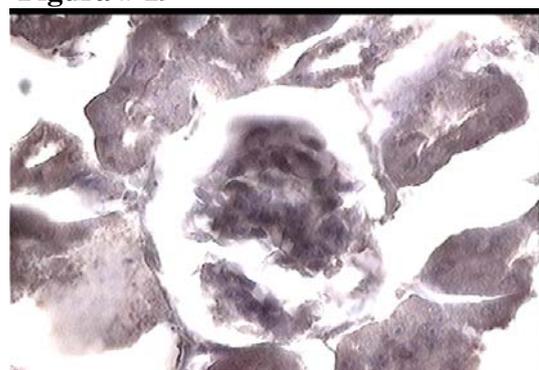
NODULO LINFOIDE DE LA MUCOSA DEL A.C. EDL 933

Figura # 18



NODULO LINFOIDE DE LA MUCOSA DEL A.C. K12

Figura # 19



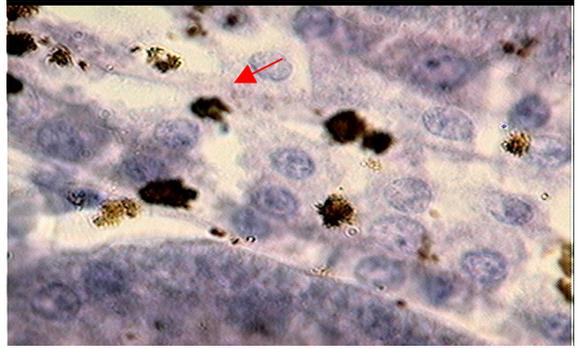
OVILLO GLOMERULAR K12 (-)

Figura # 20



TUBULO RENAL EDL 933

Figura # 21



TUBULO RENAL EDL 933

Figura # 22



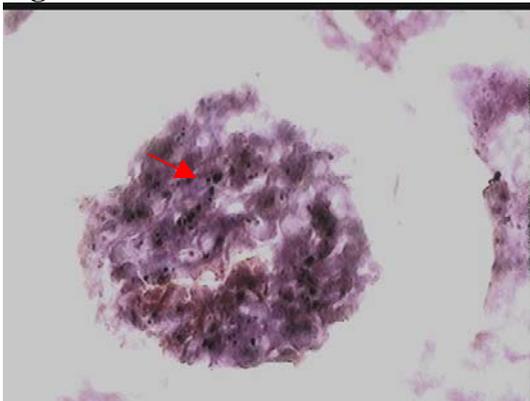
OVILO GLOMERULAR 933 W

Figura # 23



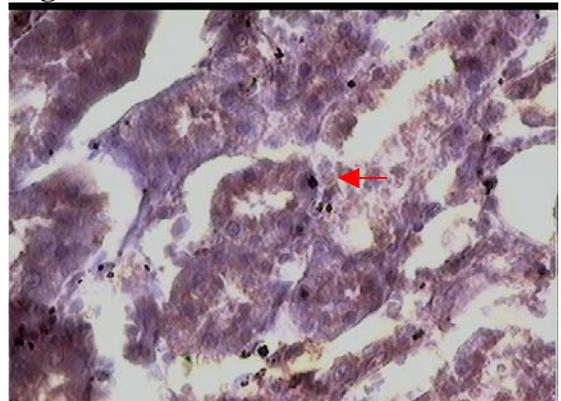
TUBULOS RENALES 933 W

Figura # 24



OVILO GLOMERULAR EDL 933
Δ-LER

Figura # 25



TUBULOS RENALES EDL 933
Δ-LER

EXPRESIÓN DE Gb3/CD77
CUADRO # 7

INOCULO EMPLEADO							
	CST	K12	933 J	933 W	EDL 933	EDL 933 Δ-ler	Posible factor involucrado
RIÑÓN							
CAP BOWMAN	-	-	-	-	++++	+++	A/E
GLOMERULO	-	-	-	+++	++++	+++	A/E, Stx2
T.C.P	+	-	-	-	++++	+++	A/E, Stx1,2
T.C.D	-	-	-	+++	+++	+++	Stx 2
TUB. COLECTOR	-	-	-	-	+++	-	A/E
ASA DE HENLE	-	-	-	-	+++	-	A/E
VASO SANG.	-	-	-	-	++++	+++	A/E
AP. CECAL							
DOMO SUPERF.	-	ND	-	-	-	-	
LINFO.MUCOSA	-	-	-	-	++++	-	A/E
LINFO. SUBMUC	-	+	-	-	-	-	
SUPERF. VELLO.	+	ND	-	-	-	-	Stx1,Stx2
PAR INT. VELLO	-	-	-	-	+++	-	A/E
LUZ							

Los posibles factores de virulencia involucrados y que se sospecho para la expresión del receptor CD77 son Stx 1, Stx 2 y A/E para las cepas EDL 933 IBT, EDL 933 MED, EDL 933 Δ-ler y 933 W como se observa en el cuadro # 7, sin embargo para poder confirmar el factor involucrado exacto, se necesitan hacer pruebas mas especificas y que no pertenecen al presente trabajo.

DISCUSIÓN

Se hizo la identificación de las 6 cepas de referencia, apoyando los resultados con la bibliografía (Jean F. Mac Faddin, 1979). De acuerdo a nuestros resultados las pruebas bioquímicas MIO, TSI, LIA, Citratos y Urea, que se realizaron a las cepas K12, EDL 933 IBT, EDL 933 MED, EDL 933 Δ -LER, 933 J y 933 W, coinciden con la bibliografía, algunas siendo lactosas positivas y otras no; esto se puede deber a que las bacterias no son *Escherichia coli* puras, esto es, 933 J y 933 W, son cepas K12 que se les introdujo el fago de la cepa EDL 933, para producir Stx 1 y Stx2 respectivamente; La cepa Δ -LER es una cepa EDL 933 que tiene delección en una fracción del gen llamada LER esto quiere decir, que el gen LER hace que los demás genes se expresen y por lo tanto, si se le quita el gen LER los otros genes no se expresan pero si los tiene la bacteria, por ejemplo, el gen eae o los genes que codifican para la producción de las toxinas Stx1 y Stx2, etc. no se expresan pero si los tiene. La cepa K12 es una cepa apatógena y rugosa la cual se utiliza como testigo negativo y finalmente las cepas EDL 933 IBT y EDL 933 MED son cepas silvestres que provienen del Instituto de Biotecnología y de la Facultad de Medicina, así podemos notar que cada bacteria es diferente y por lo tanto difiere en cuanto a la bibliografía sin relevancia.

En cuanto a los resultados de la prueba MR, la bacteria K12, resulto ser negativa, pudiendo deberse a que la cepa es apatógena y por lo tanto probablemente no tiene la capacidad de producir ni mantener los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, como las demás cepas que resultaron positivas. Sin embargo para los resultados de VP no solamente K12 fue negativa sino también EDL 933 IBT, EDL 933 MED, EDL 933 Δ -LER esto coincidiendo con la bibliografía (Jean F. Mac Faddin 1979), mientras que las cepas 933 J y 933 W, fueron positivas, nuevamente siendo esto probablemente por el tipo de cepas que son y causando que estas no sean capaces de producir un producto final neutro (acetoína).

Cirugías

Se tuvieron que realizar cirugías, puesto que al momento de recopilar las muestras de trabajos previos, faltaron órganos con cepas inoculadas previamente como EDL 933 MED y EDL 933 IBT. Estas cirugías tuvieron una variación en cuanto a las cirugías descritas en los trabajos de tesis de Pérez O. M. I. (2002) Brambilia G.A. y Martínez R. M. (2006), Cortez F. N. (2003) y Valdivia A. G. (1995) ya que en los trabajos previos se realizaron sin hacer hemostasis en las arterias principales, únicamente se realizó en las ramas de estas arterias; a diferencia con el presente trabajo, que se realizó la hemostasis total de arterias principales, y por lo tanto la continuidad del órgano, esto provocó que el saco ciego donde se depositó el inóculo únicamente fuera irrigado por las ramas arteriales que quedaron, habiendo también provocado una menor absorción del inóculo, y aun con esta variación se pudo observar una reacción positiva en ciertos órganos.

En los cuadros de resultados (cuadro # 5) se observaron las reacciones cuando se les aplicó a los órganos PBS, conjugado y conjugado/CD77 por separado. Y se muestra la expresión mínima constitutiva así como la sobre expresión del receptor Gb₃, dada por cada uno de los reactivos aplicados.

Resumiendo los resultados (cuadro # 6) se pudo observar el comportamiento de cada cepa inoculada en el apéndice cecal de los conejos, para presentar la expresión o sobreexpresión del receptor Gb₃, en apéndice cecal y riñón.

En las cepas EDL 933 (MED e IBT) se observó una mayor reacción a nivel renal, reflejándose estos resultados en el cuadro # 6 siendo que a nivel de apéndice cecal, hubo una reacción mínima. (Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19)

En los conejos inoculados con CST, se presentó una reacción mínima constitutiva en riñón, siendo que en apéndice cecal fue casi nula, así como en los conejos inoculados con la cepa 933 J, que no se encontró reacción en ninguno de los órganos.

En los conejos que fueron inoculados con la cepa 933 W se observó reacción a nivel renal, mientras que en apéndice cecal no se encontró ninguna reacción. En cuanto a la cepa Δ - LER se presentó reacción a nivel renal, siendo que en apéndice cecal no hubo ninguna reacción. (Figuras 22, 23, 24 y 25)

Y por ultimo con la cepa K-12 se observó una muy leve reacción pudiéndose considerar casi nula (cuadro # 6). También en los resultados de este cuadro está considerado, la destrucción del tejido, principalmente en apéndice cecal, registrado como ND, esta destrucción pudo deberse al procesamiento del tejido. Por otro lado esta destrucción de tejido (mucosa principalmente) pudo deberse a la patogenia que ejerce la bacteria EHEC como lo mencionan (Puente J.L y col 2001 y Valdivia A.G. 2003), que produce el efecto A/E habiendo destrucción del tejido (figuras # 18 y 19).

Todos estos resultados podrían estar relacionados con los factores de virulencia Stx1, Stx2 y A/E, como se muestra en el cuadro # 7.

A su vez podemos sospechar los posibles efectos provocados por los factores de virulencia, ya que coincide con investigaciones anteriores (Valdivia A.G. 2003).

El factor A/E parece que estimuló la aparición de los receptores en prácticamente todo el riñón, así como en los linfocitos de la mucosa y de la submucosa, en las células de la vellosidad del apéndice cecal. Analizando el modelo quirúrgico empleado y los resultados obtenidos previamente con este modelo, (cuadro # 7) la única posibilidad del efecto sobre el riñón tiene que ser una reacción en cascada vía interleucinas debido a que la cepa sólo se encuentra en el apéndice cecal, esto puede ser llamado una modulación. El efecto sobre la vellosidad en el apéndice cecal pudiera ser directo o bien mediado por interleucinas ya que la cepa se puede encontrar en la submucosa del apéndice cecal como fue demostrado (Valdivia A.G. 2003.)

Por otro lado, la toxina Stx 1, aparentemente suprimió la aparición del marcador en el TCP y la superficie de la vellosidad. (Cuadro # 8). En forma diferencial, la toxina Stx2 estimuló a nivel de glomérulo, del TCD, y del TCP, sin embargo inhibió la expresión de receptores a nivel de la superficie de la vellosidad en el apéndice cecal, mientras que en los linfonodos de la mucosa estimuló levemente la expresión de receptores. (Cuadro # 8)

RESUMEN DE LOS POSIBLES EFECTOS PROVOCADOS POR LOS FACTORES DE VIRULENCIA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES EN EL RIÑÓN Y APÉNDICE CECAL DEL CONEJO

CUADRO # 8

	A/E	Stx1	Stx2	LPS	Posible factor involucrado
RIÑÓN					
CAP BOWMAN	↑	-	-		A/E
GLOMERULO	-	-	↑		Stx 2
T.C.P	↑	↓	↓		A/E Stx1,2
T.C.D	-	-	↑		Stx 2
TUB. COLECTOR	↑	-	-		A/E
ASA DE HENLE	↑	-	-		A/E
VASO SANG.	↑	-	-		A/E
AP. CECAL					
DOMO SUPERF.	-	-	-		
LINFO..MUCOSA	↑	-	-		A/E
LINFO. SUBMUC	-	-	-		
SUPERF. VELLO.	-	↓	↓		Stx1,Stx2
PAR INT. VELLO	↑	-	-		A/E

Para el caso de las toxinas se pueden pensar en dos efectos que en el presente trabajo no se pudieron diferenciar, por un lado puede ser una inhibición de la expresión o puede ser la destrucción previa de las células del apéndice cecal, conteniendo los receptores por lo que no se pueden apreciar estas células en el estudio, este fenómeno pudo pasar en la vellosidad, en donde se observó la destrucción del tejido y las células normales de esta región, sin embargo a nivel renal las células se observaron presentes sin alteraciones estructurales a la tinción con H-E, efecto que ya ha sido reportado previamente (Valdivia A.G, 1995 y 2003, Adriana B. G y Mariana M. R. 2006) por ello podemos suponer que el efecto puede ser inhibitorio o que los sitios estén ocupados por toxina y por ello no pueden ser detectados por el anticuerpo monoclonal empleado contra el CD/77, para poder discriminar estos efectos, se deberá hacer un estudio utilizando anticuerpos monoclonales contra las toxinas y previo a su aplicación agregar la toxina purificada a los cortes de tejido, de una manera similar a lo realizado por Valdivia A.G. en el 2003. El efecto observado en las cepas que producen toxina al mismo tiempo que los otros factores de virulencia, también pudiera estar interferido por la presencia de la toxina en los receptores celulares, por lo que el experimento anterior pudiera discernir entre las dos posibilidades.

En base a lo sugerido anteriormente de la presencia de la toxina sobre los receptores, es posible que las inducciones por los factores pudieran ser más severas de lo observado.

De nuestros resultados podemos inferir que la toxina Stx2 es más potente que la Stx1 en inducir la aparición de receptores sobre las células renales, principalmente del glomérulo y del TCP, este efecto pudiera en parte explicar la mayor virulencia de las cepas productoras de Stx2, como lo observado por Pistone C. V. y col. en el año 2005 quienes demuestran que la acción tóxica de Stx2 y Stx2B sobre las células renales pudo ser potenciada por algunos factores inflamatorios presentes en el suero y orina de pacientes con SUH, así como en el trabajo de Miho W. y col. en el 2006 quienes mencionan que la Stx2 está más estrechamente relacionada con las infecciones por STEC que la Stx1, además, demuestran la competencia que hay entre las toxinas Stx1 y Stx2 para el receptor Gb3 en los sitios de unión.

En los conejos inoculados con CST, se observó una expresión constitutiva mínima, tanto en riñón como en el apéndice cecal, esto posiblemente podría deberse a la presencia de Gb3/CD77, que presentan los órganos normalmente. Para poder definir si la expresión de receptores es constitutiva o de alguna manera fue inducida por el CST nos remitimos a los resultados previamente obtenidos por Valdivia A.G. 2003, quien encontró en forma constitutiva el receptor en las diversas células del riñón.

La comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo y los resultados obtenidos por Valdivia A. G. 2003 quien empleó otra técnica para evaluar el receptor basada en anticuerpos monoclonales contra la toxina, adición de la toxina directamente a los tejidos y la inmunofluorescencia para el revelado, se puede apreciar que la técnica de IF es más sensible para identificar receptores y que posiblemente no se ve interferida por la unión de la toxina al receptor. En el trabajo de Valdivia A.G. 2003 se apreció una mayor reacción en el apéndice cecal, específicamente en la punta de las vellosidades lanceoladas, siendo que, en riñón no se detecta sobreexpresión como en el presente trabajo pudiendo deberse a la técnica utilizada, ya que en el presente trabajo se utilizó una técnica con anticuerpo policlonal y monoclonal y no se aplicó la toxina directamente sobre los tejidos.

En nuestro trabajo se pudo apreciar la sobreexpresión de receptores a nivel de T.C.P. del T.C.D. y del ovillo glomerular principalmente, así como en endotelio vascular además de expresión en T.C. en los conejos inoculados con las cepas EDL 933, 933 W y EDL 933 Δ -LER. A nivel de Apéndice cecal se pudo observar una expresión de receptores en el linfonodo de la mucosa y en la parte interna de la vellosidad en los conejos inoculados con la cepa EDL 933. En forma diferente, Valdivia A.G. 2003 encontró que, en el riñón no mostró marcaje de receptores a nivel medular, pero si en los vasos sanguíneos a nivel cortico-medular. Por lo tanto en el trabajo de Valdivia A.G. 2003 se apreció más la reacción en apéndice cecal que en riñón y en el presente trabajo es al contrario, ya que a nivel de apéndice cecal se puede observar una reacción a nivel de linfonodo de la mucosa, parte interna de la vellosidad, así como en linfonodo de la submucosa, con una reacción moderada, mientras que en el riñón se puede apreciar una sobre expresión más alta.

Otro aspecto que se debe de tomar en cuenta para la variabilidad de nuestros resultados, es la cirugía que se empleó, ya que en las cirugías descritas en los trabajos de Pérez O. M. I. (2002) Brambilia G.A. y Martínez R. M. (2006), Licenciatura. Cortez F. N. (2003) y Valdivia A. G. (1995) se realizaron de diferente manera, no se realizó la hemostasis en las arterias principales, solo en las ramas arteriales; a diferencia del presente trabajo, ya que se realizó la hemostasis total de arterias principales, además de la continuidad del órgano, esto hizo que el

saco ciego únicamente fuera irrigado por las ramas arteriales que quedaron, habiendo también provocado una menor absorción del inoculo, cabe mencionar que aun modificada la cirugía, se obtuvieron resultados mas bajos a los esperados, pero significativos en la evaluación.

CONCLUSIONES.

La técnica empleada para evaluar el receptor Gb3/CD77 no es la más adecuada para analizar el efecto de los factores de virulencia de *E. coli*, se deberá emplear una técnica de sándwich.

El factor A/E tuvo un efecto inductor del Gb3/CD77 sobre las células renales como una reacción de modulación.

El factor A/E indujo mayor cantidad de receptores en las células linfocitarias y de otro tipo en la vellosidad, el efecto puede ser directo o por modulación.

La toxina Stx2 es más potente que la Stx1 en inducir la aparición de receptores sobre las células renales, principalmente del glomérulo y del TCP.

Las cepas que contienen los genes para la expresión de Stx2 y A/E fueron las que indujeron con mayor severidad la aparición de receptores en el riñón y con menor severidad en apéndice cecal.

La cirugía empleada en el presente trabajo pudo haber interferido en los resultados y por lo tanto se recomienda utilizar las técnicas descritas en las tesis anteriores para futuros trabajos.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Acheson, D.W.K., Moore, R. and DeBreuler, S., 1996. Translocation of Shiga-like toxins across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* 64:3294-3300
- 2) Adam, A. . *Jahrb f.Kinderh* 1927, 116
- 3) Andreoli, S.P., 1999. The pathophysiology of the hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8:459-464
- 4) Arab, S. and Lingwood, C.A. , 1998. Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J Cell Physiol* 117:646-660
- 5) Belnap, W.D. and O'Donnell, J.J., 1955. Epidemic gastroenteritis due to *Escherichia coli* 0-111. *J Pediatric* 47:178-193
- 6) Besser R. *Rev Med* 1999. *Escherichia coli* 0157: H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome. An emerging infectious disease. *Annu (Article)*
- 7) Bitzan, M.M., Wang, Y., Lin, J. and Marsden, P.A., 1998. Verotoxin and ricin have novel effects on preendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (eNOS) expression and NO production in vascular endothelium. *J Clin Invest* 101:372-382
- 8) Boyd, B. and Lingwood, C., 1989. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 51:207-210
- 9) Calderwood, S.B., Achewaz, D.W.K., Krusch, G.T., Barrett, T.J., Griffin, P.M., Strockine, N.A., Swaminathan, B., Kaper, J.B., Levine, M.M., Kaplan, B.S., Karch, H., O'Brien, A.D., Obrig, T.G., Takeda, Y., Tarr, P.I. and Wachsmuth, I.K., 1998. Proposed new nomenclature for SLI (VT) family. *Infect Immun* 62:118-119
- 10) Charles A. Janeway Jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J., Shlomchik. 2003 *Inmunología* “El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad”. Masson Doyma Mexico S.A.
- 11) Dolores Adriana Brambila Gonzalez, Mariana Martínez Rivas. 2006 Tesis de Licenciatura Efecto de los Factores Auxiliares de Virulencia de *E.coli* O157:H7 Sobre los Linfocitos Titulares En un Modelo en Conejos. Edo. De México.
- 12) Sonnenberg, M.S., Tacket, C.O., James, S.P., Losonsky, G., Nataro, J.P., Wasserman, S.S., Kaper, J.B. and Levine, M.M. , 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* 92:1412-1417
- 13) Fernando García Tamayo. 1997 *Fundamentos de Inmunobiología*. UNAM, México.
- 14) Fitzpatrick, M.M., Shah, V., Trompeter, R.S., Dillon, M.J. and Barratt, T.M., 1992. Interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int* 42:951-956
- 15) Forsyth, K.D., Simpson, A.C., Fitzpatrick, M.M., Barratt, T.M. and Levinsky, R.J., 1989. Neutrophil-mediated endothelial injury in hemolytic uremic syndrome. *Lancet* 2:411-414
- 16) Galbusera, M., Morigi, M., Imberti, B., Rossi, C., Zoja, C., Benigni, A., Falanga, A., Remuzzi, A., Remuzzi, G., 1998. Verotoxin-1 (VT-1) induces thrombus formation on microvascular endothelium under flow: relevance for the distribution of lesions in D+ HUS. *J Am Soc Nephrol* 9:354A-3540 (abstract).
- 17) Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenmann, R.E. and Dechslin, R. 1955. Hamolytisch-uramische syndromes bilaterale nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen anamien. *Schweiz Med Wschr* 85:905-909,
- 18) Giles, C., Sangster, G. and Smith, J. 1949. Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. *Arch Dis Childhood* 24:45
- 19) Harel, Y., Silva, M., Giroir, B., Weinberg, A., Clearly, T.B. and Beutler, B., 1993. A reporter transgene indicates renal specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. *J Clin Invest* 92:2110-2116
- 20) Hashimoto, H., Mizukoshi, K., Nishi, M., Kawakita, T., Hasui, S., Kato, Y., Ueno, Y., Takeya, R. and Okuda, N. 1999. Epidemic of gastrointestinal tract infection including hemorrhagic colitis attributing to shiga toxin 1-producing *Escherichia coli* 0118:H2 at a junior high school in Japan. *Pediatrics* 103:e2
- 21) Hughes, A.K., Stricklett, P.K. and Kohan, D.E., 1998. Cytotoxic effect of shiga toxin-1 on human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 54:426-437
- 22) Hughes, A.K., Stricklett, P.K. and Kohan, D.E., 1998. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human proximal tubule cells. *Kidney Int* 54:1093-1106

- 23) Iku Utsunomiya, Jin Ren, Kyoji Taguchi, Toshio Ariga, Tadashi Tai, Yasuo Ihara, Tadashi Miyatake. 2001 Immunohistochemical detection of verotoxin receptors in nervous system. Brain research protocols. (Artículo)
- 24) Inward, C.D., Varaganam, M., Milford, D.V. and Taylor, C.M., 1997. Cytokines in hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. Arch Dis Child 77:145-147
- 25) Inward, C.D., Williams, J., Chant, I., Crocker, J., Milford, D.V., Rose, P.E. and Taylor, C.M., 1995. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in vero cells. J Infect 30:213-218
- 26) Jawetz, Melnick y Adelberg. 2005 Microbiología médica. Manual Moderno S. A. de C. V. Traducida de la 23ª edición en inglés, Mexico D.F.
- 27) Jerse, A.E. and Kaper, J.B., 1991. The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by EAF plasmid. Infect Immun 59:4302-4309
- 28) Jean F. Mac Faddin 197?, Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Panamericana, Viamonte 2164 -Buenos Aires-México-Caracas-Sáopaulo-Madrid.
- 29) Kaplan, B.S., 1998. Shiga toxin-induced tubular injury in hemolytic uremic syndrome. Kidney Int 54:648-649
- 30) Kaplan, B.S., Meyers, K.E. and Schulman, S.L., 1998. The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome. J Am Soc Nephrol 9:1126-1133
- 31) Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C. 1983. Sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome associated with fecal verotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1:619-620
- 32) Karpman, D., Connell, H., Svensson, M., Scheutz, F., Alm, P. and Svanborg, C., 1997. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* 0157:H7 infection. J Infect Dis 175:611-620
- 33) Keusch, G.T. and Acheson, D.W.K. , 1997. Thrombotic thrombocytopenia purpura associated with shiga toxins. Semin Hematol 34:106-116
- 34) Kiarash, A., Boyd, B. and Lingwood, C.A., 1994. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. J Biol Chem 269:1138-1146
- 35) Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stavric, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immune 18:775-779
- 36) Koster, F., Levin, J., Walker, L., Tung, K.S.K., Gilman, R.M., Rahaman, M.M., Najid, M.A., Islam, S. and Williams, R.C.Jr. 1978. Hemolytic uremic syndrome after shigellosis: relation to endotoxemia and circulating immune complexes. N Engl J Med 298:927-933
- 37) Louise, C.B. and Obrig, T.G., 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* 0157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. J Infect Dis 172:1397-1401
- 38) Mead, P.S. and Griffin, P.M. 1998. *Escherichia coli* 0157:H7. Lancet 352:1207-1212,
- 39) Morel-Maroger, L., 1980. Adult hemolytic-uremic syndrome. Kidney Int 18:125-134
- 40) Norhan Cortes Fernández de Arcipreste. 2003. Tesis de Licenciatura "Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli*" Enterohemorrágica. Edo. de México.
- 41) Noris, M., Benigni, A., Siegler, R., Gaspari, F., Casiraghi, F., Mancini, M., Remuzzi, G., 1992. Renal prostacyclin biosynthesis is reduced in children with hemolytic-uremic syndrome in the context of systemic platelet activation. Am J Kidney Dis 20:144-149
- O'Brien, A.D. and Holmes, R.K. 1987 Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev 51:206-220.
- 42) Paton J, Paton A. Rev 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Microbial Paton, J.C. and Paton, A.W. , 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbial Rev 11:450-479
- 43) Patrick R. Murray, PhD., Ken S. Rosenthal PhD., George S. Kobayashi, PhD, Michael A. Pfaller, MD. 1994. Microbiología Médica. España.
- 44) Pérez Ortiz Mirelle Itzel. 2002. Tesis de Licenciatura Efecto sobre la respuesta inmune provocado por *Escherichia coli* (0157:H7) Verocitotóxica inoculada en el apéndice cecal del conejo. Edo. de México.

- 45) Pistone Creydt, Virginia, Nuñez, Pablo, Zotta, Elsa *et al.* Efecto citotóxico de la toxina shiga tipo 2 y su subunidad b en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo. *Medicina (B. Aires)*, mar./abr. 2005, vol.65, no.2, p.147-150. ISSN 0025-7680.(artículo)
- 46) Remuzzi, G. and Ruggenti, P., 1995 The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 47:2-19
- 47) Remuzzi, G., Misiani, R., Marchesi, D., Livio, M., Mecca, G., de Gaetano, G., Donati, M.B., 1978. Haemolytic-uraemic syndrome: deficiency of plasma factor(s) regulating prostacyclin activity? *Lancet* 2:871-872
- 48) Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., Mc Gee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Conen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* 0157:H7 serotype. *N Engl J Med* 308:681-685
- 49) Sakiri, R., Ramegowda, B. and Tesh, T.L., 1998. Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor- α gene transcription and nuclear translocation of the transcriptional activators nuclear factor κ B and activator protein-1. *Blood* 92:558-566
- 50) Sandvig, K., Garred, O., van Helvoort, A., van Meer, G. and van Deurs, B. , 1996. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell* 7:1391-1404
- 51) Siegler, R.L., Christofferson, R.D., Edwin, S.S., Mitchell, M.D., 1991. Urinary cyclic GMP as a measure of endothelin derived relaxation factor (EDRF) in the hemolytic uremic syndrome (HUS), *J Am Soc Nephrol* 2:274-270 (abstract).
- 52) Takenaka, T., Forster, H., Hashimoto, Y., Epstein, M., 1991. Diminished endothelial-dependent vasodilation in Cyclosporine-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 2:513-510 (abstract).
- 53) Te Loo, D.M.W.M., Monnens, L.A.H., van der Velden, T.J.A.M., Vermeer, M.A., Preyers, F., Demacker, P.N.M., van den Heuvel, L.P.W.J. and van Hinsbergh, V.W.M., 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 95:3396-3402
- 54) Uchida, H., Kiyokawa, N., Horie, H., Fujimoto, J. and Takeda, T., 1999. The detection of Shiga toxins in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 45:133-137
- 55) Valdivia Anda Guillermo. 1995. Tesis de maestría "Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de Verotoxinas (VT)" de *Escherichia coli*. Edo. de México.
- 56) Valdivia Anda Guillermo. 2002. Tesis de doctorado "Evaluación de las alteraciones inducidas en el conejo por *Escherichia coli* 0157:H7 inoculada en el apéndice cecal" Edo. de México.
- 57) Van Setten, P.A., van Hinsbergh, V.W., van der Velden, T.J., van de Kar, N.C., Vermeer, M., Mahan, J.D., Assmann, K.J., van den Heuvel, L.P. and Monnens, L.A. , 1997. Effects of TNF α on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int* 51:1245-1256
- 58) Van Setten, P.A., van Hinsbergh, V.W.M., van den Heuvel, L.P.W.J., van der Velden, T.J.A.N., van de Kar, N.C.A.J., Krebbers, R.J.M., Karmali, M.A. and Monnens, L.A., 1997. Verocytotoxin inhibits mitogenesis and protein synthesis in purified human glomerular mesangial cells without affecting cell viability: evidence for two distinct mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 8:1877-1888
- 59) Van Setten, P.A., van Hinsbergh, V.W.M., van den Heuvel, L.P.W.J., Preyers, F., Dijkman, H.B.P.M., Assmann, K.J.M., van der Velden, T.J. and Monnens, L.A. , 1998. Monocytes chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 43:759-767
- 60)Zoja, C. and Remuzzi, G., 1992. The pivotal role of the endothelial cell in the pathogenesis of HUS. In: *Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*, edited by Kaplan, B.S., Trompeter, R.S. and Moake, J.L. New York: Marcel Dekker, Inc p. 389-404.
- 61) Zoja, C., Corna, D., Farina, C., Sacchi, G., Lingwood, C., Doyle, M.P., Padhye, V.V., Abbate, M. and Remuzzi, G., 1992. Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med* 120:229-238