



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Estudio de la respuesta inmunológica mediada por IgA secretora  
contra *Shigella flexneri* en niños escolares expuestos a  
enfermedades intestinales**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Farilyn María Vivas Macedo** como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

**Tutora:** Profa. Isabel Hagel

**Asesora Académica:** Profa.  
Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA

FEBRERO-2013

## DEDICATORIA

Principalmente dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana, puesto que fueron pilar fundamental en el desarrollo de mi carrera universitaria y a lo largo de la tesis. A mi mamá, mujer guerrera y emprendedora, la mejor mujer que jamás haya existido. Gracias por tus buenos consejos, por darle luz a mi camino y acompañarme al final del sendero. Simplemente eres la mejor mamá de este mundo, Te Amo. A mi papá, ese personaje gracioso que siempre busca un momento oportuno para hacerme reír con sus ocurrencias y ese ser protector que cuida mis pasos en cada trayectoria que tome. Gracias por estar allí. A mi hermana, mi gran guía, la persona que más adoro, tú hiciste realidad este logro, gracias a tí mi camino fue más fácil. Tus consejos me permitieron tomar las mejores decisiones en los momentos cruciales de mi carrera. Te quiero hermanita.

A mi tía Mayley, mi segunda madre, gracias por tu apoyo en todo momento y por darme un hermanito mayor, Hovsep. Los quiero y los adoro a los dos. A mi abuelita Edith, por brindarme tantas aventuras y momentos divertidos en mi vida, eres una abuela genial. Al resto de mi familia, gracias.

Quiero dedicarle este triunfo merecidamente a Ronald, aquella persona que estuvo conmigo a lo largo de toda mi carrera, la que me seco las lágrimas y me extendió su mano para levantarme en cada tropiezo. La persona que me dio cada una de sus sonrisas en los momentos que más lo necesité y me ayudó a escalar cada uno de los peldaños. Gracias por tu paciencia y tu comprensión, te amo.

Por último, pero no menos despreciable, a mis tres grandes amigas y confidentes: Victoria, María y Rossana. Gracias por hacerme la carrera más divertida, por sus consejos y alocadas historias. De verdad, le dan un toque especial a todo. Ocuparan siempre un lugar importante en mi corazón, las adoro. A Sailis y a Carlos, por ser amigos y compañeros, por ayudarme en momentos difíciles y escucharme cuando más lo necesitaba. Gracias por todo, los quiero. También quiero agradecer a mis otros compañeros: Wally, Wolfgang, Dolly y Mónica.

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresarle mi más profundo agradecimiento a:

Mi tutora, la profesora Isabel Hagel, por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar mi trabajo especial de grado. Gracias de todo corazón por su apoyo, por ser mi guía y acompañarme a lo largo de esta etapa cumbre de mi carrera.

Mi cotutora, la profesora Guillermina Alonso, por sus consejos y por presionarme para que diera lo mejor de mí. No sólo estuvo presente en el final de mi carrera, sino a lo largo de ella, gracias por estar pendiente de nosotros y guiarnos a ser mejores profesionales. Gracias por enseñarnos que efectivamente el ADN es la molécula perfecta. Se le quiere.

A la profesora Zelandia Fermín, por orientarme, por su dedicación y por ser una parte importante durante mi trayectoria académica. Gracias por enseñarnos ese mundo mágico, como es la inmunología. Sin duda alguna, una de las electivas más interesantes e importante en la carrera de biología. Eternamente agradecida por todo.

A la profesora Cristina Sanoja, por sus buenos consejos y por estar pendiente de mi a lo largo del desarrollo de mi tesis, muchas gracias.

Al personal del laboratorio de Inmunología Celular del Instituto de Biomedicina, específicamente a Gisselle, Moisés, José y María Gabriela. Gracias por sus consejos, por prestarme su ayuda y por hacerme divertida la estancia en su laboratorio.

Un agradecimiento muy especial al laboratorio de “Bioquímica de Parásitos” de Medicina Tropical. Al profesor Tomás Hermoso por toda la ayuda prestada en el desarrollo de la técnica de Western blot. Por su tiempo y conocimiento.

Y por último a todas aquellas personas que pusieron su granito de arena en la culminación de este trabajo.

## ABREVIATURAS

**Ac:** Anticuerpo.

**Ag:** Antígeno.

**APRIL:** Ligando Inductor de Proliferación (Proliferation-Inducing Ligand).

**ATP:** Adenosina Trifosfato.

**BCA:** Ácido Bicinconínico (Bicinchoninic Acid).

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin).

**CI:** Consentimiento informado.

**DC:** Células Dendríticas (Dendritic Cells)

**DO:** Densidad Óptica.

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.

**EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica.

**ELISA:** Análisis de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena.

**GALT:** Tejido linfoide asociado al intestino

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:** Ácido Fosfórico.

**IgA:** Inmunoglobulina A.

**IgA1:** Inmunoglobulina A subclase 1.

**IgA2:** Inmunoglobulina A subclase 2.

**SIgA:** Inmunoglobulina A secretora.

**IgD:** Inmunoglobulina D.

**IgG:** Inmunoglobulina G.

**IgM:** Inmunoglobulina M.

**IL:** Interleucina.

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma.

**Ipa:** Antígenos del Plásmido de Invasión (Invasión Plasmid Antigen).

**kDa:** kilo Dalton.

**LPS:** Lipopolisacárido

**ON:** Óxido Nítrico (Nitric Oxide).

**ONSi:** Óxido Nítrico Sintetasa inducible.

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear kappa B (Nuclear Factor-KappaB).

**Omp:** Proteína transmembrana (Outer membrane protein)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OPD:** Orto-Fenildiamina-Dicloruro.

**PBS:** Tampón Fosfato Salino.

**RC:** Rojo Congo

**PSA:** Persulfato de Amonio.

**RA:** Ácido Retinoico (Retinoic Acid).

**RNA:** Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)

**SC:** Componente Secretor (Secretory Component).

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)

**SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de PoliAcrilamida utilizando SDS, refiriéndose a condición disociante.

**SSTT:** Sistema de Secreción Tipo Tres.

**TEMED:** N,N,N'-tetrametilnediamina.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta)

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
II.1. La mucosa.....	<b>3</b>
II.1.1. Estructura de la mucosa del intestino delgado.....	<b>3</b>
II.1.2. Sistema inmunitario asociado al intestino.....	<b>4</b>
II.1.3. Flora intestinal .....	<b>7</b>
II.1.4. Importancia de las enfermedades intestinales por la OMS .....	<b>9</b>
II.2. <i>Shigella flexneri</i> .....	<b>10</b>
II.2.1. Taxonomía .....	<b>10</b>
II.2.2. Características.....	<b>11</b>
II.2.3. Patología, signos y síntomas de la shigellosis .....	<b>13</b>
II.2.4. Mecanismo de invasión de <i>Shigella flexneri</i> en el epitelio intestinal.....	<b>14</b>
II.2.5. Diagnóstico y vacunas desarrolladas para combatir la shigellosis .....	<b>18</b>
II.3. IgA secretora .....	<b>20</b>
II.3.1. Características básicas de la IgA .....	<b>20</b>
II.3.2. Mecanismo de transporte de la SIgA hacia la luz intestinal .....	<b>21</b>
II.3.3. Función de la IgA secretora .....	<b>22</b>

II.4. Óxido Nítrico.....	23
II.4.1. Características .....	23
II.4.2. Mecanismo de regulación del ON para estimular la producción de SIgA..	24
<b>III. ANTECEDENTES .....</b>	<b>26</b>
III.1. Internacionales .....	26
III.1.1. <i>Shigella flexneri</i> estimula la producción de anticuerpo. La IgA secretora es el principal componente protector frente a la shigellosis .....	26
III.1.2. El ON estimula la producción de IgA secretora en la mucosa .....	29
III.2. Nacionales .....	29
III.2.1. Prevalencia de <i>Shigella flexneri</i> en comunidades urbanas y rurales de Venezuela .....	29
III.2.2. Niveles de IgA secretora total en niños venezolanos .....	29
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
IV.1. Objetivo general .....	31
IV.2. Objetivos específicos .....	31
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
V.1. Población de estudio .....	33
V.2. Evaluación clínica .....	33
V.3. Determinación de los niveles de IgA secretora total en saliva .....	33
V.4. Determinación de IgA específica contra un extracto crudo de <i>Shigella flexneri</i> en saliva .....	35
V.4.1. Aislamiento e identificación de una cepa de <i>Escherichia coli</i> no patogénica ATCC 25922 .....	35

V.4.2. Cuantificación de proteínas de un extracto crudo de <i>Shigella flexneri</i> y de <i>E. coli</i> no patogénica .....	36
V.5. Determinación de proteínas antigénicas de un extracto crudo de <i>Shigella flexneri</i> y <i>Escherichia coli</i> no patogénica por Western blot .....	38
V.6. Cuantificación de metabolitos estables de ON en saliva .....	41
V.7. Selección de Pruebas estadísticas .....	42
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
VI.1. Población estudiada .....	43
VI.2. Prevalencia de infecciones intestinales y sintomatología clínica de las comunidades estudiadas .....	43
VI.3. Estudio inmunológico .....	45
VI.3.1. Medición de los niveles de IgA secretora en saliva .....	45
VI.3.2. Estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> y su posible control <i>E. coli</i> .....	48
A. Obtención de una cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 no patógena .....	48
B. Estandarización de la técnica de ELISA.....	49
VI.3.3. Medición en saliva de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> .....	53
VI.3.4. Medición en saliva de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de <i>E. coli</i> .....	55
VI.4. Cuantificación de los niveles de ON en las comunidades estudiadas y su posible relación con los niveles de IgA secretora total en saliva.....	57
VI.5. Estandarización del ensayo de Western blot en el reconocimiento de las bandas antigénicas de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> y <i>E. coli</i> por parte de la SIgA en saliva de niños.....	59

A.	Estandarización de la saliva utilizada .....	<b>59</b>
B.	Determinación de la masa molecular de las proteínas antigénicas presentes en un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> y <i>E. coli</i> , que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela.....	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>86</b>
<b>IX.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>88</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>89</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig.</b>	<b>Pag.</b>
1. Estructura de la célula del epitelio intestinal en la mucosa del intestino delgado. ....	4
2. Estructura del epitelio intestinal .....	5
3. Función de las células M .....	6
4. Mecanismo discriminatorio en la flora intestinal por los microorganismos comensales y los patógenos .....	8
5. Perfil de Salud de la República Bolivariana de Venezuela .....	10
6. Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de <i>Shigella</i> sp en distintas regiones del mundo .....	12
7. Plásmido de virulencia de <i>Shigella flexneri</i> serotipo 5a .....	13
8. Mecanismo de invasión de <i>Shigella flexneri</i> .....	15
9. Representación gráfica de la molécula de IgA dimérica .....	21
10. Transporte de la IgA hacia la luz intestinal .....	22
11. Diferentes mecanismos de inducción de células B inmaduras a células secretoras de anticuerpos IgA en el intestino, vía independiente del timo .....	25
12. Niveles de anticuerpos IgA en secreciones de la mucosa, cuando los ratones son inmunizados intranasalmente con la proteína transmembrana A de <i>Shigella flexneri</i> 2a .....	27
13. Examinación histológica del epitelio intestinal y de las placas de Peyer .....	28
14. Niveles de IgA secretora total con respecto al estado nutricional del individuo .....	30
15. Dispositivo MINI-BLOTTER .....	41
16. Sintomatología clínica asociada a cada una de las comunidades estudiadas .....	44
17. Curva de Calibración de IgA secretora .....	45
18. Niveles de IgA secretora total en diferentes comunidades de Venezuela .....	46
19. Colonias de una cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 sembrada en los medios Levine y Mc Conkey .....	48

<b>20.</b> Curva de calibración de proteínas totales .....	<b>50</b>
<b>21.</b> Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos ensayadas .....	<b>51</b>
<b>22.</b> Niveles de IgA secretora anti- <i>E. coli</i> obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos ensayadas .....	<b>51</b>
<b>23.</b> Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> para las diferentes concentraciones de solución de bloqueo (Suero de Caballo) ensayadas .....	<b>52</b>
<b>24.</b> Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> en diferentes comunidades de Venezuela .....	<b>54</b>
<b>25.</b> Niveles de IgA secretora anti- <i>E. coli</i> en diferentes comunidades de Venezuela .....	<b>56</b>
<b>26.</b> Niveles de ON en diferentes comunidades de Venezuela .....	<b>58</b>
<b>27.</b> Western blot de las proteínas de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> expuesto a diferentes diluciones de salivas .....	<b>60</b>
<b>28.</b> Proteínas de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> transferidas al papel de nitrocelulosa .....	<b>62</b>
<b>29.</b> Proteínas de un extracto crudo de <i>E. coli</i> transferidas al papel de nitrocelulosa .....	<b>62</b>
<b>30.</b> Análisis de Western blot de las proteínas de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva.....	<b>63</b>
<b>31.</b> Principales proteínas de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva .....	<b>65</b>
<b>32.</b> Análisis de Western blot de las proteínas de un extracto crudo de <i>E. coli</i> que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva.....	<b>66</b>
<b>33.</b> Principales proteínas de un extracto crudo de <i>E. coli</i> que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva .....	<b>68</b>
<b>34.</b> Esquemas de las principales proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora específica (anti- <i>S. flexneri</i> y anti- <i>E. coli</i> ) en saliva y su posible función .	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

No.	Pag.
1. Principales genes y su función en el mecanismo de invasión de <i>Shigella flexneri</i> .....	13
2. Resistencia de <i>Shigella flexneri</i> a diferentes antimicrobianos .....	18
3. Procedimiento para realizar las soluciones de diferentes concentraciones de la curva de calibración .....	37
4. Procedimiento para realizar los distintos geles en una electroforesis discontinua.....	39
5. Prevalencia de parásitos intestinales .....	44
6. Niveles de de IgA secretora total en diferentes comunidades de Venezuela .....	46
7. Niveles de de IgA secretora total en niños que se encuentran infectados o no con <i>Giardia lambia</i> .....	47
8. Niveles de de IgA secretora total en niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal) .....	47
9. Resultado de las pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación de una cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 .....	49
10. Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> e IgA anti- <i>E. coli</i> obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos .....	51
11. Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> para las diferentes concentraciones de solución de bloqueo (Suero de Caballo) .....	52
12. Niveles de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> en diferentes comunidades de Venezuela .....	53
13. Niveles de de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> en niños que se encuentran infectados o no con <i>Giardia lambia</i> o <i>E. coli</i> .....	55
14. Niveles de de IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> en niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal) .....	55
15. Niveles de IgA secretora anti- <i>E.coli</i> en diferentes comunidades de Venezuela .....	55
16. Niveles de de IgA secretora anti- <i>E. coli</i> en niños que se encuentran infectados o no con <i>Giardia lambia</i> o <i>E. coli</i> .....	57

<b>17.</b> Niveles de de IgA secretora anti- <i>E .coli</i> en niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal) .....	<b>57</b>
<b>18.</b> Niveles de ON en diferentes comunidades de Venezuela .....	<b>57</b>
<b>19.</b> Porcentaje de reconocimiento de las proteínas, de un extracto crudo de <i>S. flexneri</i> , que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva .....	<b>65</b>
<b>20.</b> Porcentaje de reconocimiento de las proteínas, de un extracto crudo de <i>E. coli</i> , que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva .....	<b>67</b>

## Resumen

La shigellosis es una enfermedad gastrointestinal, causada por una bacteria del Género *Shigella*, que afecta principalmente a los países en vías de desarrollo. En Venezuela también constituye un problema de salud pública, siendo *Shigella flexneri* la especie más frecuente.

Unas de las características que describen las infecciones causadas por esta bacteria es su capacidad de invadir y destruir el epitelio intestinal, evadiendo en gran parte la respuesta inmunitaria innata del hospedador; además de modular la respuesta inflamatoria para su propio beneficio. Sin embargo, existen evidencias de la importancia de la respuesta humoral, particularmente la de la IgA secretora, en la eliminación de la bacteria y el control de la infección. La IgA secretora es el principal anticuerpo producido a nivel intestinal mediante dos mecanismos. Uno de los mecanismos, es una vía independiente de células T, en el cual el incremento del NO se ha reportado que juega un papel fundamental. Este metabolito también se ha visto implicado en el control de la patogénesis y es considerado un mediador inflamatorio.

En este trabajo se caracterizó la respuesta de IgA secretora estimulada por la bacteria *Shigella flexneri* en niños escolares venezolanos de bajo nivel socioeconómico, que se encuentran crónicamente expuestos a enfermedades intestinales y se evaluó su posible relación con el NO como mediador inflamatorio.

Los niveles de IgA secretora total fueron significativamente más elevados en los individuos de la población Warao, seguido de los niños de la comunidad Amalia Pellin y la etnia Panare. Los niveles de IgA secretora específica contra *S. flexneri* fueron significativamente más altos en la saliva de los niños analizados de las comunidades indígenas que en la saliva de los niños provenientes de la población urbana. Los niveles de IgA anti-*E. coli* no resultaron estadísticamente significativos. La masa molecular estimada de las principales proteínas que son reconocidas por los anticuerpos IgA secretora presentes en la saliva de los niños que resultaron positivos en el ensayo de ELISA, fueron las de 62; 29,6; 26,6 y 24 kDa en el extracto crudo de *S. flexneri*, mientras que en el extracto crudo de *E. coli* las más frecuentes fueron las de 139,3; 97,1; 67,6 y 54,3 kDa. Los niveles del NO fueron estadísticamente más elevados en los individuos provenientes de la población Panare seguido de los individuos de la comunidad Warao y Amalia Pellin. No se encontró ninguna relación del NO con los niveles de IgA secretora total en saliva y específica frente a *Shigella flexneri*.

Estos resultados evidencian que el extracto crudo de *S. flexneri* y de *E. coli* presentan proteínas que son reconocidas por los anticuerpos IgA secretora en saliva, particularmente por las proteínas anteriormente mencionadas. La proteína de masa molecular de 139,3 kDa, en el extracto crudo de *E. coli*, representa un nuevo hallazgo en esta línea de investigación. Los niveles de IgA secretora total podrían estar reflejando las condiciones de pobreza, particularmente el riesgo nutricional de los niños de la comunidad Panare. El NO podría estar actuando como un mediador inflamatorio en aquellas comunidades que se encuentran crónicamente expuestas a enfermedades infecciosas.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas, constituyen un problema de salud pública en Venezuela, afectando principalmente las zonas rurales y algunas poblaciones urbanas donde las condiciones de sanidad son precarias. Uno de los microorganismos que prevalecen en estas zonas, son las bacterias pertenecientes al género *Shigella*, las cuales causan la forma común de disentería bacilar y afecta primordialmente a los niños menores de 5 años (Luiggi, 2009).

Una de las consecuencias de la infección por estas bacterias es la destrucción de la barrera intestinal y la producción de una respuesta inflamatoria incrementada que provoca a la aparición de síntomas, tales como diarrea, disentería, vómitos y náuseas, algunas veces acompañada de cólicos, tenesmo y en los peores de los casos, la muerte (León, 2002).

Estudios previos han demostrado que para establecer una infección causada por *Shigella*, se necesita de un pequeño inóculo de 10 a 100 bacterias; lo que provoca que sea una enfermedad de fácil transmisión en aquellas poblaciones donde las condiciones de higienes son precarias, favoreciendo el contacto continuo con estos agentes infecciosos (Sasakawa, 2010).

Una característica importante de las infecciones causadas por *Shigella flexneri*, es la habilidad de la bacteria de evadir los mecanismos de defensa innata del hospedador, estableciendo así su patología (Sansoneetti, 2006). Últimamente se ha reportado que en nuestro país esta bacteria ha presentado niveles altos de resistencia a diferentes antibióticos, trayendo complicaciones para el tratamiento de la enfermedad, sumado a la limitada accesibilidad de éstos en algunas comunidades de bajo nivel socioeconómico (Hernández y Godoy, 2002).

Estudios previos han demostrado que la principal vía de protección contra la shigellosis es la respuesta mediada por la inmunidad humoral, estando implicada la proteína Inmunoglobulina A

secretora (SIgA) en un papel clave en los mecanismos de defensa del hospedador contra esta infección (Forbes y col., 2011). La IgA secretora es la inmunoglobulina mayormente producida a nivel intestinal, siendo su principal función la neutralización de patógenos y toxinas bacterianas (Murphy y col., 2008). Uno de los mecanismos propuestos para la producción de esta inmunoglobulina en el intestino, es una vía independiente de células T, en la cual el óxido nítrico (ON) juega papel importante (Mora y von Andrian, 2009). El NO es una molécula con alto poder de oxidación y su incremento en el organismo se ha visto involucrado tanto en el control de las infecciones como en la producción de SIgA a nivel intestinal (Bogdan, 2001; Mora y von Andrian, 2009). El nivel de protección que confiere esta inmunoglobulina en las infecciones ocasionadas por patógenos intestinales, como *Shigella flexneri*, es lo que ha conllevado a la realización de este estudio.

El propósito de este trabajo es caracterizar la respuesta IgA secretora en saliva de niños venezolanos de comunidades endémicas, frente a un extracto crudo de *Shigella flexneri* y determinar si existe en este fluido biológico una posible correlación entre los niveles del óxido nítrico y los niveles de IgA secretora total y específica anti-*S. flexneri*.

## II. MARCO TEÓRICO

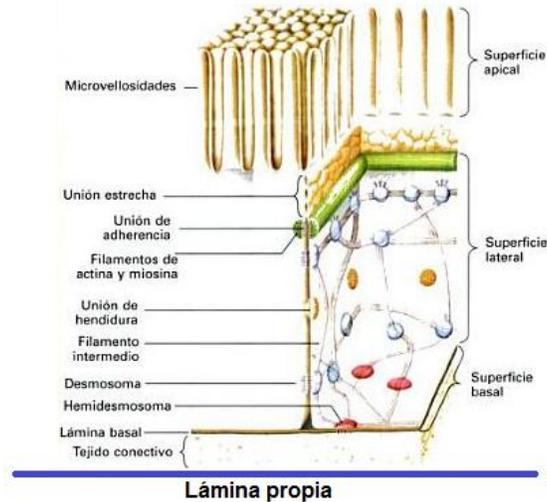
### II.1. La mucosa

La superficie de la mucosa representa una enorme área del cuerpo, abarcando el tubo digestivo, las vías respiratorias altas y bajas, y el aparato genitourinario, además de las glándulas exocrinas como: el páncreas, conjuntivas y glándulas lacrimales, glándulas salivales y la mama que está produciendo leche. El intestino delgado del ser humano, tiene un área de 400 m<sup>2</sup> y equivale alrededor de 200 veces el área de la piel. Debido a su función fisiológica en la absorción de alimentos, su superficie es una barrera delgada y permeable al interior del cuerpo, conllevando a que sea una región altamente vulnerable a los agentes infecciosos. Los mecanismos más complejos de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo tienen participaciones cruciales en este tipo de órganos (Murphy y col., 2008).

#### II.1.1. Estructura de la mucosa del intestino delgado

La mucosa del intestino delgado consta de prolongaciones digitiformes (microvellosidades), cubiertas por una capa delgada de células, denominada el epitelio, compuesta por células epiteliales o enterocitos (Lodish y col., 2005). Las células epiteliales en la mucosa del intestino delgado se encargan de la digestión de alimentos y absorción de nutrientes, y su reemplazo viene determinado por células primordiales que se encuentran en las criptas del intestino (Murphy y col., 2008). La disposición del epitelio en microvellosidades aumenta su capacidad de absorción. Las células epiteliales se encuentran polarizadas, porque sus membranas plasmáticas están organizadas en tres regiones separadas; la superficie apical o luminal (arriba), basal (abajo) y lateral (lado) (**Figura 1**). A menudo, las superficies basal y lateral son similares en composición y juntas se denominan región basolateral (Lodish y col., 2005). La superficie basolateral está en contacto con una capa de tejido subyacente denominada lámina propia, caracterizada por tener

una gran cantidad de células del sistema inmunitario dispersas o en estructuras debidamente organizadas (Murphy y col., 2008).



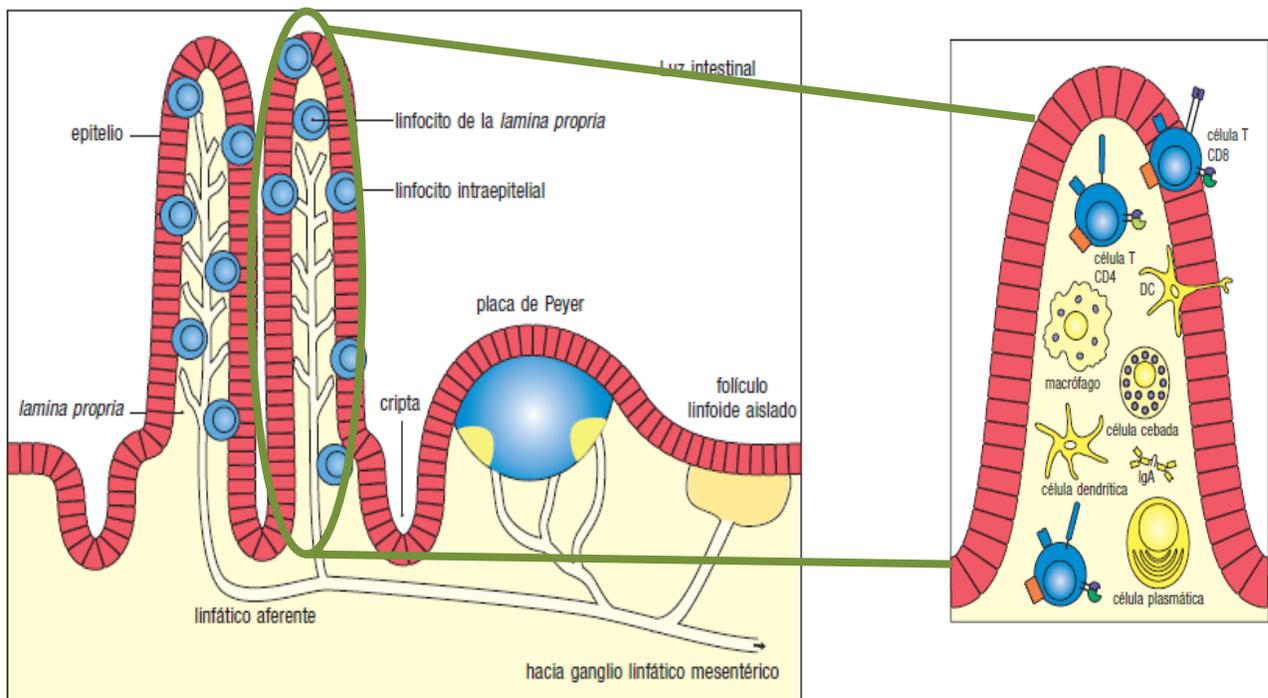
**Figura 1. Estructura de la célula del epitelio intestinal en la mucosa del intestino delgado.** El enterocito es una célula polarizada, compuesta por tres regiones principales: la superficie apical o luminal (arriba de la figura), la superficie basal (debajo de la figura) y la superficie lateral (al medio de la figura). La región apical está conformada por microvellosidades y se encuentra unida a la superficie lateral mediante uniones estrechas y de adherencia. La superficie basal está en contacto con una capa de tejido subyacente denominada lámina propia. Tomado y modificado de (Lodish y col., 2005).

La función del epitelio intestinal es formar una barrera selectiva, la cual favorece el flujo de nutrientes, el movimiento regulado de agua y solutos y limitar el contacto de los antígenos y microorganismos que entran a la vía intraluminal por la ingesta de alimentos, participando en los mecanismos de tolerancia que permiten mantener la homeostasis del individuo (Ménard y col., 2009).

### II.1.2. Sistema inmunitario asociado al intestino

En el intestino, los linfocitos y otras células del sistema inmunitario, como los macrófagos y las células dendríticas, se encuentran en todo el tubo digestivo, tanto en tejidos organizados como dispersos en todo el epitelio de la superficie de la mucosa y en la lámina propia. Los tejidos linfoides organizados en este órgano se conocen como tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) (**Figura 2**). Su estructura anatómica es semejante a los órganos linfoides periféricos,

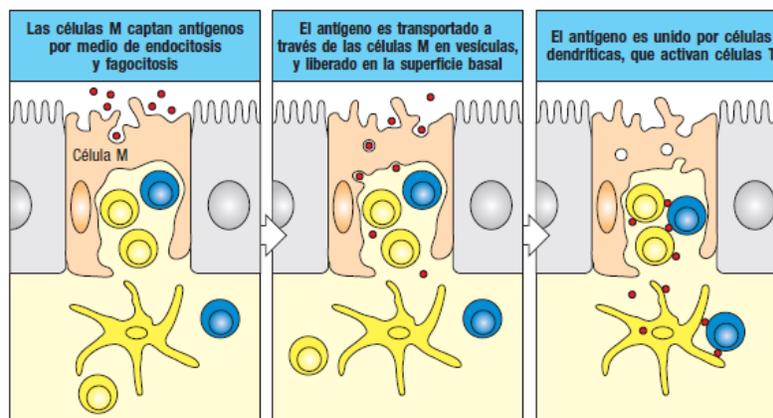
con una zona diferenciada de células T (zona azul) y folículos de células B con centros germinales (zona amarilla), como lo son las Placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos, mientras que los folículos aislados comprenden principalmente células B. Juntos, estos tejidos organizados son los sitios de presentación de antígenos a las células T y B, y se encargan de la fase de inducción de las respuestas inmunitarias. Las células dispersas en todo el epitelio y la lámina propia corresponden las células efectoras de la inmunidad local, que comprenden principalmente células T efectoras y células plasmáticas secretora de anticuerpos. También se encuentran macrófagos, células dendríticas, eosinófilos y mastocitos (**Figura 2**). Los neutrófilos se encuentran muy poco en el intestino sano, pero su número tiende a aumentar durante una infección (Murphy y col., 2008).



**Figura 2. Estructura del epitelio intestinal.** La mucosa del intestino delgado consta de prolongaciones digitiformes (vellosidades) cubiertas por una delgada capa de células epiteliales (representada en la figura con el color rojo). Estas células epiteliales son reemplazadas de manera continua por nuevas células que se derivan de células primordiales en las criptas. La capa de tejido que subyace al epitelio se llama lámina propia (color pardo). Los linfocitos se encuentran en varios compartimientos separados en el intestino, formando los tejidos linfoides organizados, como las placas de Peyer y los folículos linfoides aislados, juntos se conocen como tejidos linfoides relacionados con el intestino (GALT). Estos tejidos son los sitios de presentación de antígenos a las células T y B, y se encargan de la fase de inducción de la respuesta inmunitaria. Las placas de Peyer contienen áreas de células T

separadas (en azul) y folículos de células B (en amarillo), mientras que los folículos aislados comprende principalmente células B. Muchos linfocitos se encuentran dispersos en toda la mucosa fuera de los tejidos linfoides organizados, y éstas son células efectoras, células T efectoras y células plasmáticas secretora de anticuerpo. Los linfocitos efectoras y las células dendríticas pueden encontrarse tanto en la lámina propia como en el epitelio. También se encuentran otras células del sistema inmunitario, como los macrófagos, eosinófilos, basófilos, etc. (Tomado y modificado de Murphy y col. 2008).

Los GALT se encuentran separados de la luz intestinal por una única capa de epitelio asociado a los folículos. Ésta contiene células epiteliales convencionales, así como un número menor de células especializadas llamadas células de micropliegues (células M), que tienen una superficie luminal plegada en lugar de microvellosidades presentes en los enterocitos (**Figura 3**). A diferencia de estas últimas, las células M no secretan moco ni enzimas digestivas, haciéndolas más accesibles a microorganismos y partículas dentro de la luz del intestino (Murphy y col., 2008). Las células M son células epiteliales altamente especializadas en la captación de antígenos por vía transcitosis, para el posterior procesamiento por células fagocíticas y presentación de antígenos por parte del tejido linfoide asociado al intestino, llevando a una respuesta de inmunidad específica (Phalipon y Sansonetti, 2007). Las células dendríticas cargadas con el antígeno tomado por las células M, migran desde la región de domo hacia las áreas de células T indiferenciadas de las placas de Peyer, donde se establece la respuesta inmune adaptativa (Murphy y col., 2008).



**Figura 3. Función de las células M.** Las células M en el epitelio relacionado con folículo de las placas de Peyer tienen membranas basales contorneadas que forman “hendiduras” dentro de la capa epitelial, lo que permite contacto

estrecho con linfocitos y otras células. Esto favorece el transporte local de antígenos que han sido captados desde el intestino por las células M, y su suministro a células dendríticas para presentación de antígenos. (Tomado de Murphy y col., 2008).

Las respuestas inmunitarias que se generan cuando se reconocen antígenos en uno de los tejidos del GALT difieren a las generadas en los ganglios linfáticos o el bazo, cuando el antígeno es suministrado en el torrente sanguíneo. Esto se debe a que el microambiente del GALT tiene su propio contenido característico de células linfoides, hormonas y otros factores inmunomoduladores. La IgA secretora es el isotipo de anticuerpo relacionado con el sistema inmunitario de la mucosa (Murphy y col., 2008).

### **II.1.3. Flora intestinal**

El intestino humano está habitado por un complejo y dinámico ecosistema microbiano, compuesto de más de 400 especies distintas, incluyendo la microflora residente y un variable número de especies que temporalmente residen en el epitelio intestinal, que contribuye a mantener la tolerancia inmune y la activación de la mucosa, por la competencia de nutrientes y espacio con las bacterias invasoras, evitando su colonización en el epitelio (Lu y Walker, 2001; Sasakawa, 2010). El epitelio intestinal debe permitir un mecanismo de discriminación entre la flora residente y las bacterias enteropatogénicas, de tal manera de evitar una respuesta inflamatoria que lleve a la destrucción del epitelio por bacterias inofensivas (**Figura 4**). Un mecanismo de discriminación son las diferentes vías de señalización usadas por las bacterias patogénicas para mediar su entrada al epitelio, modulando las funciones de estas células y causando su patología (Lu y Walker, 2001).

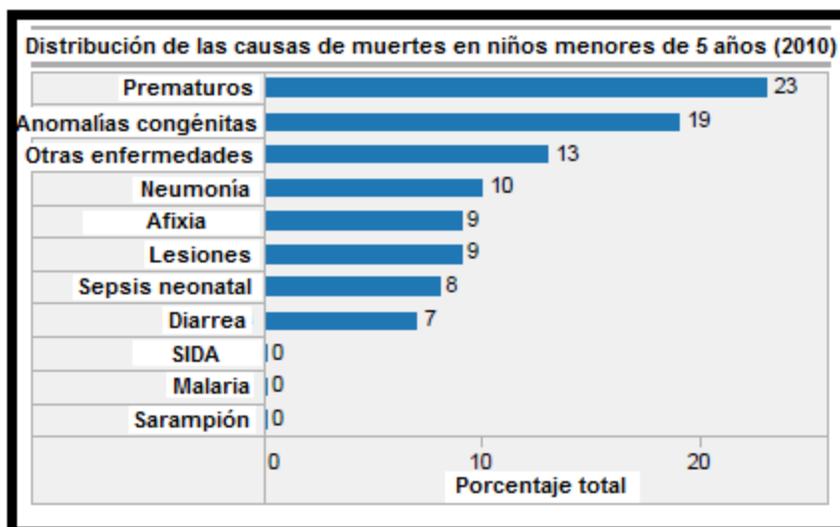


el cual si es superado lleva al establecimiento de la infección y a la activación de otros mecanismos de defensa, como el sistema inmunitario humoral (Lu y Walker, 2001). Es por ello, que la identificación de moléculas claves, como los receptores y las moléculas que median la respuesta inflamatoria generada por estos microorganismos, son de suma importancia para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas contra la enfermedad.

Muchas enterobacterias han desarrollado un sistema de secreción especializado, llamado sistema de secreción tipo III, que media la transferencia de proteínas desde la célula bacteriana hacia el interior de la membrana de la célula del hospedador, conduciendo a un reordenamiento del citoesqueleto de actina y la entrada de la bacteria dentro de la célula epitelial de la mucosa por la región basolateral. Entre las bacterias que utilizan este mecanismo de invasión están *Salmonella* sp, *Shigella* sp, EPEC “*E. coli* enterohemorrágica”, *Yersinia* sp y entre otras; que también pueden aprovechar otros mecanismos intrínsecos del hospedador, como lo es la captura de antígenos en el epitelio intestinal mediado por las células M, como es el caso del mecanismo utilizado por *Shigella* sp (Lu y Walker, 2001).

#### **II.1.4. Importancia de las enfermedades intestinales por la OMS**

La mayoría de los patógenos que causan la muerte de un gran número de personas a nivel mundial, son los que invaden las superficies de las mucosas, debido a que esta zona es altamente permeable a antígenos que vienen del exterior (Murphy y col., 2008). Las infecciones intestinales han sido reportadas como la segunda causa de muerte a nivel mundial, afectando principalmente a los niños menores de 5 años en los países en desarrollo (OMS, 2009; León, 2002). A nivel nacional, se encuentra como la octava causa de muerte en este subgrupo de la población (**Figura 5**) (OMS, 2010).



**Figura 5. Perfil de Salud de la República Bolivariana de Venezuela.** Las causas de muertes en niños venezolanos menores de 5 años para el año 2010, según la OMS, viene encabezado por niños prematuros, anomalías congénitas, neumonía, afixia, lesiones, sepsis neonatal y diarrea. La diarrea con el 7% representa la octava causa de muerte en este subgrupo de la población. (Tomado y modificado de OMS, 2010).

Las infecciones intestinales son ocasionadas por una gran variedad de patógenos, entre los que destacan el *Vibrio cholerae*, agente causal del cólera, *Shigella*, agente causal de la shigellosis y algunos virus como lo son los rotavirus (Murphy y col., 2008). La cifra anual de shigellosis en todo el mundo es de 164,7 millones, de los cuales, 163, 2 millones se producen en los países en desarrollo (causando 1,1 millones de defunciones) y 1,5 millones en los países industrializados. En total el 69% de todos los episodios y el 61% de todas las defunciones atribuidas a la shigellosis afectan a menores de 5 años (Kotloff y col., 1999).

## II.2. *Shigella flexneri*

### II.2.1. Taxonomía (PubMed, 2013)

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gamma-Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

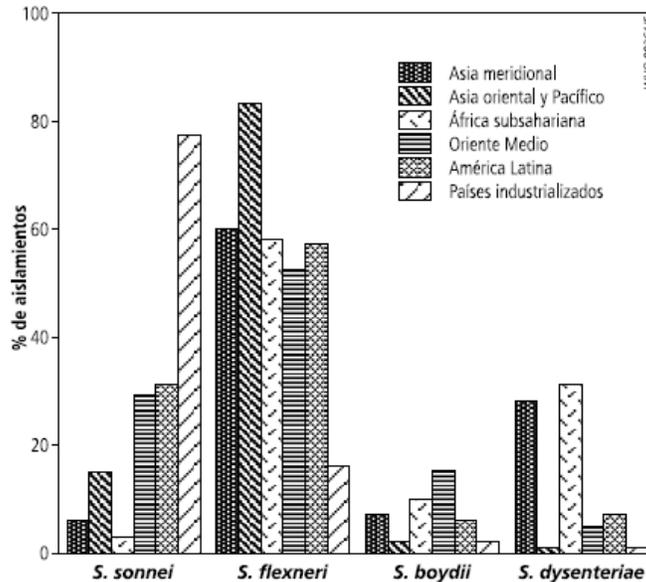
Género: *Shigella*

Especie: *Shigella flexneri*

### II.2.2. Características

El género *Shigella*, está formado por bacilos Gram-negativos, no esporulantes e inmóviles, aerobios facultativos, causantes de la disentería bacilar más común, denominada shigellosis (Basualdo y col., 2001; Jennison y Verma, 2004). Se caracteriza por no fermentar la lactosa, no producir lisina descarboxilasa y raramente producir gas a partir de hidratos de carbono. La gran mayoría de los organismos de la especie *Shigella flexneri* fermenta manitol y son ornitina descarboxilasa negativos (Terragno y col., 2007).

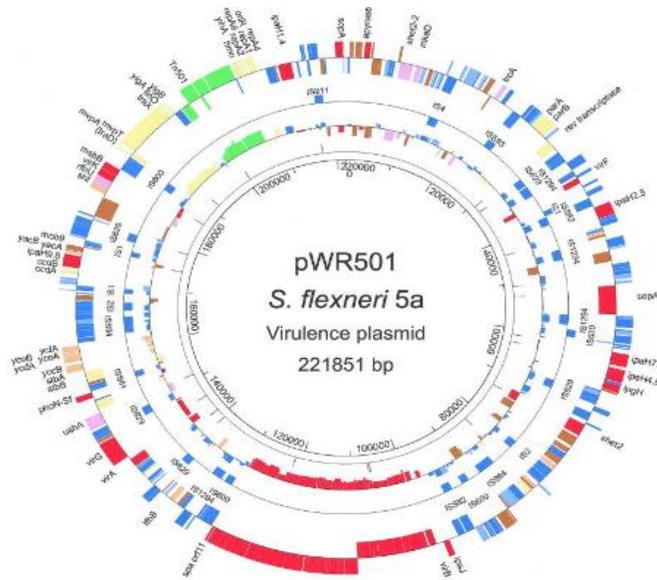
El género *Shigella* comprende 4 especies, denominadas: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*, clasificándose a su vez en distintos serotipos. Los serotipos de *Shigella* sp son definidos en base a los antígenos somáticos, compuestos por cadenas polisacáridicas del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (Terragno y col., 2007). Basado en ese esquema de clasificación, *S. flexneri* se ha clasificado en 13 serotipos. Los serotipos predominantes reportados de *S. flexneri* son 1b, 2a, 3a y 4a, siendo el más frecuente en zonas industrializadas el serotipo 2a (Phalipon y Sansonetti, 2007; Barrantes y Achí, 2008; Jennison y Verma, 2004). Se ha reportado, en el caso de los países en vías de desarrollo, especialmente los países latinoamericanos, que las especies que más prevalecen son *S. flexneri* y *S. dysenteriae*, mientras que *S. sonnei* es más frecuente en países desarrollados o zonas industrializadas (**Figura 6**) (Phalipon y Sansonetti, 2007; Barrantes y Achí, 2008).



**Figura 6. Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de *Shigella* sp en distintas regiones del mundo.** En los países del Asia meridional, Asia oriental y Pacífico, África subsahariana, Oriente Medio y América Latina la especie con mayor porcentaje de aislamiento es *S. flexneri*, mientras que en los países industrializados, *S. sonnei* es la especie con mayor porcentaje de aislamiento. (Tomado de Kotloff y col. 1999).

El género *Shigella* se encuentra estrechamente relacionado con el género *Escherichia*, debido a sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas (Jennison y Verma, 2004). En estudios de homología de ADN se ha comprobado una relación cercana de las bacterias del género *Shigella* con una *E. coli* enteroinvasiva (Llop y col., 2001).

La bacteria *Shigella* tiene como característica la presencia de un plásmido de virulencia (**Figura 7**), esencial para el proceso de invasión; aumentando la producción de adhesinas e invasinas, la diseminación intercelular de la bacteria y la secreción de diversos factores de virulencia, que van a modular la respuesta inflamatoria producida en el hospedador (**Tabla 1**). La región plasmídica codifica para la síntesis de las proteínas Ipa y un sistema de secreción Ipa conocido como Mxi-Spa. (Bourdet y col., 1999; Sasakawa, 2010, Sansonetti, 2006).



**Figura 7. Plásmido de virulencia de *Shigella flexneri* serotipo 5a.** (Tomado de [http://textbookofbacteriology.net/Shigella\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/Shigella_3.html)).

**Tabla 1. Principales genes y su función en el mecanismo de invasión de *Shigella flexneri*.** (Tomado y modificado de [http://textbookofbacteriology.net/Shigella\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/Shigella_3.html)).

Genes	Masa de la proteína	Función reguladora o efectora
<i>virF</i>	30 kDa	Regulador positivo de los loci <i>virG</i> e <i>ipa-mxi-spa</i>
<i>invA(mxiB)</i>	38 kDa	Necesario para la invasión (promueve la secreción de las proteínas IpA fuera de la membrana de la célula bacteriana)
<i>mxiA</i>	76 kDa	Lo mismo que arriba
<i>ippI</i>	18 kDa	Lo mismo que arriba
<i>ipaB</i>	62 kDa	Necesario para la invasión: media la toma de <i>Shigella</i> via endocitosis
<i>ipaC</i>	43 kDa	Lo mismo que arriba
<i>ipaA</i>	38 kDa	Lo mismo que arriba

Genes	Masa de la proteína	Función reguladora o efectora
<i>ipaD</i>	78 kDa	No es necesario para la invasión (papel desconocido)
<i>virB</i>	33 kDa	Regulador positivo de los loci <i>virG</i> e <i>ipa-mxi-spa</i>
<i>virG (icsA)</i>	120 kDa	Ayuda a formar una cola de actina que promueve que la bacteria se movilice a través del citoplasma de la célula y dentro de células vecinas
<i>ipaH</i>	60 kDa	Posee 5 alelos. La proteína IpaH.7.8 facilita el escape de <i>Shigella</i> de la vacuola <u>endocítica</u> .
<i>shET2</i>	60kDa	Enterotoxina ShET2

### II.2.3. Patología, signos y síntomas.

Las infecciones causadas por *Shigella* sp son altamente contagiosas, produciendo un espectro amplio de síntomas, siendo los más representativos la diarrea acuosa y la disentería, caracterizada por fiebre elevada y dolores abdominales. Estos síntomas son reflejos de la

invasión establecida por la bacteria *Shigella* sp en la mucosa intestinal, provocando una exacerbada respuesta inflamatoria debido a la destrucción masiva del epitelio intestinal (Phalipon y Sansonetti, 2007). En la ausencia de tratamientos efectivos, los pacientes con shigellosis pueden desarrollar complicaciones secundarias tales como septicemia, neumonía y síndrome urémico hemolítico (Jennison y Verma, 2004).

La enfermedad puede ocurrir a cualquier edad, pero es más frecuente en niños con edades comprendidas entre 2 y 3 años. Es rara antes de los 6 meses y disminuye su incidencia luego de los 5 años de edad. La mayoría de los episodios de shigellosis en pacientes adultos son autolimitados y se resuelven en 5 a 7 días sin secuelas (Jennison y Verma, 2004).

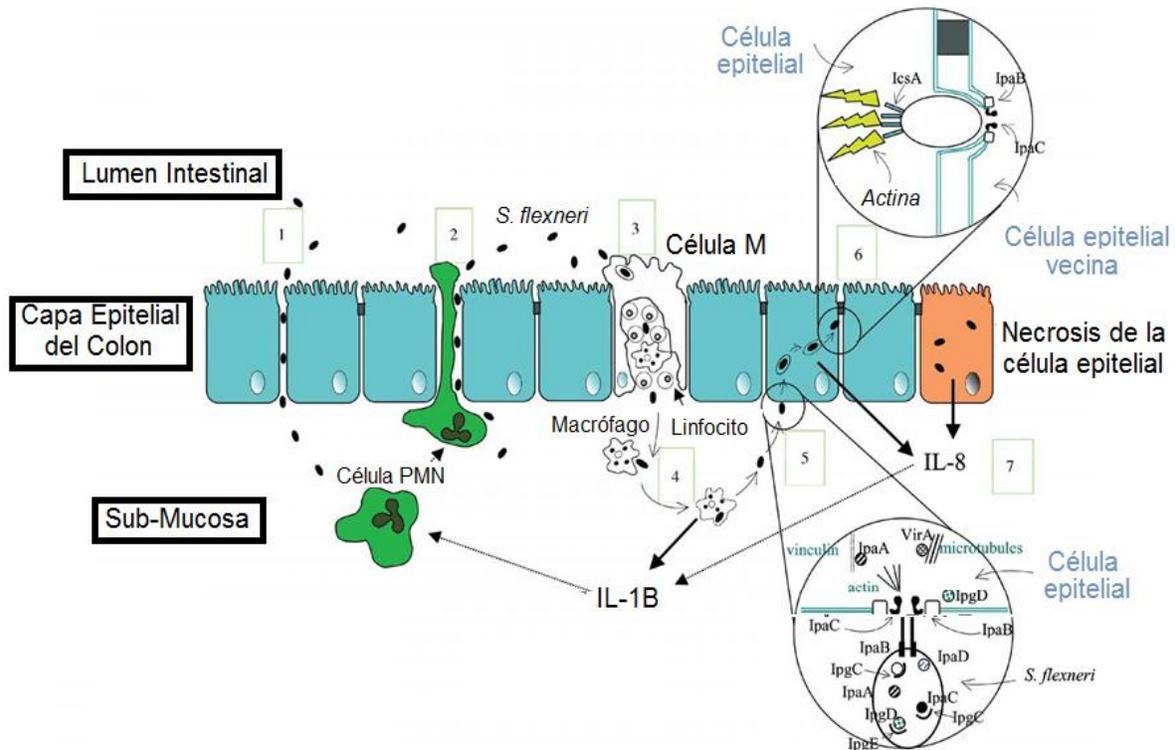
#### **II.2.4. Mecanismo de invasión de *Shigella flexneri* en el epitelio intestinal**

El mecanismo de infección de *Shigella* sp representa una vía extraordinaria de ruptura, invasión y destrucción inflamatoria de la barrera epitelial, estando implicados una serie de mecanismos moleculares y de interacciones mediadas por efectores bacterianos (Sansonetti, 2006). Éstos efectores o proteínas son secretados al medio intracelular de la célula diana por un sistema de secreción tipo III (SSTT), el cual se encuentra codificado por el plásmido de invasión de *Shigella* sp (Barrantes y Achí, 2008; Jennison y Verma, 2004).

Uno de los primeros obstáculos que la bacteria debe superar para invadir el epitelio intestinal es el bajo pH al cual es expuesta antes de cruzar el epitelio intestinal, que puede alterar su viabilidad al no poseer los mecanismos de defensa apropiados. Estudios previos han demostrado que *Shigella* sp y *Escherichia coli* poseen mecanismos de defensa contra la acidez, tales como: 1. El mecanismo de resistencia al ácido 1, inducido por acidez y reprimido por glucosa, y 2. el mecanismo conocido como GDAR, dependiente de una descarboxilasa de aminoácidos y un sistema de antiporte. La presencia de estos sistemas puede contribuir a la tolerancia que tiene

*Shigella* sp ante la acidez gástrica, lo que también podría explicar, al menos parcialmente, la baja dosis infectante que caracteriza a esta bacteria (Barrantes y Achí, 2008).

En la **Figura 8** se describe los mecanismos de invasión de *S. flexneri* en el intestino propuesto por Jennison y Verma en el 2004.



**Figura 8. Mecanismos de invasión de *Shigella flexneri*.** La bacteria invade la capa del epitelio del colon generando una fuerte respuesta inflamatoria. **Vía 1.** *S. flexneri* puede manipular las proteínas vinculadas a las uniones estrechas expresadas por las células del epitelio, permitiendo un movimiento paracelular de la bacteria dentro de la mucosa. **Vía 2.** El reclutamiento de las células polimorfonucleares por la producción de IL-8 e IL-1b en respuesta a la invasión de *S. flexneri*, crea una vía de paso entre las células epiteliales, a través de la cual dicha bacteria puede migrar al interior del comportamiento de la mucosa. **Vía 3.** Las células M toman a la bacteria por transcitosis, liberándola hacia una zona intraepitelial que contiene una gran cantidad de macrófagos y linfocito B y T. **Vía 4.** La bacteria es fagocitada por los macrófagos que residen dentro de la célula M. *S. flexneri* escapa del fagosoma e induce la apoptosis del macrófago, que conlleva la producción de IL-1b. **Vía 5.** *S. flexneri* hace contacto con la membrana basolateral del enterocito, que activa el SSTT y media por lo tanto la secreción de proteínas desde la bacteria hasta la célula diana. Las proteínas chaperonas son secretadas dentro del citosol del enterocito a través de un poro formado por la proteína IpaB e IpaC. Las proteínas invasivas secretadas por la bacteria provocan que el enterocito tome dentro de una vacuola a *S. flexneri*. **Vía 6.** La proteína IpaB e IpaC causa la lisis de la vacuola, liberando a *S. flexneri* al citoplasma de la célula epitelial. La proteína IcsA provoca la formación de una cola de actina unida a un polo de la bacteria, que facilita su movimiento. La membrana de la célula vecina es lisada por la proteína IpaB e IpaC. **Vía 7.** La invasión intracelular de la bacteria al enterocito causa la producción de IL-8. Las citocinas IL-8 e IL-1b son quimioatrayentes de células PMN, que migran hacia la zona de infección causando la disrupción del epitelio y aumentando a su vez la invasión de *S. flexneri* al interior de la mucosa (Tomado y modificado de Jennison y Verma, 2004).

Cuando la célula pasa por la mucosa gástrica, coloniza el epitelio intestinal en el colon y transita a través de las células M (**Vía 3, Figura 8**), que recubre los folículos linfoides del epitelio intestinal (principalmente las Placas de Peyer), llevándola al compartimiento endosomal hasta secretarla a través de la membrana basal (Barrantes y Achí, 2008; Sasakawa, 2010).

Seguido de la entrada y lisis de la vacuola fagocítica, *Shigella* sp promueve su fagocitosis por los macrófagos residentes dentro de las células M. Una vez dentro del macrófago, la bacteria escapa del fagosoma e induce la apoptosis, siendo este mecanismo dependiente de la proteína IpaB (**Vía 4, Figura 8**). Esta proteína activa la Caspasa I, la cual aparte de inducir apoptosis conduce a la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-8, siendo ésta última la principal quimio atrayente de neutrófilos. El reclutamiento de neutrófilos a la zona de infección, conlleva a otra ruta de invasión del microorganismo a la región basolateral del enterocito, que migran a través de las uniones epiteliales donde *Shigella* sp ha establecido la infección (**Vía 2, Figura 8**) (Sasakawa, 2010; Lennison y Verma, 2004; Barrantes y Achí, 2008). La liberación de *Shigella* sp por el macrófago apoptótico, favorece el contacto con el enterocito, específicamente por su región basolateral y su invasión (Barrantes y Achí, 2008).

Investigaciones recientes han revelado otro mecanismo de invasión de *S. flexneri*, siendo capaz de regular la expresión y la distribución de las proteínas celulares asociadas a uniones estrechas cuando interacciona con la región basolateral del enterocito, permitiendo su movimiento vía para-celular a través de un modelo de barrera intestinal, lo que sugiere que *Shigella* sp es capaz de penetrar el epitelio del colon vía un mecanismo independiente de células M y neutrófilos (**Vía 1, Figura 8**) (Jennison y Verma, 2004).

El ingreso de *Shigella* sp al citoplasma del enterocito es un proceso complejo, que involucra una serie de mecanismos de interacción entre las distintas proteínas efectoras bacterianas y las

integrinas que forman parte de la célula del hospedador (Barrantes y Achí, 2008; Jennison y Verma, 2004).

En la primera etapa, la cual es denominada pre-interacción, las proteínas efectoras se acumulan en el citoplasma bacteriano. En la segunda etapa (denominada interacción), la cual constituye el contacto de la bacteria con la célula del hospedador, se activa una señal de secreción, que conlleva a la secreción de proteínas por el sistema de secreción tipo III (SSTT) hacia la célula blanco (**Vía 5, Figura 8**). La activación del SSTT de la bacteria lleva a la transcripción de 12 genes presentes en el plásmido de virulencia que codifican para proteínas que llevarán a la polimerización de la actina y ayudarán por lo tanto al esparcimiento del microorganismo por todo el epitelio del colon (Phalipon y Sansonetti, 2007; Barrantes y Achí, 2008).

La tercera etapa ocurre con la macropinocitosis de la bacteria por el enterocito, debido a los re-arreglos del citoesqueleto de actina que permiten la formación de un foco de entrada y la formación de una vacuola (macropinocitoma) (Barrantes y Achí, 2008). Esta vacuola es lisada rápidamente, conduciendo a la liberación de *Shigella* sp dentro del citoplasma de la célula del hospedador (Jennison y Verma, 2004). La cuarta etapa se da por la depolimerización de la actina y cierre del macropinocitoma. Una vez dentro del enterocito, la bacteria se multiplica en el citoplasma, nicho que la protege de los componentes del sistema inmunológico del espacio extracelular (Barrantes y Achí, 2008).

El proceso de invasión intracelular genera una fuerte respuesta inflamatoria que destruye la integridad de la barrera epitelial, conjuntamente con el debilitamiento de las uniones intercelulares, conduciendo a un aumento de la invasión bacteriana (Barrantes y Achí, 2008) (**Vía 7, Figura 8**). Sin embargo, aunque la respuesta inflamatoria es claramente importante en la patogénesis de la shigellosis, es evidente que un nivel alto de inflamación conllevaría a la muerte

de la bacteria y por lo tanto a la posible erradicación de la infección. Por esto, la bacteria es capaz de sintetizar efectores de virulencia que controlan la inflamación, bloqueando la vía NF- $\kappa$ B, principal factor de transcripción de las citoquinas inflamatorias (Phalipon y Sansonetti, 2007; Sasakawa, 2010).

La bacteria *Shigella* sp invade las células de la cripta intestinal, regulando el ciclo celular y el recambio de las células de intestino (Sasakawa, 2010). Además refuerza las proteínas de adhesión celular que mantienen unidas las células del intestino a la membrana basal (Sasakawa, 2010).

Recientemente *Shigella flexneri* ha sido reportada con un fenotipo con un alto patrón de resistencia a múltiples antibióticos, reportándose en el Hospital de San Vito, Puntarenas, Costa Rica, los porcentajes de resistencia mostrados en la **tabla 2** (Mora y col., 2003):

**Tabla 2. Resistencia de *Shigella flexneri* a diferentes antimicrobianos.** Los porcentajes de resistencia más altos encontrados fueron Trimetoprim + Sulfametoxazol y ampicilina, con un 77,5%, seguido por la tetraciclina con un 72,3%. (Tomado y modificado de Mora y col., 2003).

<b>Antibióticos</b>	<b>% de Resistencia</b>
Trimetoprim + Sulfametoxazol	77,5%
Ampicilina	77,5%
Tetraciclina	72,3%
Cloranfenicol	17,6%
Eritromicina	13,7%

Resultados similares a los mostrados en la **tabla 2** han sido reportados en el Hospital Universitario de Caracas (Hernández y Godoy, 2002).

### II.2.5. Diagnóstico y vacunas desarrolladas para combatir la shigellosis

La metodología desarrollada para el diagnóstico de *Shigella* sp, principalmente se basa en un examen de las heces del individuo junto con su caracterización bioquímica con pruebas de laboratorio. Los serotipos de cada especie de *Shigella* son identificados con pruebas de serotipificación. La prueba consiste en la mezcla de un antisuero específico con una suspensión de cultivo puro de *Shigella* sp, observando una reacción de aglutinación (Terragno y col., 2007).

Las vacunas desarrolladas frente a la shigellosis deben cumplir ciertos requerimientos: 1. deben activar el sistema inmune de la mucosa, 2. la inmunidad conferida debe perdurar a un largo plazo, 3. debe causar en el individuo los menores efectos posibles y 4. debe ser simple de administrar (Jennison y Verma, 2004).

Las vacunas híbridas realizadas con una cepa de *E. coli* K12, un antígeno específico de una cepa de *S. flexneri* 2a y el plásmido de virulencia de la cepa *S. flexneri* 5a han demostrado que pueden inducir protección significativa en voluntarios inmunizados con alta dosis de *Shigella* sp (Kotloff y col., 1992; 1995). También se han reportado vacunas realizadas con cepas atenuadas, inactivando ciertos genes que contribuyen a la virulencia de la bacteria (Jennison y Verma, 2004).

Las vacunas débilmente atenuadas podrían causar síntomas tales como diarrea y fiebre cuando se administran alta dosis de la misma. Esto conduce a que el desarrollo de una vacuna contra *S. flexneri* debe proveer un balance entre la inmunogenicidad y la protección del individuo (Jennison y Verma, 2004).

Si bien se ha reportado una gran variedad de posibles vacunas contra cepas de *S. flexneri*, actualmente sigue habiendo dificultades en la búsqueda de una vacuna inocua y eficaz que

produzca inmunidad duradera. Son alentadores los ensayos iniciales que demuestran la eficacia a corto plazo de la vacuna propuesta con el polisacárido O junto con bacterias atenuadas, y se esperan con interés los resultados de otras investigaciones (De Quadros, 2004).

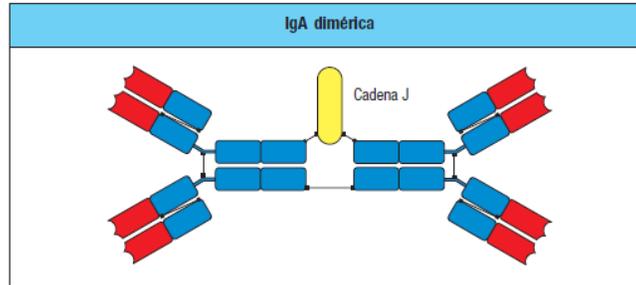
Estudios previos han reportado que los individuos que padecieron la enfermedad generan una respuesta de inmunidad humoral que permite la protección del individuo contra bacterias del mismo serotipo, siendo el principal componente la inmunoglobulina A (IgA) en la mucosa intestinal (Jennison y Verma, 2004).

### **II.3. IgA secretora (SIgA)**

Una actividad importante de la superficie de la mucosa es la producción de diferentes isotipos de anticuerpos, siendo el principal isotipo en este órgano la IgA secretora (“SIgA”), que representa la primera línea de defensa contra múltiples microorganismos patógenos (Boullier y col., 2009; Kadaoui y Corthésy, 2007).

#### **II.3.1. Características básicas de la IgA**

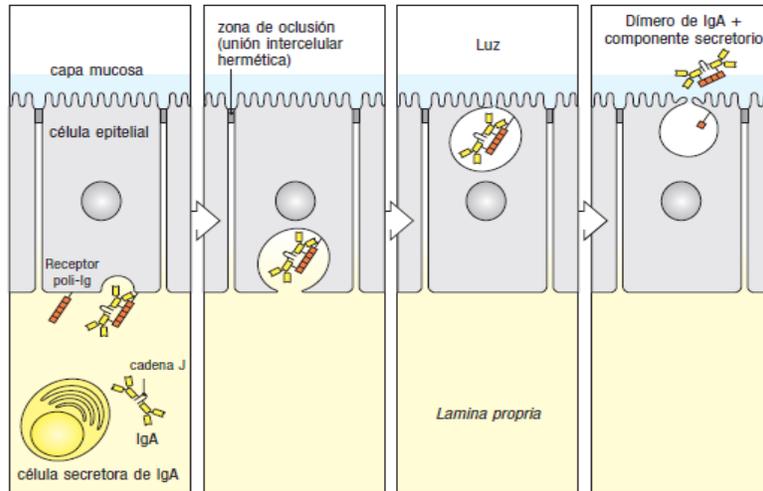
Esta clase de anticuerpos, de 160 kDa de masa molecular, se encuentra en los seres humanos en dos sub-clases, IgA1 e IgA2, siendo producidas en la mucosa en una proporción de 3:2 respectivamente. La IgA está constituida por dos cadenas livianas  $\lambda$  ó  $\kappa$  y dos cadenas pesadas  $\epsilon$ . Es producida principalmente en forma de dímero a nivel del intestino, conteniendo una cadena polipeptídica separada de 15 kDa (cadena J), que promueve la polimerización de los anticuerpos al unirse a la cisteínas de ambas colas (**Figura 9**). Los principales sitios de síntesis y secreción de IgA son: el intestino, el epitelio respiratorio, las mamas que producen leche y otras glándulas exocrinas, como las salivales y las lagrimales (Murphy y col., 2008).



**Figura 9. Representación gráfica de la molécula de IgA dimérica.** La inmunoglobulina A a nivel de la mucosa se sintetiza formando un dímero asociado a una cadena polipeptídica adicional, la cadena J (en amarillo). Los cuatro sitios de unión al antígeno en la IgA dimérica, la región variable, están en los extremos de los brazos (en rojo), que se encuentran fijados al tronco de la Y por una región bisagra flexible. La parte azul representa la región constante del anticuerpo. (Tomado de Murphy y col., 2008).

### II.3.2. Mecanismo de transporte de la SIgA hacia la luz intestinal

Para alcanzar sus antígenos blanco en la luz del intestino, la proteína IgA tiene que ser transportada a través del epitelio; proceso que es mediado por células epiteliales inmaduras localizadas en la base de las criptas intestinales, que expresan el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (receptor poli-Ig) sobre sus superficies basolaterales. Estos receptores poseen alta afinidad por las inmunoglobulinas poliméricas y median la transcitosis del anticuerpo hacia la luz intestinal, donde es liberado por escisión proteolítica del dominio extracelular del receptor poli-Ig. Parte del receptor dividido permanece unido al anticuerpo y es denominado componente secretorio. Mientras que el anticuerpo resultante ahora es denominado IgA secretora (Murphy y col., 2008). El componente secretor asegura la solubilidad de la proteína SIgA al mucus que recubre el tejido epitelial del intestino, permitiendo cumplir su principal función, denominada neutralización (**Figura 10**) (Boullier y col., 2009).



**Figura 10. Transporte de la IgA hacia la luz intestinal.** El dímero de IgA unido a una cadena J difunde a través de la membrana basal y es unido por el receptor poli-Ig en la superficie basolateral de la célula epitelial. El complejo unido es transportado mediante transcitosis en una vesícula a través de la célula hacia la superficie apical, donde el receptor poli-Ig es escindido para abandonar el componente de unión a la IgA extracelular unido a la molécula de IgA como el llamado componente secretorio. El carbohidrato en el componente secretorio se une a mucinas en el moco y mantiene la IgA en la superficie epitelial. El fragmento residual del receptor poli-Ig no es funcional y se degrada (Tomado y modificado de Murphy y col., 2008).

### II.3.3. Función de la IgA secretora

La función de la proteína SIgA consiste en prevenir la interacción de los microorganismos con el epitelio intestinal, limitando la penetración de las bacterias comensales y contribuyendo a mantener la densidad de las especies bacterianas. También ha sido reportado que la IgA participa en el proceso de neutralización de las toxinas y algunas enzimas bacterianas (Boullier y col., 2009; Murphy y col., 2008). Este anticuerpo tiene la capacidad de eliminar agentes patógenos sin causar una respuesta inflamatoria. No activa la vía clásica del complemento (Murphy y col., 2008).

En estudios previos se ha demostrado que la proteína SIgA también puede mediar su translocación, junto con el microorganismo, vía células M, a las Placas de Peyer donde se

encuentran con las células dendríticas y células T, sin promover una respuesta inflamatoria, preservando así la homeostasis local del individuo (Boullier y col., 2009).

#### **II.4. Óxido Nítrico (NO)**

Además de la respuesta inmunitaria humoral las bacterias inducen, por parte de las células del sistema inmunitario, mediadores inflamatorios que puedan afectar la viabilidad del microorganismo, siendo uno de los más importantes el óxido nítrico; producido principalmente por los macrófagos por una vía enzimática inducible (Bogdan, 2001).

##### **II.4.1. Características**

El óxido nítrico (NO) es un gas compuesto por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno que unidos dan lugar a una pequeña molécula que posee un número impar de electrones, lo que le otorga la característica de radical libre. Esta molécula es bastante inestable en presencia de oxígeno, teniendo un tiempo de vida media de 3,8 a 6,2 segundos aproximadamente. Tras su oxigenación, el NO se transforma en metabolitos estables, nitratos y nitritos, que permiten medir de forma indirecta su producción (Tenorio y col., 2005).

Desde hace dos décadas, el NO ha sido reconocido como una de las moléculas más versátiles en el sistema inmunitario, encontrándose involucrado en el control de la patogénesis, tumores, enfermedades infecciosas, procesos autoinmunes y enfermedades crónicas autogenerativas (Bogdan, 2001).

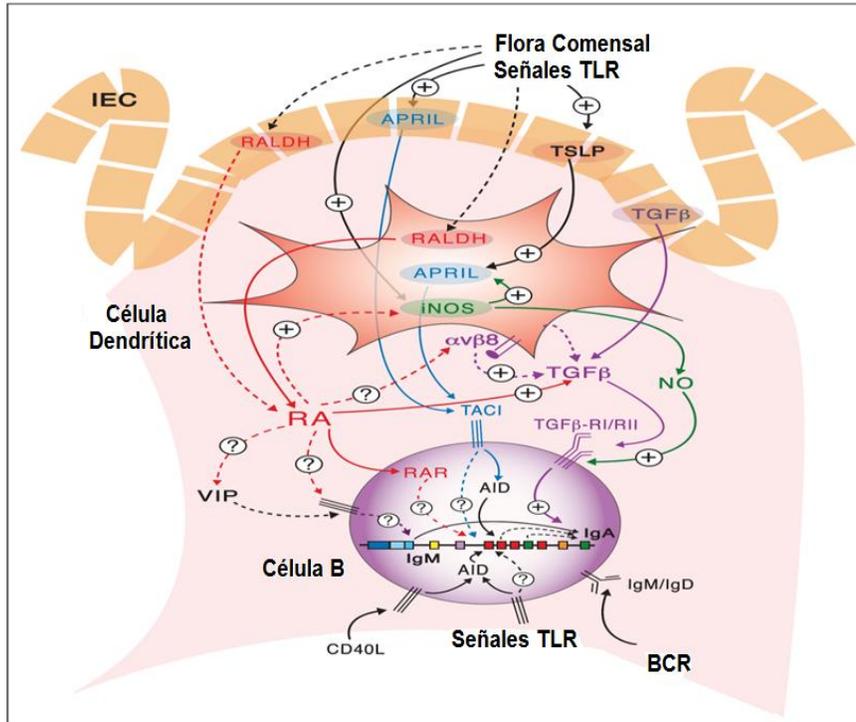
A nivel gastrointestinal se han demostrado al menos tres fuentes de producción de NO. La producción enzimática clásica, mediada por las diferentes isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, la producción no enzimática, y otra por parte de las bacterias gastrointestinales (Ponferrada, 2006). Las células del sistema inmunitario, como los macrófagos, células

dendríticas, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, expresan la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) (Korhonen y col., 2005).

Cuando las células del sistema inmunitario se exponen a diferentes productos microbianos, tales como el LPS, RNA o citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), se incrementa la producción del óxido nítrico por parte de la ONSi (Korhonen y col., 2005). Esta inducción de la enzima ONSi se ha relacionado con la defensa contra microorganismos, produciendo una fuerte toxicidad celular (Ponferrada, 2006).

#### **II.4.2. Mecanismos de regulación del ON para estimular la producción de SIgA**

Ha sido reportado que el ON juega un papel importante en la producción y respuesta de IgA independiente del timo (**Figura 11**). Las células dendríticas (DC) de los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) expresan la forma de la enzima ONSi, inducida por la flora comensal y las señales de los receptores tipo TOLL. El NO es un factor de transcripción, necesario para la expresión de los genes que codifican para el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  RI/RII) en células B inmaduras y para la síntesis de un ligando inductor de proliferación (APRIL) por parte de las CD-GALT. Tanto APRIL como TGF $\beta$ -RI/RII contribuye de manera directa o indirecta a la hipermutación somática y a la expresión de los genes que codifican para la región constante (Fc) del anticuerpo IgA, provocando un cambio de isotipo a IgA en células B inmaduras que expresan IgM/IgD. El ácido retinoico (RA), una forma procesada de la vitamina A por la enzima retinol deshidrogenasa, repotencia la producción del NO y de TGF- $\beta$ , conllevando de manera indirecta al cambio de isotipo a IgA en células B inmaduras. El RA es sintetizado por las células del epitelio intestinal y las CD-GALT (Mora y von Andrian, 2009).



**Figura 11. Diferentes mecanismos de inducción del cambio isotípico de los linfocitos B inmaduros a células secretoras de anticuerpos IgA en el intestino, vía independiente del timo.** Las células dendríticas de los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) expresan la ONSi, la cual es inducida por los receptores tipo TOLL cuando son estimulados por las bacterias comensales. El ON liberado por las CD causa la expresión de los genes que codifican para el receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$  RI/RII) en células B inmaduras que expresan receptores IgM/IgD. Cuando el ligando (TGF-  $\beta$ ) se une a su receptor causa la expresión de los genes que codifican para la región constante del anticuerpo, conllevando a un cambio de isotipo de IgM/IgD a IgA. La expresión de la ONSi causa la síntesis de un ligando inductor de proliferación (APRIL) por parte de las CD. Este ligando se une al receptor TACI que se encuentra en los linfocitos B inmaduros, conllevando a la expresión de los genes que codifican para la enzima AID (responsable de la hipermutación somática) y los genes que codifican para la región constante del anticuerpo, que causa un cambio de isotipo de IgM/IgD a IgA. El RA repotencia la producción del ON y el TGF-  $\beta$  por parte de las CD, conllevando de manera indirecta el cambio de isotipo a IgA en células B inmaduras del intestino (Tomado y modificado de Mora y von Andrian, 2009).

### III. ANTECEDENTES

#### III.1. Internacionales

En los últimos años se ha ido adquiriendo cada vez más conciencia de la enorme repercusión mundial de *Shigella* sp como patógeno intestinal y de las devastadoras consecuencias que podrían derivarse de un ritmo de aparición de cepas multiresistentes que desbordase la disponibilidad de tratamientos accesibles y eficaces (Kotloff y col., 1999). Ello ha llevado a numerosas investigaciones para estudiar las infecciones causadas por *Shigella flexneri* y la respuesta inmunológica que se desencadena a partir de la infección por este microorganismo, algunas conducentes a buscar una proteína que estimule una respuesta inmunitaria y que pueda funcionar como vacuna para prevenir efectivamente la enfermedad.

##### **III.1.1 *Shigella flexneri* estimula la producción de anticuerpos. La IgA secretora es el principal componente protector frente a la shigellosis**

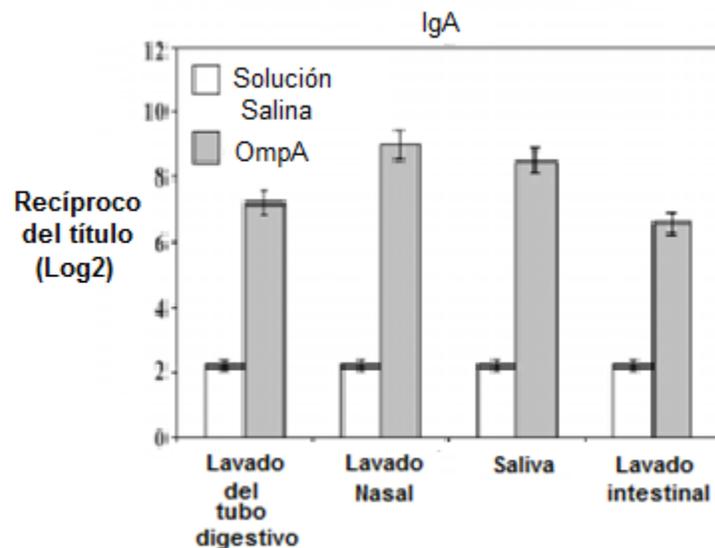
La importancia de la respuesta inmunitaria humoral frente a las infecciones causadas por *Shigella* sp ha sido confirmada en un estudio que demostró que los niños, que se caracterizan por tener una respuesta inmunitaria humoral reducida en comparación con los individuos adultos, son más susceptibles a la shigellosis (Jennison y Verma, 2004). Otros estudios han demostrado que los anticuerpos IgG, IgA e IgM en suero reflejan la presencia de infecciones naturales con *Shigella flexneri* y que niveles elevados de anticuerpos pre-existentes, que reconocen antígenos somáticos de este microorganismo, le confiere resistencia al individuo contra la enfermedad (Cohen y col., 1989).

En estudios realizados en voluntarios vacunados con LPS de *Shigella flexneri*, conjugado con una proteína recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, se demostró que se induce la protección

con niveles de anticuerpos específicos IgG subclase 2 y una respuesta de IgA en suero, que disminuye en un 80% dos años después de la exposición (Robin y col., 1999).

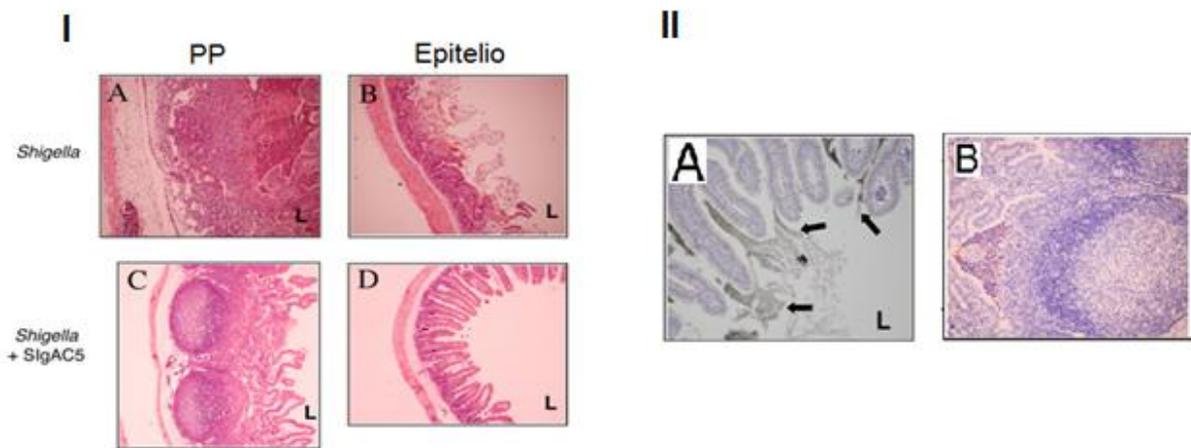
La inmunización oral con bacterias muertas de una cepa de *Shigella flexneri* 2a en conejos, confirmó un aumento en el título de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* en el lavado intestinal, cuando se incrementaba el número de dosis de inmunización. Tal experimento se llevó a cabo a través de una metodología de ELISA, acoplado a la placa el lisado celular o la preparación de proteínas transmembranas (Omp) de dicha bacteria (Mukhopadhaya y col., 2003).

Trabajos posteriores realizados con ratones inmunizados intranasalmente con la proteína transmembrana A de *Shigella flexneri* 2a, demostraron que hubo un incremento en el título de anticuerpos IgA anti- *S. flexneri* en secreciones de la mucosa (lavado del tubo digestivo, lavado nasal, saliva y lavado intestinal) (**Figura 12**) (Pore y col., 2011).



**Figura 12. Niveles de anticuerpos IgA en secreciones de la mucosa, cuando los ratones son inmunizados intranasalmente con la proteína transmembrana A de *Shigella flexneri* 2a.** En la figura se evidencia un aumento del recíproco del título de anticuerpos IgA en las secreciones de las mucosas (lavado del tubo digestivo, lavado nasal, saliva y lavado intestinal) cuando los ratones son inmunizados intranasalmente con una proteína de membrana aislada de *S. flexneri* (Tomado y modificado de Pore y col. 2011).

En modelos experimentales en conejos, los cuales poseen sistemas que asemejan los procesos inflamatorios y la subsecuente destrucción masiva del tejido en infecciones naturales con *Shigella* sp en humanos, se ha demostrado que la proteína SIgA lleva tanto la función de la exclusión inmune de la bacteria como la translocación de ésta a las placas de Peyer. Estos anticuerpos son internalizados por las células dendríticas en las placas de Peyer, preservando la integridad de la barrera intestinal y disminuyendo la inflamación inducida por la bacteria (**Figura 13**) (Boullier y col., 2009).



**Figura 13. I. Examinación histológica** que muestra la destrucción de las placas de Peyer (A) y el epitelio intestinal (B), cuando a los conejos se le administran dosis letales de *Shigella flexneri*. Integridad de las placas de Peyer (C) y el epitelio intestinal (D) cuando a los conejos se le administran dosis letales con *Shigella flexneri* combinados con anticuerpos SIgAC5 en condiciones de aglutinación **II**. La SIgA se muestra en el lumen intestinal cuando es administrada sola (A). Localización de la bacteria junto con el anticuerpo SIgAC5, dentro de la placa de Peyer (B). (Tomado y modificado de Boullier y col., 2009).

En otro estudio ha sido reportado que un anticuerpo monoclonal IgA (IgAC5) que se une al antígeno O (parte del LPS) del serotipo 5a de *S. flexneri*, suprime la actividad del sistema de secreción tipo III, el cual es necesario para que *S. flexneri* entre a las células del epitelio intestinal. Este efecto es muy rápido (5 a 10 minutos) y coincide con una reducción parcial en el potencial de membrana bacteriano y una disminución de los niveles intracelulares de ATP,

alterando la viabilidad de la célula y por lo tanto provocando protección frente a este serotipo (Forbes y col., 2011).

### **III.1.2. El ON estimula la producción de IgA secretora en la mucosa**

Aunque existe un mecanismo que explica que el ON estimula la producción de SIgA en el intestino (anteriormente mencionado), no se han reportado trabajos previos que correlacionen directamente estas variables. Es importante aclarar que dicho mecanismo se ha demostrado sólo con evidencias experimentales *in vitro* y en modelos animales.

## **III.2. Nacionales**

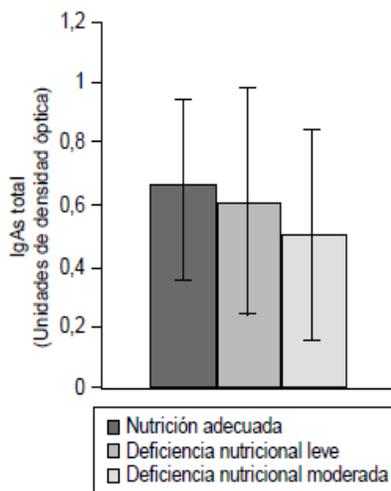
### **III.2.1. Prevalencia de *Shigella flexneri* en comunidades urbanas y rurales de Venezuela**

Estudios realizados por Urrestarazu y colaboradores (1999) mostraron que *Shigella* sp (con el 7%) representaba una de las enterobacterias más importantes en casos de diarrea en 4 ciudades de Venezuela (Mérida, Caracas, Cumaná y Puerto Ordaz). Una investigación realizada en la ciudad de Maracaibo donde determinaron la prevalencia de *Shigella* sp en la población, demostró que el 72,3% de los enteropatógenos aislados pertenecían a dicho género, siendo la especie más importante *Shigella flexneri* con 67,2% (Sandrea y col., 2002). No existen trabajos realizados a nivel nacional que reporten la prevalencia de *Shigella* sp en comunidades indígenas hasta la fecha.

### **III.2.2. Niveles de IgA secretora total en niños venezolanos**

Investigaciones realizadas por Chacón y colaboradores (2004), comparando los niveles de IgA secretora total en diferentes grupos etarios de una población sana del estado Carabobo,

demonstraron que la SIgA total en saliva se relaciona con la edad, aumentando paulatinamente estos niveles desde los 2 años hasta alcanzar un máximo en el grupo entre 20 y 40 años. También se ha reportado que los niveles de esta inmunoglobulina en saliva se relacionan con un gran número de factores, entre los que se pueden citar: la raza, los hábitos alimentarios, el nivel socioeconómico, el sexo y la respuesta a los antígenos presentes en cada comunidad en particular (Moragrega, 1996). Estudios realizados por Ortiz y colaboradores (2000), comparando los niveles de IgA secretora en dos comunidades rurales de Venezuela, con bajas condiciones socioeconómicas, demostraron que las deficiencias nutricionales podrían alterar los mecanismos de la inmunidad de las mucosas e influir negativamente en la síntesis de IgA secretora (**Figura 14**), así como también las condiciones ambientales y socioeconómicas de cada población.



**Figura 14. Niveles de IgA secretora total con respecto al estado nutricional del individuo.** Los niveles de IgA secretora total disminuyen de acuerdo a las deficiencias nutricionales en dos comunidades rurales de Venezuela. (Ortiz y col., 2000).

No se han reportado estudios a nivel nacional sobre la respuesta inmunitaria humoral frente a las infecciones por esta bacteria, aun cuando la shigellosis sea una de las enfermedades de importancia a nivel nacional.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. Objetivo general

Caracterizar la respuesta de IgA secretora estimulada por la bacteria *Shigella flexneri* en niños escolares venezolanos de bajo nivel socioeconómico, que se encuentran crónicamente expuestos a enfermedades intestinales.

### IV.2. Objetivos específicos

1. Analizar la prevalencia de infecciones intestinales en distintos grupos de niños venezolanos urbanos y rurales, de alto riesgo social, en donde las infecciones intestinales comunes son frecuentes.
2. Determinar los niveles de IgA secretora total de niños venezolanos de diferentes comunidades rurales y urbanas expuestos crónicamente a enfermedades intestinales.
3. Estandarizar una técnica de ELISA que permita medir en saliva anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* y *Escherichia coli* no patogénica.
4. Determinar y comparar los niveles de IgA secretora específica frente a antígenos de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* no patogénica en distintas comunidades rurales y urbanas de Venezuela.
5. Determinar los niveles de NO en salivas de niños escolares provenientes de diferentes comunidades rurales y urbanas.
6. Estimar la posible asociación entre los niveles de IgA secretora total y específica contra *Shigella sp* con los niveles de NO en saliva.

## **Hipótesis**

*Shigella flexneri* estimula la producción de IgA secretora en niños rurales y urbanos venezolanos de alto riesgo social expuestos a las infecciones intestinales la cual podría estar asociada a la producción de NO estimulada por las bacterias.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

**V.1. Población de estudio:** se estudiaron todos los niños escolares (4-12 años) cuyos padres firmaron el consentimiento informado “C.I” (Se anexa el C.I y el aval de la comisión de bioética del Instituto de Biomedicina), provenientes de escuelas de diferentes comunidades rurales y urbanas del país. Las comunidades fueron seleccionadas de acuerdo a su bajo nivel socioeconómico, el cual influye en la prevalencia y la carga bacteriana. Las comunidades estudiadas fueron las siguientes:

1. Distrito Federal: Parroquia 23 de Enero, Escuela Amalia Pellín.
2. Comunidades perteneciente a la etnia Warao. Escuela San Francisco de Guayo, Municipio Antonio Díaz. Estado Delta Amacuro
3. Comunidades perteneciente a la etnia Panare. Escuela Caño colorado, Municipio Cedeño. Estado Bolívar.

**V.2. Evaluación clínica:** cada niño fue evaluado por personal médico autorizado del Instituto de Biomedicina, proporcionándonos una data con la sintomatología clínica (Se anexa modelo de la Historia Clínica). Los síntomas considerados positivos fueron antecedentes de diarrea y manifestación de diarrea y dolor abdominal en el momento de la evaluación clínica. La evaluación coprológica (exámenes seriados en fresco) fue llevada a cabo por personal bioanalista del Laboratorio de Enfermedades Entéricas del Instituto de Biomedicina y de la Cátedra de Parasitología de la Escuela Vargas.

**V.3. Determinación de los niveles de IgA secretora total en saliva:** Para la determinación de los niveles de IgA secretora total en saliva, las muestras fueron recolectadas directamente de la boca de cada niño por personal autorizado del Instituto de Biomedicina. El protocolo para la

recolección de las muestras se realizó de la siguiente manera: a cada niño se le colocó una almohadilla de algodón estéril entre la encía superior y la mejilla y se retiró a los 5 minutos con ayuda de un aplicador. Se colocó dentro de una inyectora de 5 mL y se exprimió en un tubo estéril (Vacutanier con EDTA), conteniendo inhibidores de proteasas. Las muestras fueron conservadas en frío para su traslado. En el laboratorio se centrifugaron y se alicuotaron para su posterior uso, conservándose a una temperatura de -20°C. Todos los niños participantes en el estudio se encontraban en ayuno, 12 horas previas de la toma de la muestra, evitando en lo posible restos de alimentos y pasta dental.

Los niveles de anticuerpos totales en saliva fueron estimados por ELISA siguiendo de un protocolo estándar (Ortíz y col., 2000; Rodríguez y col., 2004). Para ello se utilizaron placas de microtitulación de polivinilo Dynatech Immunolol 4 de 96 pocillos, las cuales fueron sensibilizadas con 100µL por pozo de una solución de IgA de cabra anti-componente secretor humano (cadena  $\alpha$  específica: SIGMA) a una dilución 1:1000, lo cual es establecido por la casa comercial y diluido en buffer carbonato-bicarbonato a pH 9.6 y mantenido a 4°C durante toda la noche. Luego la placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 10% y bloqueada con PBS-Suero de Caballo 10%, concentración previamente estandarizada en el laboratorio (Rodríguez y col., 2004). Se incubaron a 37°C por 2 horas. Todos los lavados del experimento fueron realizados 3 veces con PBS-Tween 10%.

A continuación se procedió a la dilución de la muestra (1/4, previamente estandarizada en el laboratorio de Inmunoquímica del Instituto de Biomedicina) con la solución de bloqueo e incubadas a 50 µL por pozo en la placa a 37°C por 1 hora (como blanco se tomaron dos pozos con 50 µL de PBS-Suero de Caballo), seguido de este paso se realizaron tres lavados y luego se añadió el conjugado con 100µL por pozo de una solución de conjugado (anti IgA de humano

producido en cabra, marcada con peroxidasa) diluida 1:1000, de acuerdo a lo establecido con la casa comercial que suministra el anticuerpo (SIGMA). Las placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora y luego lavadas tres veces. Posteriormente se procedió a revelar, utilizando 10 mg de O-fenil diamina dicloruro (OPD), diluido en 20 mL de buffer citrato pH 5 y 5 µL peróxido de hidrógeno en oscuridad y a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación se realizó la lectura en un espectrofotómetro para placas de micro titulación BIO-RAD *model 550 microplate reader* a una longitud de onda de 490 nm. Se construyó una curva patrón utilizando como Standard, IgA de calostro comercial de concentración conocida (SIGMA). Los niveles de IgA secretora fueron reportados en unidades de µg/mL

#### **V.4. Determinación de IgA específica contra un extracto crudo de *Shigella flexneri* en saliva:**

Para llevar a cabo los estudios de estimación de anticuerpos IgA anti-*Shigella flexneri* serotipo 2a, se contó con un homogenato de dicha bacteria, el cual fue suministrado por el Laboratorio de Enfermedades Entéricas del Instituto de Biomedicina. Adicionalmente, como control, a cada niño también se le midieron los niveles de anticuerpos IgA anti-*E.coli* no patogénica en saliva (cepa Colección Americana de tejidos y cultivos (ATCC 25922)).

##### **V.4.1. Aislamiento e identificación de una cepa de *Escherichia coli* no patogénica ATCC**

**25922:** Para el proceso de aislamiento se procedió a inocular y crecer la cepa de *E. coli* no patogénica en caldo nutritivo durante toda la noche a 37°C en continuo movimiento, mediante un equipo *Environ-Shaker*. Luego se procedió a sembrar por agotamiento en placas de Agar Nutritivo y placas con medios selectivos y diferenciales Mc Conkey y Levine. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. A continuación se procedió a la identificación de dicha

cepa utilizando diferentes pruebas bioquímicas. Las colonias más grandes y fenotípicamente semejantes a *E. coli*, obtenidas en el sembrado por agotamiento en los medios selectivos y diferenciales, fueron inoculadas en un conjunto de tubos con los siguientes medios: Motilidad Indol Ornitina (MIO), Kligler, ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa. Los tubos fueron incubados a 37°C durante toda la noche. Luego de la caracterización bioquímica e identificación, la cepa de *E. coli* fue puesta a crecer en 10 mL de caldo nutritivo, durante toda la noche a 37°C en continuo movimiento. El cultivo se trasvasó a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a realizar dos lavados con 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS). Se centrifugó bajo las mismas condiciones y descartó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido con 1 mL de PBS y se sometió a 5 ciclos de sonicación (20000 Hz por 30 segundos de sonicación, un minuto de parada y a 4 °C). El sonicado fue centrifugado utilizando una microcentrifugadora eppendorff (Modelo 5424R) a 12000 g por 7 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó con inhibidores de proteasas, hasta su posterior uso a una temperatura de -20 °C. Las mismas condiciones fueron utilizadas para la obtención del extracto crudo de *S. flexneri*.

**V.4.2. Cuantificación de proteínas de un extracto crudo de *Shigella flexneri* y de *E. coli* no patogénica:** para determinar la cantidad de proteínas totales de un extracto crudo de *E. coli* no patogénica y de *Shigella flexneri*, se utilizó un protocolo estándar del método del ácido bicinconínico “BCA Protein Assay” ([www.piercenet.com](http://www.piercenet.com), 2011). Se realizó una curva patrón con diluciones de la proteína estándar, albúmina sérica bovina (BSA), utilizando como diluyente agua y se comparó con la densidad óptica (D.O) obtenida con la muestra problema (**Tabla 3**). Para obtener las D.O respectivas se procedió a agregar en una placa de microtitulación 25µL de la muestra problema con 200 µL del reactivo BCA y se dejó incubando por 30 min a 37°C. La

solución de BCA se obtuvo mezclando 50 partes del reactivo de A con 1 parte del reactivo de B. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro para placas de microtitulación BIO-RAD *model 550 microplate reader* a una longitud de onda de 570 nm.

**Tabla 3. Procedimiento para realizar las soluciones de diferentes concentraciones de la curva de calibración**

Vial	Volumen del diluyente	Volumen de BSA (2000 µg/mL)	Concentración final de BSA
A	0	300 µL	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL	1500 µg/mL
C	325 µL	325 µL	1000 µg/mL
D	175 µL	175 µL del vial B	750 µg/mL
E	325 µL	325 µL del vial C	500 µg/mL
F	325 µL	325 µL del vial E	250 µg/mL
G	325 µL	325 µL del vial F	125 µg/mL
H	400 µL	100 µL del vial G	25 µg/mL
I	400 µL	0	0 µg/mL

Una vez determinada la concentración de dichos extractos, se procedió a cuantificar los niveles de anticuerpos IgA específicos contra un extracto crudo de *Shigella flexneri* en saliva. Fueron estimados por ELISA seguido de un protocolo estándar con algunas modificaciones (Mukhopadhaya y col., 2003). Para ello se utilizaron placas flexibles de polivinilo (FALCON) de 96 pocillos, sensibilizadas con un extracto crudo de *Shigella flexneri* diluido en buffer carbonato-bicarbonato a pH 9.6 mantenidos a 4°C durante toda la noche. Adicionalmente se repitió el mismo protocolo acoplado con una cepa de *E. coli* no patogénica. Debido a que no hay antecedentes de un ensayo preliminar utilizando el extracto crudo de *Shigella flexneri* y *E. coli*

no patogénica, se ensayaron varias concentraciones (1, 2 y 3  $\mu\text{g}$ ), hasta lograr diferenciar los valores positivos de los negativos.

La placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 10% y bloqueada con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de una solución de PBS-Suero de Caballo. Se ensayaron concentraciones de 10% y 20%. Se incubaron a 37°C por 2 horas. Todos los lavados del experimento fueron realizados 3 veces con PBS-Tween 10%. A continuación se procedió a la dilución de la muestra (1/4, debido a que es la dilución óptima reportada por el laboratorio para otros antígenos) con la solución de bloqueo e incubadas a 50  $\mu\text{L}$  por pozo en la placa a 37°C por una hora, seguido de este paso se realizaron tres lavados y luego se añadieron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de solución de conjugado (anti IgA de humano producido en cabra, marcada con peroxidasa) y diluida 1:1000, de acuerdo a lo establecido por la casa comercial que suministra el anticuerpo (SIGMA). Las placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora y luego lavadas tres veces. Posteriormente se procedió a revelar, utilizando 10 mg de O-fenil diamina dicloruro (OPD), diluido en 20 mL de buffer citrato pH 5 y 5  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno en oscuridad y a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación se realizó la lectura en un espectrofotómetro para placas de micro titulación BIO-RAD *model 550 microplate reader* a una longitud de onda de 490 nm.

**V.5. Determinación de proteínas antigénicas de un extracto crudo de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* no patogénica por Western blot:** Los ensayos de Western Blot fueron realizados en el laboratorio de Inmunología Celular del Instituto de Biomedicina y el laboratorio de Bioquímica de Parásitos del Instituto de Medicina Tropical bajo la supervisión de la Dra. Zelandia Fermín. Los componentes proteicos de los extractos crudos de *Shigella flexneri* y de *E. coli* no patogénica fueron separados a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones disociantes y reductoras, acorde con el método utilizado por Schultsz y

colaboradores (1992) con las siguientes modificaciones. La preparación de los geles preparativos, de un 1 mm de espesor, consistió en la mezcla de los compuestos señalados en la

**Tabla 4.**

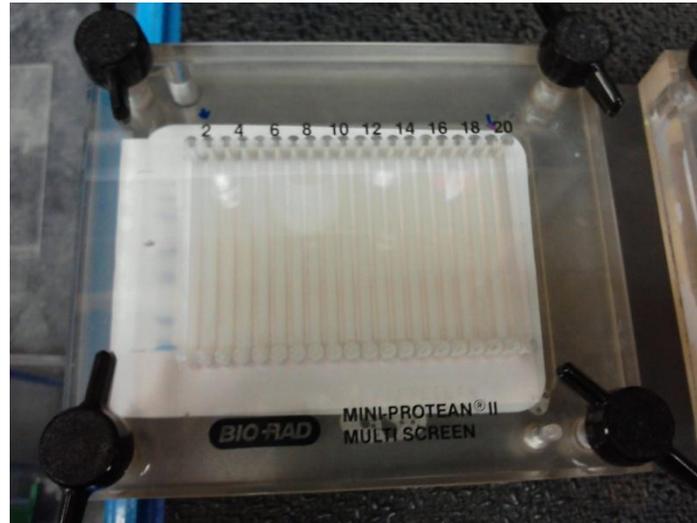
**Tabla 4. Cantidades para realizar las distintas concentraciones de geles en una electroforesis discontinua**

<b>Gel</b>	<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	<b>Acrilamida (30%)</b>	<b>Buffer (mL)</b>	<b>SDS (10%) mL</b>	<b>PSA (10%) mL</b>	<b>TEMED (mL)</b>
Gel de separación (10%)	28,7	23,1	Lower (pH: 8,8): 17,5	0,700	0,350	0,070
Gel de apilamiento	12,2	2,6	Upper (pH: 6,8): 5	0,200	0,100	0,010

Una vez solidificado el gel, se corrió en paralelo tanto la muestra como el marcador de masa molecular (Invitrogen), diluidos en tampón de muestra. Para el marcador de masa molecular se colocaron 8 µL por pozo y para el extracto 644,5 µg de muestra preparada más 4 µL de pironina en el pocillo preparativo. La muestra previamente fue calentada por 5 minutos en baño de maría a temperatura de ebullición. La pironina (0,01%) es un colorante permanente que tiene alta afinidad por el ARN, intercalándose en los pares de bases de los ácidos nucleicos, permitiéndonos visualizar el frente de la corrida electroforética, incluso en la membrana de nitrocelulosa (Davidson y Adams, 1980). La corrida electroforética de una sola dimensión fue llevada a cabo en una cámara de electroforesis (BIORAD), para un gel de 17,4 cm de ancho, la cual fue llenada con buffer de corrida pH 8,3 (15g/L Tris-Base, 72g/L de glicina y SDS (10%) en agua destilada). Se corrió la muestra bajo las condiciones de 25 mA por un tiempo aproximado de 120 minutos (aproximadamente hasta **5,4** cm de largo, del gel de separación), con una fuente de poder (BIORAD). Esta medida fue impuesta simulando las condiciones de largo de un mini-gel. Después de la separación de antígenos por SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a

una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Amersham 0,45 $\mu$ m) en una cámara transferencia (Trans-Blot BIORAD), bajo las condiciones 125 mA por 105 minutos. La cámara de transferencia fue llenada con buffer de transferencia (Tris 3,03 g/L, glicina 14,4 g/L y metanol al 20% en volumen final de 1 L completado con agua destilada). Se evidenció la separación mediante una tinción reversible con Rojo de Ponceau. La membrana fue bloqueada con PBS-Tween 0,1% leche descremada 5%, durante 2 horas en continua agitación. La membrana fue lavada con PBS-Tween 0,05% y guardada en seco durante toda la noche. Con ayuda de un dispositivo (Mini-Protean II, Multi Screen. BIORAD) de volumen 580  $\mu$ L por canal (**Figura 15**), se expuso la membrana a diferentes muestras de saliva de pacientes, diluidas con solución de bloqueo durante 2 horas. Previamente el dispositivo fue lavado vigorosamente con una solución jabonosa y pasado por una solución de cloruro de sodio 1M. La solución de NaCl 1M permitió desplazar cualquier antígeno no específico que permaneciera unido y que pudiera afectar la especificidad de nuestro experimento. El exceso de solución salina fue retirado con agua destilada. Las salivas elegidas para la realización de este estudio, fueron aquellas cuya concentración de IgA-anti *S flexneri* o IgA-anti *E. coli*, cuantificado por la técnica de ELISA, representaba 4 veces el control negativo (niño menor de dos meses). También fueron utilizados como controles negativos las salivas de un niño menor de 2 meses y una saliva de cada una de las comunidades, que representan el menor valor de anticuerpos obtenidos por la técnica de ELISA en esa población. Se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, para eliminar el exceso de saliva con PBS-Tween (0,05%) y se sometió a la membrana a una solución de conjugado (anti IgA de humano producido en cabra, marcada con peroxidasa) a una dilución de 1:2000, en solución de bloqueo, durante 1 hora en continuo movimiento. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno. Luego fue llevado a revelar con la solución del sustrato quimioluminiscente

SuperSignal West Pico (PIERCE) y se obtuvieron las imágenes a través de un equipo de fotodocumentación ChemiDoc XRS system (Bio-Rad), las cuales se analizaron usando el programa IMAGELAB (BIO-RAD).



**Figura 15. Dispositivo (Mini-Protean II, Multi Screen. BIORAD) (volumen de 580 $\mu$ L por canal) utilizado para incubar las diferentes muestras de salivas.**

**NOTA:** Previo al experimento anterior, se ensayaron varias diluciones de salivas al fin de estandarizar las condiciones más convenientes (1/5, 1/10, 1/25). La metodología empleada fue la descrita anteriormente, variando el tamaño del gel (11 cm aproximadamente), la cantidad de muestra colocada en la corrida electroforética (125  $\mu$ L de antígeno y 6  $\mu$ L de marcador de masa molecular), el tiempo de la transferencia (90 minutos) y el dispositivo empleado. El dispositivo utilizado fue uno de menor capacidad, permitiendo colocar un volumen máximo de 68  $\mu$ L por cada canal. Las salivas empleadas para cumplir este objetivos fueron aquellas que presentaron mayores niveles de IgA anti-*S. flexneri* por la técnica de ELISA.

**V.6. Cuantificación de metabolitos estables de NO en saliva:** La cuantificación de metabolitos estables de NO se realizó por el método de detección colorimétrica con el reactivo de Griess. Se realizó una curva de calibración con diferentes diluciones de una solución de  $H_3PO_4$  con una concentración de 14,5mM hasta una solución de concentración 1,563 $\mu$ M. El reactivo de Griess fue preparado con los siguientes compuestos: el ácido sulfanílico (1 % p/p) y el 1-Naftil-Etilendiamina (0,1 % p/p) y diluidos en ácido fosfórico 5%. La cuantificación de metabolitos estables de NO fue realizada en una placa de micro titulación, agregando 100 $\mu$ L de saliva y 100 $\mu$ L del reactivo de Griess. Se dejó incubando 10 minutos en completa oscuridad y se realizó la lectura en un espectrofotómetro para placas de microtitulación BIO-RAD *model 550 microplate reader* a una longitud de onda de 570 nm.

**V.7. Selección de Pruebas estadísticas:** para las comparaciones que corresponden con variables continuas como los valores de IgA secretora total y específica (anti-*S. flexneri* y anti- *E. coli*), así como los niveles de NO para cada una de las comunidades, se utilizó el ANOVA de una vía (Prueba de Tukey), del tipo paramétrico. En aquellas muestras que no pasaron la prueba de normalidad ni la homogeneidad de varianza, se utilizó un ANOVA no paramétrico (Prueba Kruskal-Wallis). Las comparaciones de medias entre el mismo grupo, con respecto a la sintomatología clínica y prevalencia de patógenos intestinales, se llevaron a cabo utilizando pruebas t-student pareadas y no pareadas. Para establecer las correlaciones entre las variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa GraphPad InStat y la realización de las gráficas en el programa Past.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Población estudiada

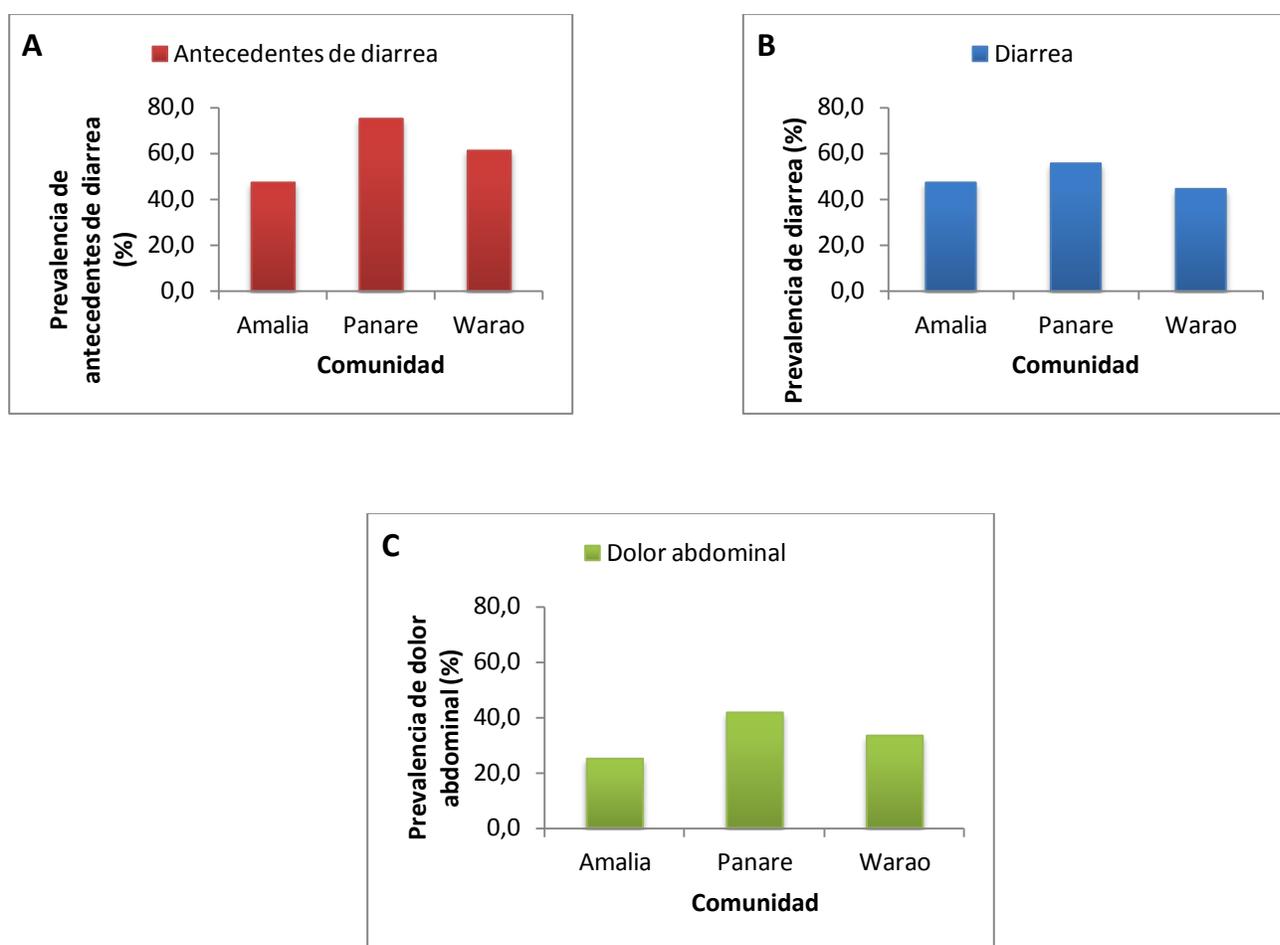
Para cumplir los objetivos de este trabajo se seleccionaron tres grupos de 36 niños escolares provenientes de dos comunidades indígenas de las etnias Warao y Panare, y un grupo urbano proveniente del sector del 23 de Enero. La selección fue completamente aleatoria. A cada grupo se le analizaron diferentes parámetros de acuerdo a su historia clínica. Los parámetros evaluados fueron: sintomatología clínica (antecedentes de diarrea, diarrea y dolor abdominal) e infecciones intestinales causadas por: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuris*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba coli*. Aunque la data clínica proporcionada no evalúa las infecciones causadas por *Shigella* sp, las infecciones intestinales ocasionadas por estos patógenos podrían representar un parámetro que afecte la respuesta inmunológica de las comunidades en estudio.

### VI.2. Prevalencia de infecciones intestinales y sintomatología clínica de las comunidades estudiadas

Se analizó la prevalencia de las infecciones intestinales provocadas por diferentes patógenos en todos los niños de las comunidades estudiadas, encontrándose una elevada prevalencia de *Ascaris lumbricoides* en los niños analizados de la población indígena. Los individuos de la población urbana y la etnia Panare presentaron mayores prevalencia del patógeno *Giardia lamblia*. En estos últimos individuos *Entamoeba coli* también fue frecuente. Los individuos de la etnia Warao presentaron una alta prevalencia del patógeno de *Trichuris trichuris* (**Tabla 5**)

**Tabla 5. Prevalencia de infecciones intestinales ocasionadas por diferentes patógenos en una muestra de población escolar de las comunidades de la etnia Panare y Warao, y de un grupo urbano proveniente del sector 23 de Enero (Escuela Amalia Pellin).**

Patógenos	Prevalencia		
	Amalia Pellin (N= 36)	Etnia Panare (N= 36)	Etnia Warao (N= 36)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	13,9%	<b>36,1%</b>	<b>69,4%</b>
<i>Trichuris trichuris</i>	13,9%	16,7%	<b>58,3%</b>
<i>Giardia lamblia</i>	<b>47,2%</b>	<b>58,3%</b>	19,4%
<i>Entamoeba coli</i>	30,6%	<b>55,6%</b>	36,1%



**Figura 16. Sintomatología clínica asociada a cada una de las comunidades estudiadas.** (A) Los individuos de la comunidad Panare presentaron mayores prevalencias de antecedentes de diarrea, seguido de los individuos de las comunidades Warao y Amalia Pellin. (B) Los individuos de la comunidad Panare presentaron mayores prevalencias de diarrea, seguido de los individuos de las comunidades Amalia Pellin y Warao. (C) Los individuos de la comunidad Panare presentaron mayores prevalencias de dolor abdominal, seguido de los individuos de las comunidades Warao y Amalia Pellin.

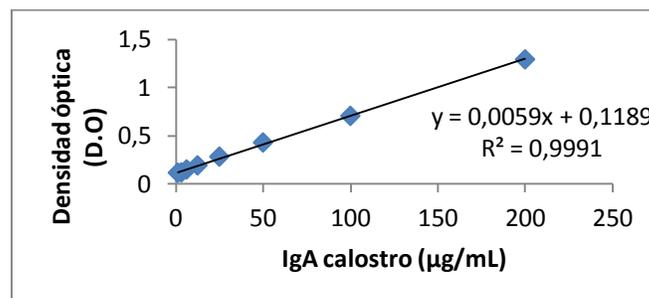
Los mayores valores de prevalencia de niños con síntomas clínicos asociados a las enfermedades intestinales fueron encontrados en los individuos de la etnia Panare, seguida de los individuos de la comunidad Warao y Amalia Pellin (**Figura 16**). Los niños que presentaron cuadros clínicos de diarrea antes de la toma de saliva (antecedentes de diarrea) y dolor abdominal fueron más prevalentes en los niños provenientes de las comunidades indígenas evaluadas con respecto a la urbana (**Figura 16 A y C**). Se observaron prevalencia similares de niños con diarrea en todas las poblaciones (**Figura 16 B**).

### VI.3. Estudio inmunológico

Para evaluar una parte del comportamiento inmunitario de las comunidades analizadas, se realizó un estudio inmunológico para medir los niveles de IgA secretora total en saliva. Luego para evaluar la posible influencia de la respuesta inmune por las infecciones causadas por *S. flexneri*, se midió la producción de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de dicha bacteria. Para lograr este objetivo se necesitó estandarizar una técnica de ELISA.

#### VI.3.1 Medición de los niveles de IgA secretora en saliva

La IgA secretora se reportó en unidades de  $\mu\text{g/mL}$ , debido a la realización de una curva estándar de IgA secretora de calostro (SIGMA). La curva fue realizada en un rango de concentración de 0 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , en el cual presenta linealidad (**Figura 17**).



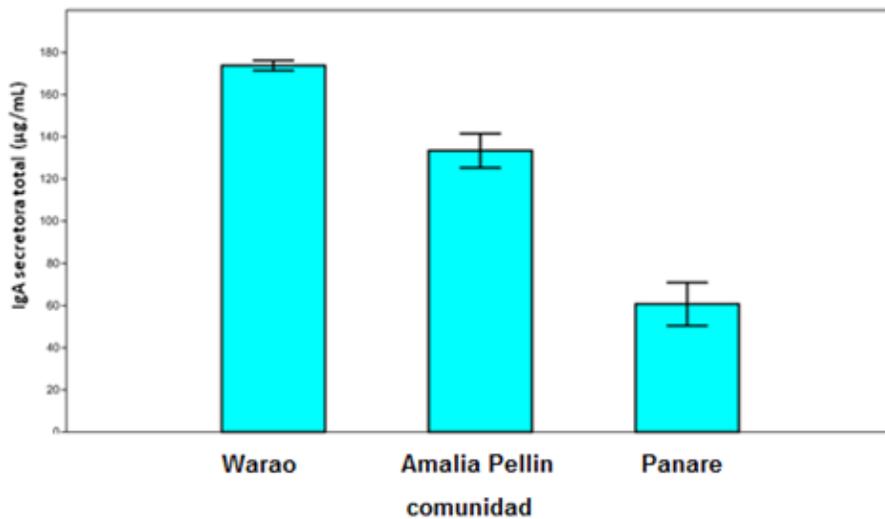
**Figura 17.** Curva de Calibración de IgA secretora, realizada con una IgA secretora de calostro

Los niveles de IgA secretora total en saliva se cuantificaron en 36 niños escolares de cada una de las comunidades, encontrándose diferencias extremadamente significativas entre las poblaciones ( $p < 0,0001$ ), al comparar los valores de las medias. Los individuos de la etnia Warao presentaron mayores niveles de este anticuerpo, seguido de los individuos de la comunidad Amalia Pellin y la etnia Panare. Los resultados se muestran en la **Tabla 6** y en la **Figura 18**.

**Tabla 6. Niveles de IgA secretora total en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela**

IgA secretora total ( $\mu\text{g/mL}$ ). Promedio $\pm$ Desv. Est.	Comunidad		
	Amalia Pellin	Panare	Warao
	133,4 $\pm$ 47,8 (a)	60,7 $\pm$ 61,3 (b)	173,8 $\pm$ 14,3 (c)

(a,b,c) Prueba de Tukey  $p < 0,0001$



**Figura 18. Niveles de IgA secretora total en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela. Se grafica Media  $\pm$  Barra de Error.**

Al relacionar los niveles de IgA secretora total en saliva obtenidos en las diferentes comunidades evaluadas con los parámetros analizados (sintomatología clínica y prevalencia patógenos intestinales), encontramos que los niveles de IgA secretora total en saliva son significativamente más altos cuando los niños se encuentran infectados con *Giardia lamblia* ( $p = 0,0386$ ) y

presentaron un cuadro clínico de diarrea antes de la toma de la saliva (antecedentes de diarrea) ( $p=0,0386$ ) en la comunidad Amalia Pellin (**Tabla 7 y 8**).

En los individuos de la comunidad Panare se encontraron resultados similares con los niños que presentaban infecciones causadas por *Giardia lamblia* ( $p=0,0002$ ) (**Tabla 7**). Los niveles de SIgA fueron significativamente más altos cuando los niños presentaban los síntomas de diarrea ( $p<0,0001$ ) y dolor abdominal ( $p=0,0134$ ) (**Tabla 8**).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la prevalencia de otros patógenos en ningunas de las comunidades evaluadas.

En los individuos de la comunidad Warao no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de SIgA con ningunos de los parámetros analizados.

**Tabla 7. Niveles de de IgA secretora total en saliva de niños que se encuentran infectados o no con *Giardia lamblia***

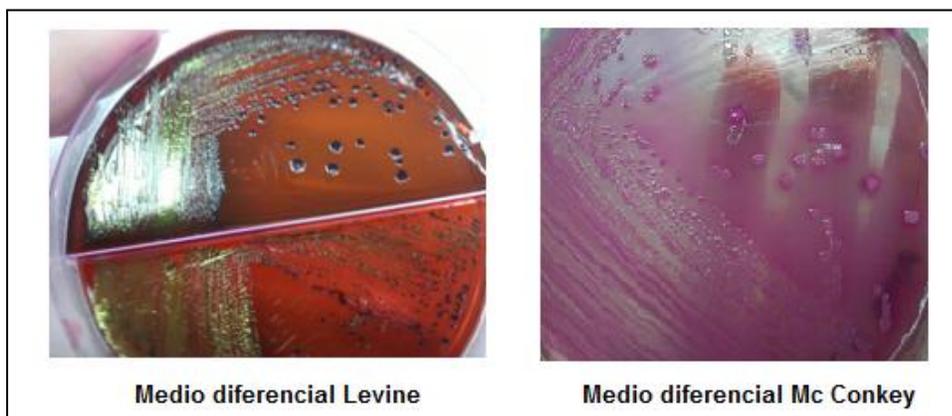
	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora total de niños	
	Con <i>Giardia</i>	Sin <i>Giardia</i>
<b>Amalia Pellin</b>	<b>158,04 <math>\pm</math> 10,23</b>	<b>111,44 <math>\pm</math> 43,66</b>
<b>Panare</b>	<b>88,29 <math>\pm</math> 65,32</b>	<b>22,09 <math>\pm</math> 23,63</b>
<b>Warao</b>	174,91 $\pm$ 3,36	173,55 $\pm$ 15,46

**Tabla 8. Niveles de de IgA secretora total en saliva de niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal)**

	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora total de niños					
	Con antecedentes de diarrea	Sin antecedentes de diarrea	Con diarrea	Sin diarrea	Con dolor abdominal	Sin dolor abdominal
<b>Amalia Pellin</b>	<b>150,86 <math>\pm</math> 42,99</b>	<b>117,86 <math>\pm</math> 48,83</b>	143,84 $\pm$ 48,80	124,15 $\pm$ 46,60	152,95 $\pm$ 49,05	126,94 $\pm$ 47,41
<b>Panare</b>	59,97 $\pm$ 61,53	62,93 $\pm$ 64,26	<b>92,94 <math>\pm</math> 63,56</b>	<b>20,42 <math>\pm</math> 23,11</b>	<b>92,70 <math>\pm</math> 69,65</b>	<b>37,85 <math>\pm</math> 43,17</b>
<b>Warao</b>	173,77 $\pm$ 16,05	173,87 $\pm$ 11,67	175,72 $\pm$ 17,60	172,28 $\pm$ 11,30	174,22 $\pm$ 20,09	173,61 $\pm$ 10,90

**VI.3.2. Estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de *S. flexneri* y su posible control *Escherichia coli*.**

**A. Obtención de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 no patógena:** como se especificó en la metodología, se aisló y se diferenció una cepa de *E. coli* ATCC 25922, a partir del sembrado en medios selectivos y diferenciales. El aislamiento se realizó en los medios Agar Nutritivo, Levine y Mc Conkey. Las colonias presentaron una morfología circular, de apariencia lisa y borde definido en todos los medios, típico de las bacterias de *Escherichia coli*. En el medio Mc Conkey las colonias presentaron un halo rosado, mientras que el medio Levine tuvieron un brillo verde metálico (**Figura 19**). Estas características son debidas a la selectividad de estos medios por las bacterias Gram negativas que degradan la lactosa (Koneman y col., 2008).



**Figura 19. Colonias de una cepa *E. coli* ATCC 25922 sembrada en los medios Levine y Mc Conkey**

Luego del aislamiento, se procedió a su diferenciación a partir de un conjunto de pruebas bioquímicas, mencionadas anteriormente en la metodología. Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

**Tabla 9. Resultado de las pruebas bioquímicas utilizadas para la diferenciación de una cepa de *E. coli* ATCC 25922**

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Característica</b>
<b>Movilidad</b>	(+,+,+) El crecimiento bacteriano ocurrió más allá de la inoculación, indicando una reacción positiva para la movilidad.
<b>Indol</b>	Formación de un halo de color rojo cuando se añadió el reactivo de Kovacs, lo que indica la producción de indol a partir de triptófano.
<b>Ornitina</b>	Presencia de la enzima ornitina descarboxilasa por la coloración del medio en morado.
<b>Kilger</b>	Amarillo/Amarillo: Coloración del medio en amarillo, debido al proceso de fermentación de la glucosa y la lactosa. No hubo producción de sulfuro de hidrógeno. Hubo producción de gases, producto final del metabolismo de la glucosa
<b>Lisina descarboxilasa</b>	(+) Presencia de la enzima lisina descarboxilasa por la coloración del medio en morado. (-) Coloración del medio en verde, indicando que la bacteria no utiliza el citrato como única fuente de carbono.
<b>Citrato de Simomms</b>	

(+) Prueba positiva

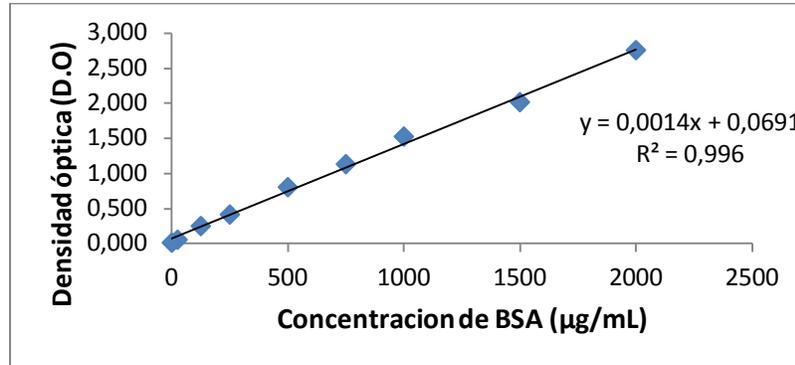
(-) Prueba negativa

Una vez identificada la cepa de *E. coli*, se procedió a crecer dicha cepa en caldo nutritivo. Esto se realizó en continuo movimiento y durante toda la noche.

## **B. Estandarización de la técnica de ELISA**

Para estandarizar la técnica de ELISA frente a un extracto crudo de *S. flexneri*, se midieron los niveles de IgA secretora específicos para 30 muestras de saliva de niños pertenecientes a las comunidades estudiadas. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígenos y solución de bloqueo (PBS-Suero de Caballo). La concentración de proteínas totales del extracto crudo de *S. flexneri* fue de 1985,64 µg/mL. La cuantificación se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) y la realización de una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) (**Figura 20**). Adicionalmente se midieron los niveles IgA secretora frente a un extracto crudo de *E.coli* no patogénica, planteado al momento de la realización del estudio como posible

control negativo. Para ello también se ensayaron diferentes concentraciones de antígenos. La concentración de proteínas fue cuantificada por el mismo método y fue de 1745,64 µg/mL.



**Figura 20. Curva de calibración realizada con BSA para la cuantificación de proteínas mediante el método del BCA.**

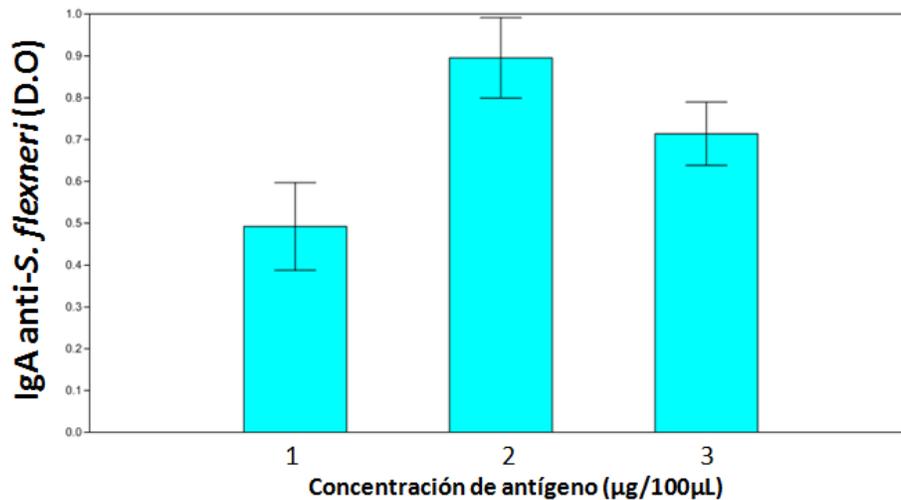
Las concentraciones ensayadas para los antígenos (*S. flexneri* y *E. coli*) fueron de 1, 2 y 3 µg/100µL. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones ensayadas. En las **Figuras 21, 22 y la Tabla 10**, los resultados muestran que para ambos ensayos los mayores niveles de IgA específica resultaron a una concentración de 2 µg/100µL. Si bien, los menores niveles de este anticuerpo se observaron en una concentración de antígeno de 1 µg/100µL, hubo poca diferencia en la absorbancia de los individuos con respecto a la saliva del niño control negativo (saliva de niño menor de 2 meses). En las concentraciones de 2 y 3 µg/100µL estas diferencias si eran marcadas. Además, el blanco obtenido con las tres concentraciones de antígenos ensayadas era aceptable. En base a estos resultados se seleccionó para los sucesivos ensayos una concentración de 2 µg/pozo de antígeno.

**Tabla 10. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* e IgA anti-*E. coli* obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos ensayadas**

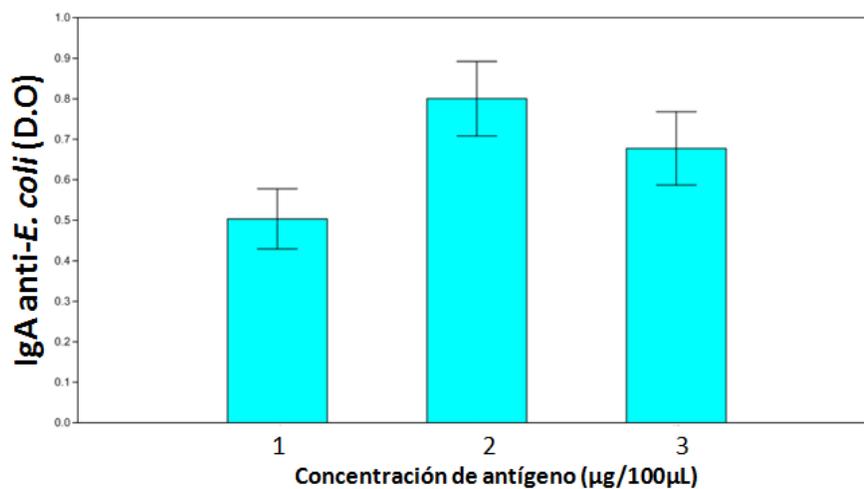
	Concentración de Antígeno		
	1 µg/pozo	2 µg/pozo	3 µg/pozo
<b>IgA anti-<i>S. flexneri</i> (D.O).</b>	0,49 ± 0,39	0,90 ± 0,36	0,71 ± 0,28
<b>Promedio ± Desv. Est.</b>			
<b>IgA anti-<i>E. coli</i> (D.O).</b>	0,50 ± 0,28	0,80 ± 0,34	0,68 ± 0,34
<b>Promedio ± Desv. Est.</b>			

Control negativo *S. flexneri*: 0,099

Control negativo *E. coli*: 0,091



**Figura 21. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos ensayadas. Se grafica Media ± Barra de Error**



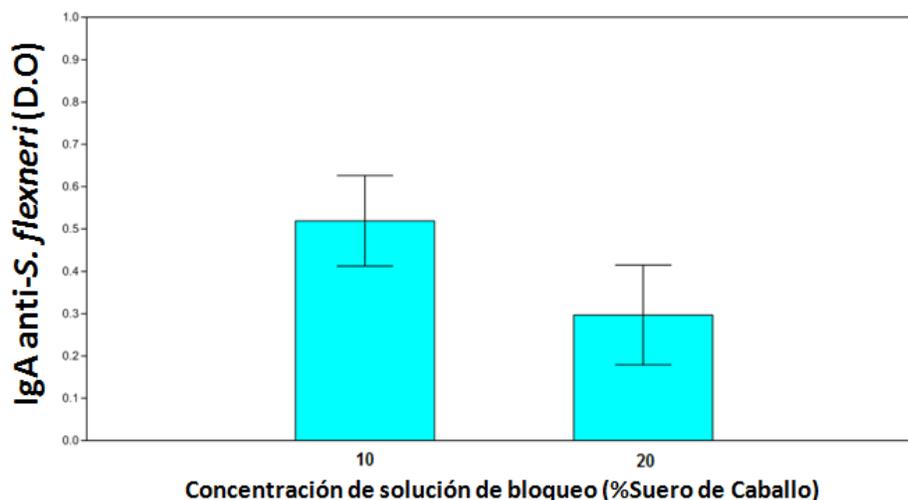
**Figura 22. Niveles de IgA secretora anti-*E. coli* obtenidos para las diferentes concentraciones de antígenos ensayadas. Se grafica Media ± Barra de Error**

Una vez seleccionada la concentración de antígeno para ambos ensayos, se estandarizó la concentración de solución de bloqueo a ser utilizada. Las concentraciones ensayadas fueron 10% y 20% de Suero de Caballo. **La Tabla 11 y la Figura 23** muestran mayores niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* a una concentración de 10%, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas concentraciones. En base a estos resultados y debido a que la solución de bloqueo es bastante costosa se seleccionó para los sucesivos ensayos una concentración de 10 % de Suero de Caballo.

**Tabla 11. Niveles de IgA secretora anti- *S. flexneri* para las diferentes concentraciones de solución de bloqueo (Suero de Caballo) ensayadas**

<b>Solución de Bloqueo (PBS-Suero de Caballo)</b>		
<b>IgA anti-<i>S. flexneri</i> (D.O). Promedio ± Desv. Est.</b>	<b>10% Suero de Caballo</b>	<b>20% Suero de Caballo</b>
	0,52 ± 0,26	0,30 ± 0,29

Control negativo *S. flexneri*: 0,091



**Figura 23. Niveles de IgA secretora anti- *S. flexneri* para las diferentes concentraciones de solución de bloqueo (Suero de Caballo) ensayadas. Se grafica Media ± Barra de Error**

Al comparar los niveles de IgA secretora anti-*S.flexneri* con los niveles de IgA secretora anti-*E.coli* de los 30 niños evaluados en este ensayo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de IgA específica obtenidos mediante el acoplaje de la placa con los distintos extractos. Este resultado sugiere que *E. coli* no puede ser utilizado como control negativo para medir los niveles de IgA anti-*S. flexneri*, por lo que el único control negativo utilizado en los ensayos posteriores fue la saliva de niños menores de 2 meses. Igualmente los niveles de IgA secretora anti-*E.coli* fueron medidos, de tal manera de proporcionar parámetros que intenten explicar el comportamiento inmunológico de las comunidades estudiadas.

Una vez estandarizada dicha técnica se realizó la medición de los niveles de IgA secretora frente a un extracto crudo de *S. flexneri* y *E. coli*.

### **VI.3.3. Medición en saliva de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de *S. flexneri*.**

Los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* se midieron en 36 salivas de niños de cada una de las comunidades estudiadas. Los niveles de IgA específicos frente a *S. flexneri* en los individuos de la comunidad Amalia Pellín fueron significativamente menor que los niveles de IgA anti-*S. flexneri* en los individuos de la comunidad Panare ( $p < 0,05$ ) y la comunidad Warao ( $p < 0,01$ ). Los niveles de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* en los individuos de las comunidades Warao y Panare no presentaron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 12** y **Figura 24**).

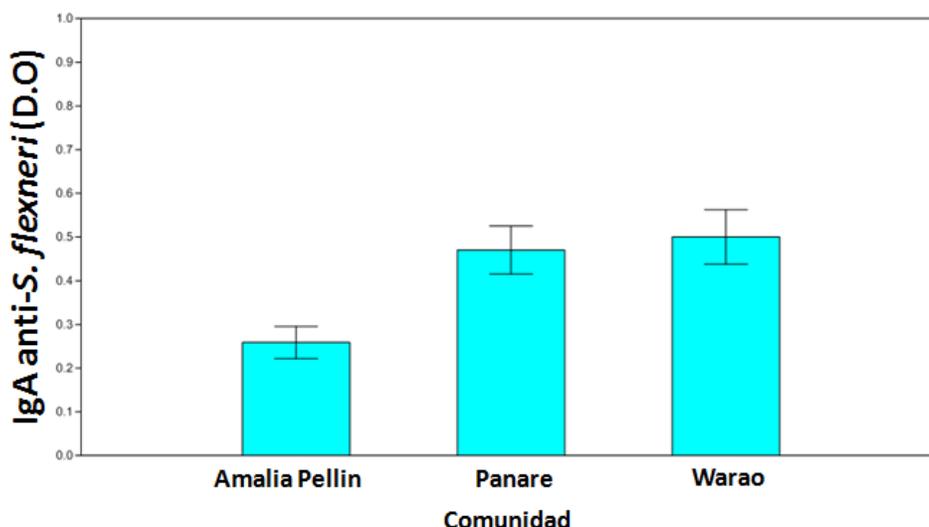
**Tabla 12. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* en diferentes comunidades de Venezuela**

	Comunidad		
	Amalia Pellin	Panare	Warao
<b>IgA anti-<i>S. flexneri</i> (D.O). Promedio ± Desv. Est.</b>	0,26 ± 0,22 (*) (+)	0,47 ± 0,31 (*)	0,50 ± 0,37 (+)

(\*) Prueba Tukey “Amalia Pellin-Panare”  $p < 0,05$

(+) Prueba Tukey “Amalia Pellin-Warao”  $p < 0,01$

**Control negativo *S. flexneri*: 0,117**



**Figura 24. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* en diferentes comunidades de Venezuela.** Se grafica Media  $\pm$  Barra de Error

Al relacionar los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* cuantificados en las salivas de los niños provenientes de las distintas comunidades con los parámetros analizados (sintomatología clínica y prevalencia de patógenos intestinales), encontramos que en los niños de la población de Amalia Pellin los niveles de este isotipo de anticuerpo eran significativamente más altos en los niños que presentaban *Entamoeba coli* ( $p=0,0012$ ) (**Tabla 13**), como también con aquellos que presentaban un cuadro clínico de dolor abdominal ( $p=0,0176$ ) o tuvieron diarrea antes de la toma de saliva (antecedentes de diarrea) ( $p=0,0026$ ) (**Tabla 14**).

En los niños de la comunidad Panare los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* eran significativamente más altos en los niños que presentaban *Entamoeba coli* ( $p<0,0001$ ) y *Giardia lamblia* ( $p=0,0001$ ) (**Tabla 13**), como también con aquellos que presentaban un cuadro clínico de diarrea ( $p<0,0001$ ) o dolor abdominal ( $p=0,0019$ ) (**Tabla 14**).

En los individuos de la comunidad Warao, los niños que presentaban el protozooario *Entamoeba coli*, arrojaron niveles significativamente más altos de IgA secretora anti-*S. flexneri* ( $p=0,0080$ )

(Tabla 13), así como también aquellos niños que tuvieron cuadros clínicos de antecedentes de diarrea ( $p=0,0002$ ), diarrea ( $p<0,0001$ ) o dolor abdominal ( $p<0,0001$ ) (Tabla 14).

**Tabla 13. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* en niños que se encuentran infectados o no con *Giardia lamblia* o *Entamoeba coli* (*Ent. coli*)**

	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> de niños			
	Con <i>Giardia</i>	Sin <i>Giardia</i>	Con <i>Ent. coli</i>	Sin <i>Ent. coli</i>
Amalia Pellin	0,33 $\pm$ 0,32	0,23 $\pm$ 0,30	<b>0,44 <math>\pm</math> 0,28</b>	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,29</b>
Panare	<b>0,66 <math>\pm</math> 0,41</b>	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,24</b>
Warao	0,67 $\pm$ 0,65	0,47 $\pm$ 0,43	<b>0,73 <math>\pm</math> 0,47</b>	<b>0,39 <math>\pm</math> 0,43</b>

**Tabla 14. Niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* en niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal)**

	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora anti- <i>S. flexneri</i> de niños					
	Con antecedentes de diarrea	Sin antecedentes de diarrea	Con diarrea	Sin diarrea	Con dolor abdominal	Sin dolor abdominal
Amalia Pellin	<b>0,36 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,31</b>	0,29 $\pm$ 0,31	0,28 $\pm$ 0,32	<b>0,44 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>0,23 <math>\pm</math> 0,29</b>
Panare	0,48 $\pm$ 0,42	0,45 $\pm$ 0,43	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>0,24 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>0,69 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>0,36 <math>\pm</math> 0,39</b>
Warao	<b>0,66 <math>\pm</math> 0,47</b>	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,33</b>	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,40</b>	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,28</b>	<b>0,89 <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>0,32 <math>\pm</math> 0,35</b>

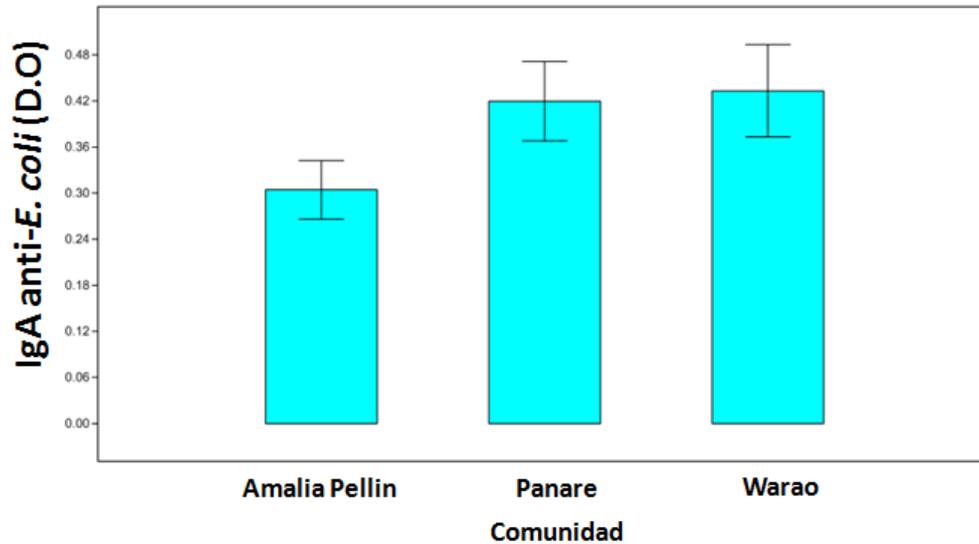
#### VI.3.4. Medición en saliva de los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de *E. coli*.

Los niveles de IgA secretora anti-*E. coli* fueron medidos en 36 salivas de niños de cada una de las comunidades estudiadas. Las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas entre todas las población (Tabla 15 y Figura 25).

**Tabla 15. Niveles de IgA secretora anti-*E. coli* en diferentes comunidades de Venezuela**

	Comunidad		
	Amalia Pellin	Panare	Warao
<b>IgA anti-<i>E. coli</i>(<math>\mu</math>g/mL). Promedio <math>\pm</math> Desv. Est.</b>	0,30 $\pm$ 0,23	0,42 $\pm$ 0,29	0,43 $\pm$ 0,36

Control negativo *E. coli*: 0,205



**Figura 25. Niveles de IgA secretora anti-*E. coli* en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela.** Se grafica Media  $\pm$  Barra de Error

Al relacionar los niveles de IgA secretora anti-*E. coli* en todas las comunidades evaluadas con los parámetros analizados (sintomatología clínica y prevalencia de patógenos intestinales), encontramos que en los individuos de la población Amalia Pellin los niveles de este anticuerpo eran significativamente más altos en los niños que presentaban infecciones causadas por *Giardia lamblia* ( $p=0,0230$ ) y aquellos que presentaban *Entamoeba coli* ( $p=0,0003$ ) (**Tabla 16**), así como también los niños que presentaban los síntomas de dolor abdominal ( $p=0,0155$ ) y los que tuvieron cuadro clínico de diarrea antes de la toma de saliva (antecedentes de diarrea) ( $p=0,0346$ ) (**Tabla 17**).

En los individuos de la comunidad Panare los niños que presentaban *Entamoeba coli* ( $p<0,0001$ ) y *Giardia lamblia* ( $p=0,0003$ ) (**Tabla 16**), arrojaron niveles significativamente más altos de IgA secretora anti-*E. coli*, así como también los niños que presentaron los síntomas de diarrea ( $p<0,0001$ ) o dolor abdominal ( $p=0,0038$ ), (**Tabla 17**).

En los individuos de la comunidad Warao los niveles de IgA secretora anti-*E.coli* fueron significativamente más altos en los niños que presentaban el protozoario *Entamoeba coli*

( $p < 0,0001$ ) (**Tabla 16**), así como los niños que presentaron cuadros clínicos de diarrea ( $p = 0,0008$ ), antecedentes de diarrea ( $p < 0,0001$ ) o dolor abdominal ( $p = 0,0005$ ) (**Tabla 17**).

**Tabla 16.** Niveles de de IgA secretora anti-*E. coli* en saliva de niños que se encuentran infectados o no con *Giardia lamblia* o *Entamoeba coli* (*Ent. coli*)

	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora anti- <i>E. coli</i> de niños			
	Con <i>Giardia</i>	Sin <i>Giardia</i>	Con <i>Ent. coli</i>	Sin <i>Ent. coli</i>
<b>Amalia Pellin</b>	<b>0,41 <math>\pm</math> 0,39</b>	<b>0,24 <math>\pm</math> 0,22</b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,19</b>
<b>Panare</b>	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,29</b>	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>0,16 <math>\pm</math> 0,17</b>
<b>Warao</b>	0,59 $\pm$ 0,53	0,42 $\pm$ 0,43	<b>0,79 <math>\pm</math> 0,39</b>	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,30</b>

**Tabla 17.** Niveles de de IgA secretora anti-*E. coli* en saliva de niños que presentan o no los síntomas clínicos analizados (Antecedentes de diarrea, diarrea o dolor abdominal)

	(Promedio $\pm$ Desv. Est.) IgA secretora anti- <i>E. coli</i> de niños					
	Con antecedentes de diarrea	Sin antecedentes de diarrea	Con diarrea	Sin diarrea	Con dolor abdominal	Sin dolor abdominal
<b>Amalia Pellin</b>	<b>0,41 <math>\pm</math> 0,39</b>	<b>0,23 <math>\pm</math> 0,21</b>	0,37 $\pm$ 0,35	0,29 $\pm$ 0,32	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>0,25 <math>\pm</math> 0,23</b>
<b>Panare</b>	0,44 $\pm$ 0,39	0,39 $\pm$ 0,43	<b>0,63 <math>\pm</math> 0,35</b>	<b>0,23 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,34</b>	<b>0,33 <math>\pm</math> 0,38</b>
<b>Warao</b>	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,47</b>	<b>0,23 <math>\pm</math> 0,25</b>	<b>0,70 <math>\pm</math> 0,45</b>	<b>0,26 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>0,74 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>0,31 <math>\pm</math> 0,37</b>

#### VI.4. Cuantificación de los niveles de NO en las comunidades estudiadas y su posible relación con los niveles de IgA secretora total en saliva

Los niveles de NO en saliva se cuantificaron en cada una de las poblaciones evaluadas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre todas las comunidades (**Tabla 18**). Los resultados demostraron que los mayores niveles de óxido nítrico se encontraron en los individuos analizados provenientes de la comunidad Panare, seguido de los individuos de la comunidad Warao y Amalia Pellin (**Figura 26**).

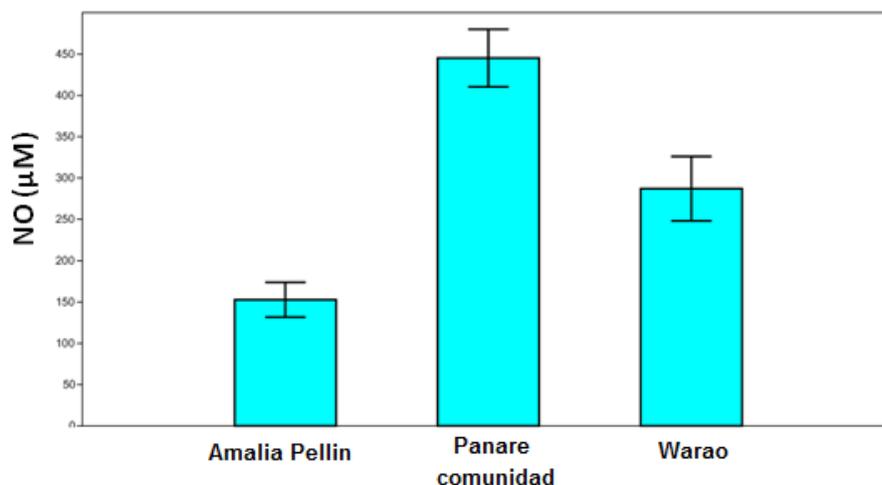
**Tabla 18. Niveles de NO en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela**

	Comunidad		
	Amalia Pellin	Panare	Warao
<b>Niveles de NO (<math>\mu\text{M}</math>). Mediana <math>\pm</math> Desv. Est.</b>	152,82 $\pm$ 114,74(*)(+)	445,23 $\pm$ 208,82(*)(-)	287,21 $\pm$ 233,12 (+)(=)

(\*) Prueba Kruskal-Wallis “Amalia Pellin-Panare”  $p < 0,001$

(+) Prueba Kruskal-Wallis “Amalia Pellin-Warao”  $p < 0,05$

(=) Prueba de Kruskal-Wallis “Panare-Warao”  $p < 0,01$



**Figura 26. Niveles de NO en diferentes comunidades de Venezuela.** Se grafica Media  $\pm$  Barra de Error

Al analizar en conjunto los niveles de IgA secretora total con los niveles de NO, cuantificados en todas las comunidades, encontramos que las variables poseen una correlación inversa ( $r = -0,3611$ ;  $p < 0,0002$ ). Se encontró una baja correlación al analizar las variables por comunidad (Amalia Pellin:  $r = 0,1840$ ;  $p < 0,05$ , Panare  $r = -0,4481$ ;  $p = 0,0061$ , Warao  $r = 0,04690$ ;  $p < 0,05$ ), siendo inversa sólo en las comunidades indígenas evaluadas. Es importante destacar que la correlación tanto con la comunidad Panare como la global resultó en un “r” negativo, lo que implica que al aumento de una disminuye el valor de la otra. En las comunidades Warao y Amalia Pellin resultó en un “r” positivo por lo que el aumento de una lleva al aumento de la otra.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de los niveles de NO con ninguna sintomatología clínica analizada ni la prevalencia de patógenos intestinales.

#### **VI.5. Estandarización del ensayo de Western blot en el reconocimiento de las bandas antigénicas de un extracto crudo de *S. flexneri* y *E. coli* por parte de la SIgA en saliva de niños.**

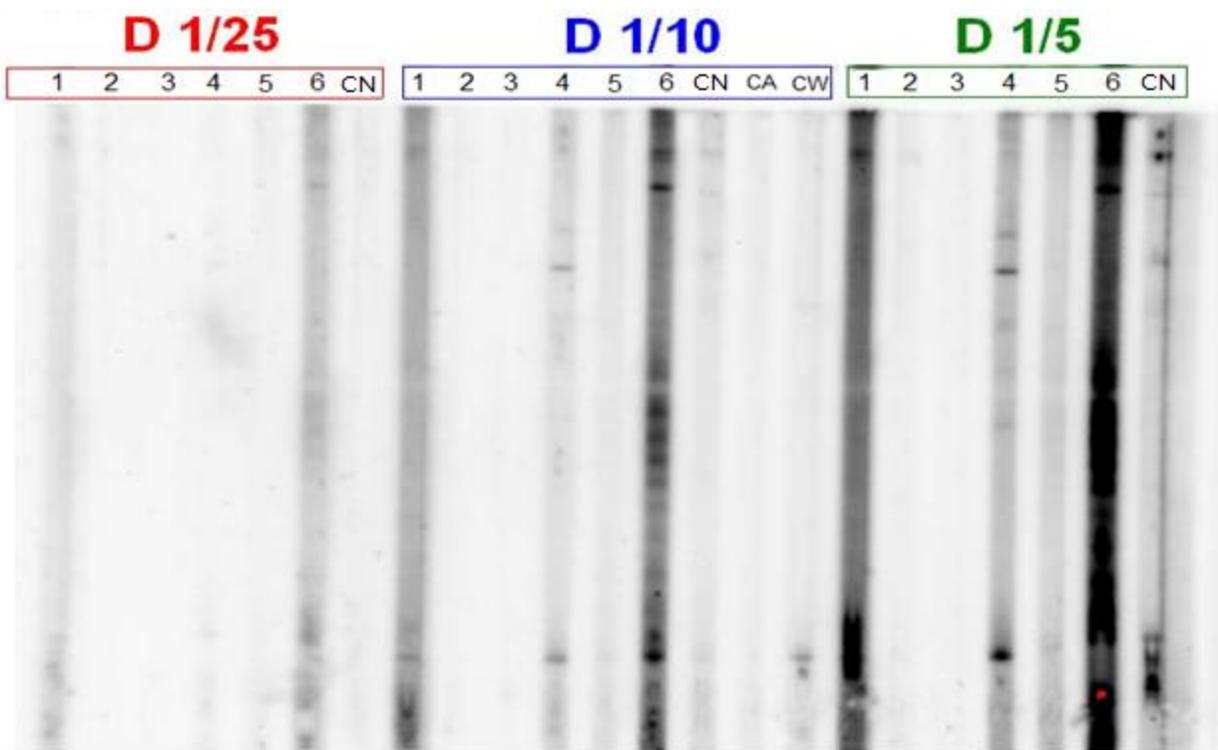
Debido a la importancia del extracto crudo de *S. flexneri* y también de *E. coli* de presentar proteínas que son capaces de ser detectadas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva en los individuos de las comunidades estudiadas, se procedió a determinar su masa molecular mediante el ensayo de Western blot. Es importante resaltar que este objetivo no fue planteado al inicio del proyecto (**ver página 31**).

##### ***A. Estandarización de la saliva utilizada***

Para probar la dilución apropiada de la saliva para este experimento, las proteínas de un extracto crudo de *S. flexneri* fueron analizadas por electroforesis en condiciones disociantes y reductoras (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a un papel de nitrocelulosa. El proceso de bloqueo, lavado y revelado fue igual a lo planteado en la metodología.

La membrana fue colocada en un dispositivo Mini-Blotter de capacidad 68 µL por cada canal, para la incubación de las salivas. El número de canales totales del dispositivo es de 33. Las diluciones de las salivas ensayadas fueron 1/5, 1/10 y 1/25. El número de salivas probadas para el ensayo fue de 7, siendo seleccionadas aquellas que dieron los valores de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* más altos por la técnica de ELISA. También se probaron tres salivas controles negativos, dos de muestras de las comunidades Warao y Amalia Pellin y uno a la saliva de un niño menor de 2 meses. Las salivas controles negativos pertenecientes a las comunidades antes

mencionadas, fueron seleccionadas, debido a que fue el mínimo nivel de anticuerpo IgA anti-*S. flexneri* obtenido por la técnica de ELISA. La imagen obtenida a través del equipo ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) se muestra en la **Figura 27**.



**Figura 27. Resultados del Western blot de las proteínas de un extracto crudo de *S. flexneri* expuesto a diferentes diluciones de salivas de niños escolares venezolanos. D 1/25:** Dilución 1/25, **D 1/10:** Dilución 1/10, **D 1/5:** Dilución 1/5. **Canal 1-6:** Muestras de salivas ensayadas que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **CN:** Saliva de un niño menor de 2 meses utilizado como control negativo. Canal **CA:** Saliva de un niño control negativo perteneciente a la comunidad Amalia Pellin. Canal **CW:** Saliva de un niño control negativo perteneciente a la comunidad Warao.

Los resultados mostrados en la **Figura 27** permitieron detectar que hubo un menor reconocimiento por los anticuerpos presentes en la saliva de los niños, independientemente del tiempo de exposición, cuando se utilizó la dilución de la saliva 1/25, por lo que esta dilución fue descartada. En la dilución 1/5 en un tiempo corto de exposición los niños con un bajo reconocimiento eran fácilmente observables (Canal 4 y CN). Las proteínas que tenían un alto

reconocimiento por los anticuerpos presentes en la saliva de los niños (Canal 6), se saturaban rápidamente en el mismo tiempo de exposición. La saturación de estas bandas en un corto tiempo de exposición, hace que sea complicada la determinación de las masas moleculares a través del programa, por lo que parte de la información podría perderse. En base a este resultado, esta dilución fue descartada para los ensayos futuros. En la dilución 1/10, los niños que tenían un alto reconocimiento (Canal 6) podían diferenciarse en un corto tiempo de exposición, mientras que los tiempos de exposición más prolongados podían diferenciar los niños con un bajo reconocimiento. Este resultado nos sugiere que la dilución adecuada para los experimentos a realizar es 1/10. Adicionalmente, el dispositivo Mini-Blotter utilizado para la estandarización de la saliva, fue uno de baja capacidad (68µL por cada canal), por lo que las diluciones más altas (1/25 o 1/10) disminuyen la probabilidad de la toma de anticuerpos específicos contra las proteínas de la bacteria de interés. Debido a esto, se procedió a repetir el mismo protocolo con un dispositivo Mini-Blotter de mayor capacidad (580 µL por cada canal), manteniéndose la dilución óptima encontrada (1/10).

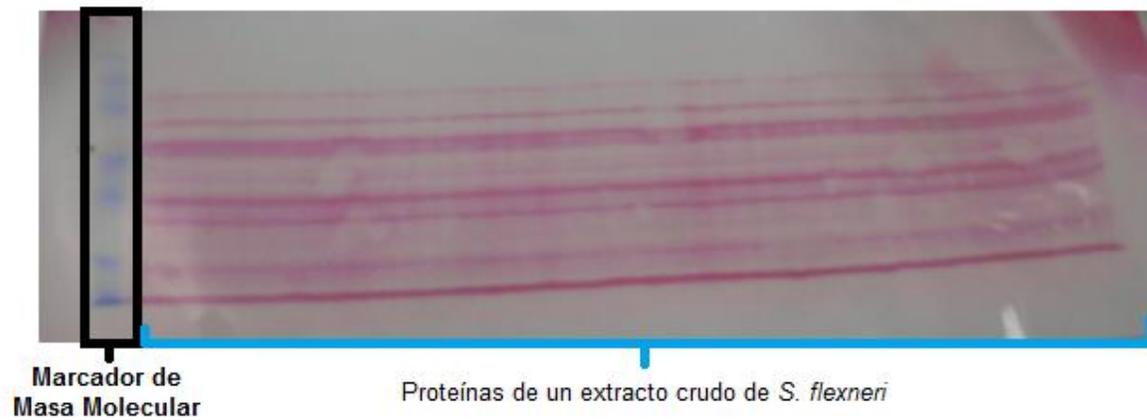
***B. Determinación de la masa molecular de las proteínas antigénicas presentes en un extracto crudo de *S. flexneri* y *E. coli*, que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de diferentes comunidades de Venezuela***

Las muestras seleccionadas para llevar a cabo este objetivo, fueron aquellas que dieron en ELISA valores de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* e IgA anti-*E. coli* 4 veces por encima del control negativo. Adicionalmente se probaron salivas controles negativos de cada una de las comunidades, las cuales fueron aquellas que dieron el mínimo valor de anticuerpos obtenidos por la técnica antes mencionada. Se mantuvo como control negativo para todas las poblaciones, la

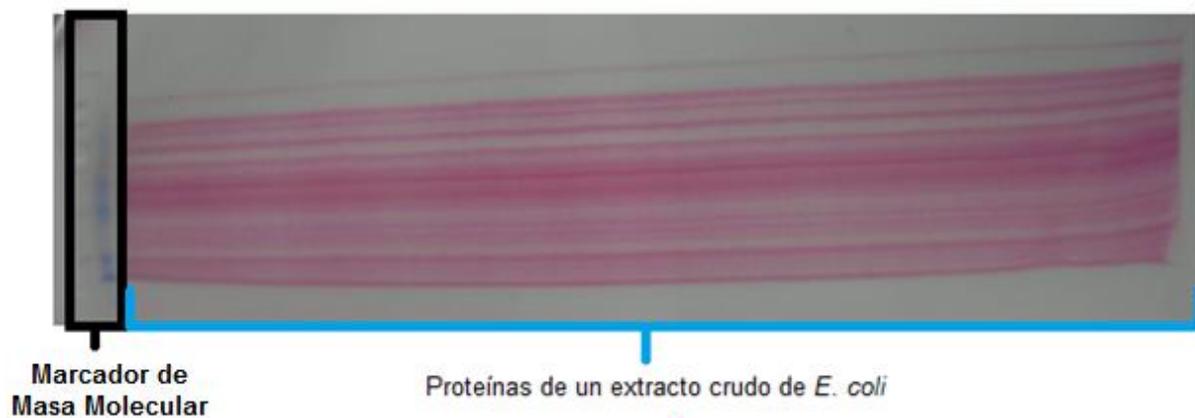
saliva de un niño menor de 2 meses. El número de salivas totales ensayadas para los dos extractos (*E. coli* y *S. flexneri*) fue de 23 positivos más 4 controles negativos.

De acuerdo a lo planteado con la metodología se separaron las proteínas del extracto crudo de *S. flexneri* y *E. coli*, en un gel SDS-PAGE al 10%.

Una vez separadas las proteínas por electroforesis se electrotransfieron a una membrana de nitrocelulosa con las mismas dimensiones. La membrana fue teñida con una coloración reversible con Rojo de Ponceu (**Figuras 28 y 29**)



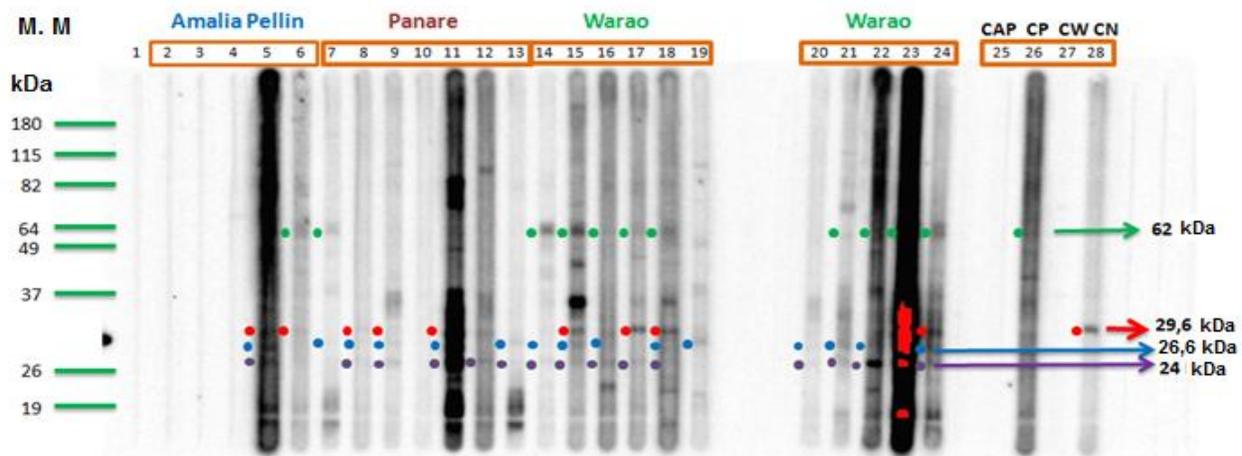
**Figura 28. Tinción de una transferencia de proteínas de un extracto crudo de *S. flexneri* separadas electroforéticamente.**



**Figura 29. Tinción de una transferencia de proteínas de un extracto crudo de *E. coli* separadas electroforéticamente.**

Los resultados de las **Figuras 28 y 29** muestran que efectivamente hubo una adecuada transferencia, por lo que las condiciones planteadas en la metodología (tiempo y voltaje) fueron las adecuadas para este experimento.

El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue cortado a la mitad y colocado en dos dispositivos Mini-Blotter, debido a que las muestras de salivas que fueron analizadas superan la cantidad de pozos presente en un dispositivo. El dispositivo Mini-Blotter utilizado en este ensayo fue de mayor capacidad (580  $\mu$ L por cada canal) y el número de canales totales presente en cada uno de ellos es de 24. Luego de la incubación de las salivas, las membranas fueron tratadas con el anticuerpo secundario (Sigma - IgA de cabra anti IgA humana). Por último, se realizó el revelado de las mismas por 2 minutos con la mezcla de 1:1 de la solución A y B del kit comercial SuperSignal West Pico (Pierce), luego de esta exposición se colocaron las membranas lo más juntas posibles en un papel de acetato, eliminándose el exceso de la solución de revelado. La membrana de acetato fue forrada en papel envoplast, evitando en todo lo posible la formación de burbujas que podrían interferir con la toma de la imagen. Las imágenes fueron obtenidas en un equipo ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) por varios tiempos de exposición.



**Figura 30.** Registro digital de Western blot de las proteínas de un extracto crudo de *S. flexneri* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de localidades urbanas y rurales de

**Venezuela. M.M:** Marcador de masa molecular. En **rojo** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 29,6 kDa, en **verde** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 62 kDa, en **azul** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 26,6 kDa, en **morado** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 24 kDa. **Canal 2-6:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Amalia Pellin que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 7-13:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Panare que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 14-24:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Warao que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 25 (CAP):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Amalia Pellin. **Canal 26 (CP):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Panare. **Canal 27 (CW):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Warao. **Canal 28 (CN):** Saliva de un niño menor de 2 meses utilizado como control negativo.

En la **Figura 30** se muestran las masas moleculares estimadas de las proteínas del extracto crudo de *S. flexneri* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de localidades urbanas y rurales de Venezuela. Las proteínas detectadas que presentaron mayor reconocimiento fueron aquellas que presentaron una masa molecular estimada de 62; 29,6; 26,6 y 24 kDa. El porcentaje de reconocimiento de estas proteínas, fue calculada dividiendo el número de bandas encontradas de una proteína, entre el número total de individuos analizados por Wester blot, por 100. El porcentaje de reconocimiento de estas proteínas para cada comunidad, fue calculada dividiendo el número de bandas que se detectaron de esta proteína en esa población, entre el número total de niños evaluados en esa comunidad, por 100. El mismo cálculo fue realizado para el análisis de Western blot de las proteínas del extracto crudo de *E. coli*. En las muestras de salivas de niños provenientes de la comunidad Amalia Pellin, la proteína que tuvo una mayor frecuencia de reconocimiento, con un 40%, fue la de 29,6 kDa, mientras que en las salivas de los niños provenientes de las etnias Panare y Warao reconocieron mayoritariamente las proteínas de 26,6 y 24 kDa (**Tabla 19 y Figura 31**). En los individuos evaluados de la comunidad Warao también hubo una mayor frecuencia de reconocimiento de la proteína de 62kDa (81,8%). En la población en conjunto fueron reconocidas principalmente las

proteínas con una masa molecular estimada de 26,6 y 24 kDa (69,5 y 65,2%, respectivamente) (Tabla 19 y Figura 31)

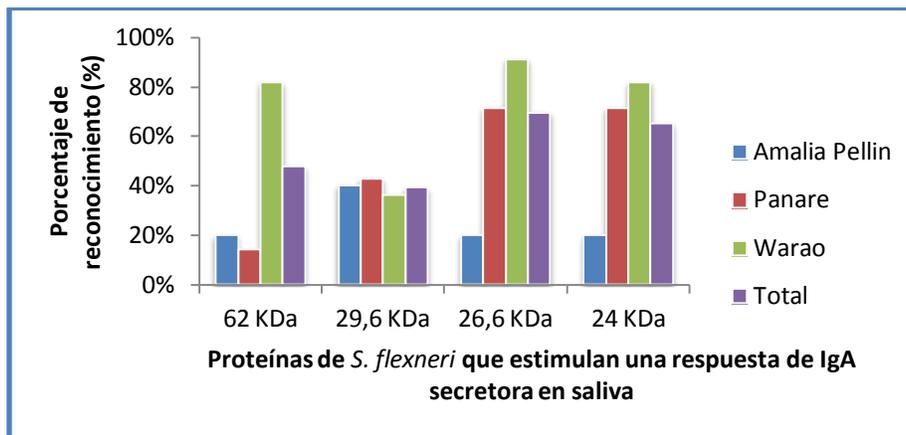
La saliva del individuo control negativo utilizado en la comunidad Panare presentó un alto reconocimiento, mientras que los controles negativos utilizados en la comunidad Amalia Pellin y Warao presentaron congruencia con los resultados obtenidos por el método de ELISA (Figura 30).

En los carriles 2, 3 y 4, correspondiente a salivas de individuos de la comunidad Amalia Pellin, no presentaron ningún reconocimiento.

**Tabla 19. Porcentaje de reconocimiento de las proteínas, de un extracto crudo de *S. flexneri*, que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños urbanos y rurales de Venezuela.**

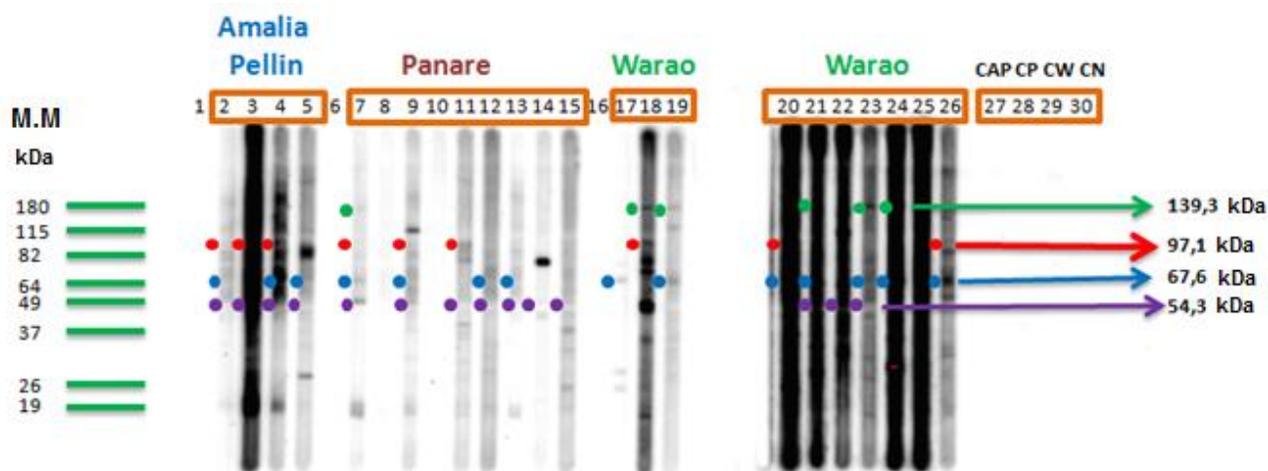
Comunidad	Masa molecular de las proteínas de <i>S. flexneri</i> que son reconocidas por la IgA secretora en saliva			
	62 kDa	29,6 kDa	26,6 kDa	24 kDa
Amalia Pellin	20%	40%	20%	20%
Panare	14,3%	42,8%	71,4%	71,4%
Warao	81,8%	36,4%	90,9%	81,8%
<b>Total</b>	47,8%	39,13%	69,5%	65,2%

**Rojo:** El porcentaje de las proteínas con mayor frecuencia reconocidas en cada población. **Verde:** El porcentaje de las proteínas con mayor frecuencia reconocidas en toda la población.



**Figura 31. Principales proteínas de un extracto crudo de *S. flexneri* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños urbanos y rurales de Venezuela**

En la **Figura 32** se muestran los resultados de la transferencia e inmunoblot de las masas moleculares de las proteínas de un extracto crudo de *E. coli* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de localidades urbanas y rurales de Venezuela.



**Figura 32. Registro digital de Western blot de las proteínas de un extracto crudo de *E. coli* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños de localidades urbanas y rurales de Venezuela.** M.M: Marcador de masa molecular. En **rojo** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 97,1 kDa, en **verde** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 139,3 kDa, en **azul** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 67,6 kDa, en **morado** se detallan las bandas correspondientes a la proteína de masa molecular de 54,3 kDa. **Canal 2-5:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Amalia Pellin que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 7-15:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Panare que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 17-26:** Muestras de salivas correspondientes a los niños de la comunidad Warao que resultaron positivas en el ensayo de ELISA. **Canal 27 (CAP):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Amalia Pellin. **Canal 28 (CP):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Panare. **Canal 29 (CW):** Saliva de un niño control negativo correspondiente a la comunidad Warao. **Canal 30 (CN):** Saliva de un niño menor de 2 meses utilizado como control negativo.

Las proteínas que presentaron una mayor frecuencia de reconocimiento fueron aquellas que tuvieron una masa molecular estimada de 139,3; 97,1; 67,6 y 54,3 kDa (**Figura 32**). Las muestras de los individuos pertenecientes a la comunidad Amalia Pellin, reconocieron en su

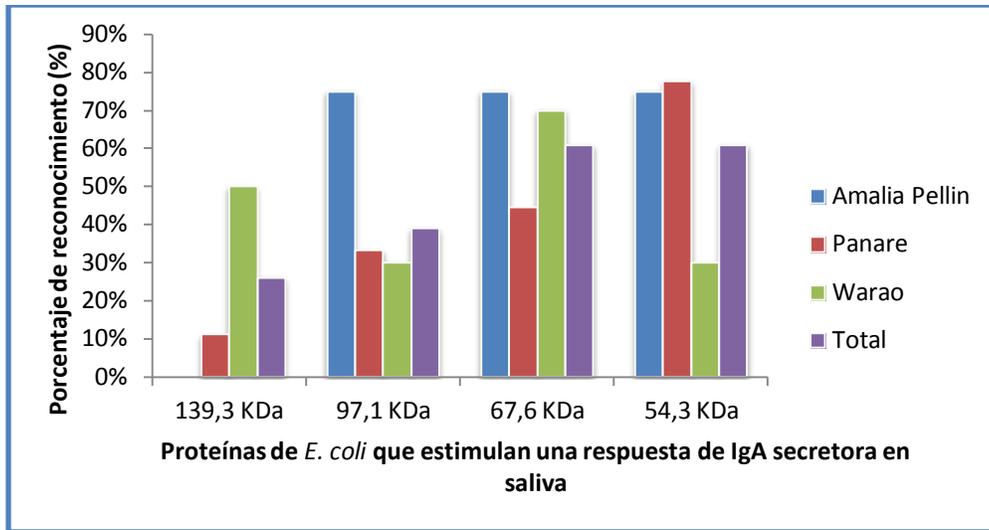
mayoría las proteínas de 97,1; 67,6 y 54,3 kDa (con una frecuencia de 75% para todos los casos). En el caso de las muestras de los niños de la etnia Panare, la proteína que presentó una mayor frecuencia de reconocimiento fue la de 54,3 kDa, mientras que en la etnia Warao fue la de 67,6 kDa. En todos los niños analizados, las proteínas que eran reconocidas en mayor frecuencia por los anticuerpos IgA secretora en saliva, fueron las de 54,3 y 67,6 kDa, mientras que la proteína que fue menos reconocida por los anticuerpos IgA específicos presentes en la saliva de los individuos, fue la de 139,3 kDa (**Tabla 20 y Figura 33**).

Los controles negativos para cada una de las poblaciones analizadas, tuvieron un menor reconocimiento, lo que es congruente con los resultados obtenidos por la metodología de ELISA (**Figura 32**). En ambos ensayos de Western blot, la saliva de un niño menor a dos meses utilizado como control negativo, presentó un bajo reconocimiento, lo que significa que el control seleccionado fue el adecuado para el desarrollo de dicha metodología (**Figura 30 y 32**).

**Tabla 20. Porcentaje de reconocimiento de las proteínas, de un extracto crudo de *E. coli*, que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños urbanos y rurales de Venezuela**

Comunidad	Masa molecular de las proteínas de <i>E. coli</i> que son reconocidas por la IgA secretora en saliva			
	139,3 kDa	97,1 kDa	67,6 kDa	54,3 kDa
Amalia Pellin	0%	75%	75%	75%
Panare	11,11%	33,33%	44,44%	77,77%
Warao	50%	30%	70%	30%
<b>Total</b>	26,09%	39%	60,9%	60,9%

**Rojo:** El porcentaje de las proteínas con mayor frecuencia reconocidas en cada población. **Verde:** El porcentaje de las proteínas con mayor frecuencia reconocidas en toda la población.



**Figura 33. Principales proteínas de un extracto crudo de *E. coli* que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora secretora en saliva de niños urbanos y rurales de Venezuela**

## VII. DISCUSIÓN

Las infecciones intestinales constituyen un problema de salud a nivel mundial, afectando principalmente a los niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo. Tanto los niños escolares como preescolares en la zonas rurales de nuestro país se encuentran expuestos a infecciones intestinales provocadas por distintos patógenos, entre los que destacan *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura* y ancylostomídeos, así como *Giardia lamblia* y otros parásitos intestinales (Hagel y col., 2001; Martínez y Batista, 2011). La alta frecuencia y la intensidad de estas infecciones se encuentran asociadas a la pobreza y a las limitadas condiciones de higiene, así como también a algunos factores intrínsecos del individuo que juegan un papel fundamental (Hagel y col., 2001; Marcos y col., 2003).

En este trabajo se encontraron valores de prevalencia similares de estos parásitos intestinales a los reportados en otras investigaciones previas, siendo elevados principalmente en los individuos de las comunidades indígenas evaluadas (**Tabla 5**). La prevalencia de *Ascaris lumbricoides* en los niños de la comunidad Warao fue similar a la reportada por Hagel y colaboradores (2001), al igual que la prevalencia menor de este parásito y de *Trichuris trichura* encontrada en los niños del ambiente urbano (Escuela Amalia Pellin). Sin embargo, otros estudios realizados por el mismo autor han reportado prevalencias similares de este parásito al comparar diferentes poblaciones de niños rurales con niños indígenas Warao, pertenecientes a comunidades rurales del país, concluyendo que los niños de las poblaciones indígenas de Venezuela no constituyen las principales comunidades afectadas por esta problemática (Hagel y col., 2005). La alta presencia encontrada de *Entamoeba coli* en los individuos de la población Panare, concuerda con el trabajo reportado por Devera y colaboradores (2005), donde tuvieron una prevalencia de 58,8% en los individuos de la comunidad Pupu Yamu, una etnia indígena ubicada en el

municipio autónomo de la Gran Sabana, al sur del estado Bolívar. Se ha sugerido que la alta prevalencia de parasitosis en los niños presentes en el medio rural se debe a las condiciones higiénicas limitantes y es independiente del origen étnico de los distintos grupos de niños que se han evaluado hasta ahora en el país. La desigualdad de las prevalencias encontradas en los niños de la población indígena y urbana pueden deberse tanto a factores ambientales como a características propias del individuo, entre los que se destacan: sistema inadecuado para la eliminación de excretas, poca disponibilidad de agua potable, una mala nutrición, los malos hábitos higiénicos-sanitarios y poca capacidad para generar una respuesta inmunitaria (Martínez y Batista, 2011). En los individuos de las comunidades indígenas evaluadas en este trabajo dominó el poli-parasitismo.

En los niños de la comunidad Amalia Pellin se encontró una prevalencia mayor del patógeno *Giardia lamblia* (**Tabla 5**). Su alta prevalencia puede estar relacionada con los factores que predisponen a esta parasitosis, como el consumo de agua no tratada y la presencia de inadecuados hábitos de higiene (Martínez y Batista, 2011). Estos parásitos pueden persistir aunque existan condiciones sanitarias adecuadas, debido a que su principal vía de transmisión es oro-fecal, mediante la ingesta de alimentos o agua contaminada con materia fecal, donde se encuentran las formas evolutivas infectantes (Díaz y col., 2006). Se han reportado resultados similares en poblaciones urbanas en diferentes zonas del mundo y de Venezuela (Rivera, 2011; Morales y col., 1999). En los niños de las etnias indígenas de Venezuela, las infecciones causadas por este patógeno son frecuentes y generalmente vienen acompañadas por una baja prevalencia de helmintos, este resultado es similar al encontrado en los individuos de la comunidad Panare. Esto pudiera deberse a que estos niños recibieron con tratamientos anti-helmínticos antes de la realización de este estudio, sin haber recibido tratamiento para

protozoarios, coincidiendo con algunos autores que reportan un incremento de la prevalencia de *Giardia* sp en aquellos niños que reciben tratamiento anti-helmíntico (Rousham, 1994).

La mayoría de los niños con infecciones entéricas son asintomáticos, sin embargo en algunos casos pueden desarrollarse manifestaciones clínicas, que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y mala absorción intestinal (Martínez y Batista, 2011., Espinosa, y col., 2011). Las manifestaciones clínicas gastrointestinales como el dolor abdominal y la diarrea fueron altamente frecuentes en los niños provenientes de las comunidades indígenas evaluadas, en las cuales se encontró una alta tasa de parasitosis (**Figura 16**). Estos síntomas son generalmente atribuidos por otros autores a la presencia de parásitos intestinales (Devera y col., 2005; Escobedo y col., 2008). En los individuos de la población urbana, la presencia de estos síntomas puede deberse a la alta parasitosis ocasionada por *Giardia lamblia*, y varios autores concuerdan que las infecciones ocasionadas por este patógeno están asociadas con náuseas, vómitos, mala absorción de nutrientes, diarrea y dolor abdominal (Corteguera, 2008).

Para evaluar la respuesta inmunitaria humoral mediada por IgA secretora a nivel de la mucosa de las comunidades estudiadas, se midieron los niveles de IgA secretora total en saliva; encontrándose niveles significativamente más altos de este anticuerpo en los individuos de la comunidad Warao, seguido de los individuos de la población Amalia Pellin y la etnia Panare (**Figura 18**). Los bajos niveles de este anticuerpo en los individuos Panare podrían atribuirse a las deficiencias nutricionales, que ya se han reportado que disminuyen los niveles de anticuerpos IgA secretora total (Ortiz y col., 2000). En concordancia con esto, trabajos realizados por Infante y colaboradores (2008) ha demostrado que la incorporación de comedor escolar a las escuelas rurales de Venezuela han mejorado significativamente los niveles de este anticuerpo. Por otra parte, algunas propiedades intrínsecas de la población tales como: constitución genética e

inmunológica, podrían desempeñar un rol importante en la susceptibilidad del individuo frente a las infecciones intestinales (Ortiz y col., 2000). En los individuos de la comunidad Warao se encontraron altos niveles de este anticuerpo, coincidiendo con lo reportado por Hagel y colaboradores (2005), quienes encontraron que grupos de niños parasitados de esta misma etnia presentan niveles de anticuerpos IgE frente a parásitos intestinales elevados, similares a los encontrados en niños parasitados de otras comunidades rurales de Venezuela indicando que el desarrollo de estas respuestas en estos niños no depende de factores inherentes a la etnia. Además han mostrado ser productores eficientes de IgE total en suero, lo que podría sugerir que son buenos productores de otros tipos de inmunoglobulinas como la IgA secretora en saliva (Hagel y col., 2006).

Los niveles de IgA secretora total en saliva en aquellos niños que se encontraban parasitados con *Giardia lamblia* (**Tabla 7**) fueron significativamente más altos en los niños de las comunidades Amalia Pellin y Panare, coincidiendo con estudios anteriores donde evidencian que las infecciones causadas por este protozoario estimulan la producción de SIgA a partir de los 4 años de edad (Noemí y col., 1981). Otros estudios confirman un aumento de la IgA secretora total en saliva en los niños infectados por este protozoario, sugiriendo que estas infecciones estimulan la producción de esta inmunoglobulina (Rodríguez y col., 2004). Con este trabajo podemos inferir que posiblemente los niños infectados por este parásito podrían hallarse en fase avanzada, en la cual la respuesta humoral pudo ser establecida, causando un aumento de los niveles de anticuerpos totales, preservando así la homeóstasis del individuo.

Al comparar los niveles de IgA secretora total de los individuos sintomáticos con los asintomáticos, encontramos que los niveles de estos anticuerpos eran significativamente más altos en los niños con dolor abdominal en la comunidad Amalia Pellin y en los niños tanto con

dolor abdominal y diarrea en la etnia Panare (**Tabla 8**). Estos resultados podrían sugerir que los síntomas son provocados por patógenos intestinales que estimulan la producción de IgA secretora en la mucosa, coincidiendo con algunos autores que han encontrado que las infecciones causadas por protozoarios provocan el aumento de la IgA secretora (Rodríguez y col., 2004).

Para medir la capacidad antigénica del extracto crudo de *S. flexneri*, se midieron los niveles de IgA secretora específica frente a este extracto. Para este propósito se estandarizó un ensayo de ELISA, siendo la concentración óptima de antígeno  $2\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  (**Figura 21**). La solución de bloqueo utilizada fue PSB-Suero de Caballo, encontrándose una concentración óptima de 10% (**Figura 23**). Al momento de la realización del estudio, se planteó tomar como control negativo los niveles de IgA secretora específica frente a un extracto crudo de *E. coli* no patógena, sin embargo no resultaron tener diferencias estadísticamente significativas con los encontrados con *S. flexneri*, descartándose la idea de utilizarlo como control negativo. No obstante, los niveles de este anticuerpo fueron cuantificados, estandarizando para ello un ensayo de ELISA. Las concentraciones óptimas encontradas resultaron las mismas que el ensayo utilizado para medir los niveles de IgA secretora específica de *S. flexneri* (**Figura 22**).

Bajo estas condiciones experimentales, se encontró que el extracto crudo de *S. flexneri* presentan proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora específica en saliva. Los niveles de este anticuerpo fueron más elevados en la saliva de los niños evaluados de las poblaciones indígenas (resultando mayor en la etnia Warao) comparado con los niños de la comunidad urbana (**Tabla 12**). La diferencia encontrada pudiera deberse a la deficiencia en los factores ambientales en las comunidades indígenas, tales como: la disponibilidad limitada de agua potable, la falta de instalaciones sanitarias adecuadas para la disposición de las heces y la escasa difusión de las normas de higiene, que se han reportado que facilitan la transmisión de

esta infección (Keusch y Bennish, 1989; Henry, 1991; Ferreccio y col., 1991). Los valores de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* cuantificados en las muestras de saliva podrían estar reflejando la respuesta de IgA secretora local en el intestino provocada por esta bacteria, ya sea por infecciones previas a la realización del estudio, que reflejan la respuesta memoria del individuo, ó a infecciones en el momento. Sin embargo, al relacionar los niveles de estos anticuerpos con la sintomatología clínica asociada a cada individuo, se encontró que los valores hallados eran mayores cuando presentaban cuadros clínicos, ya sea de dolor abdominal, diarrea o antecedentes de diarrea, lo que podría sugerir que los niveles de anticuerpos cuantificados podrían estar reflejando infecciones causadas por este patógeno en el momento de la realización del estudio **(Tabla 14)**.

Los altos niveles de este anticuerpo en la población hacen suponer que existe circulación de esta cepa de *S. flexneri* en las poblaciones estudiadas, que provoca una respuesta de anticuerpo IgA secretora en saliva. Esta conclusión es apoyada por trabajos en los cuales reportaron que bacterias muertas o proteínas de membrana de *S. flexneri*, en modelo de ratón y conejo respectivamente, estimulan una respuesta de anticuerpo IgA en secreciones de mucosa (lavado intestinal y saliva), induciendo protección contra posibles reinfecciones (Mukhopadhaya y col., 2003; Pore y col., 2011). Además en otro estudio encontraron un anticuerpo IgA secretora que lleva tanto la exclusión inmune de la bacteria como la translocación de ésta a las placas de Peyer, donde son internalizados por las células dendríticas, preservando la integridad de la barrera intestinal y disminuyendo la inflamación inducida por dicha infección (Boullier y col., 2009). El nivel de protección que confiere este tipo de anticuerpo es lo que da importancia a la realización de este estudio.

Es importante resaltar que para confirmar la circulación de esta cepa de *S. flexneri* en las comunidades estudiadas, se debió contar con un estudio coprológico que tomará en cuenta la presencia o no en el individuo de esta bacteria. Sin embargo, tomando en cuenta las dificultades logísticas para el traslado apropiado de las muestras desde localidades de difícil acceso en el país, no se pudieron realizar. El estudio coprológico que fue tomado en la base de datos de los niños, fue realizado antes de llevar a cabo este proyecto.

Las infecciones causadas por *Giardia lamblia* se correlacionaron con un aumento de los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* (**Tabla 13**), sugiriendo que posiblemente este protozooario podría estar modulando la incidencia de otras enfermedades entéricas. Las enfermedades causadas por *Giardia* se han reportado que pueden incrementar la permeabilidad del epitelio intestinal, que lleva a la pasiva difusión de antígenos lumbales dentro del compartimiento sub-epitelial, lo cual podría facilitar el paso de algunas bacterias a esta región y explicar la posible asociación que existe entre el aumento de los anticuerpos IgA anti-*S. flexneri* y la infección por *Giardia lamblia* encontradas en este estudio (Cotton y col., 2011). Aunque existen trabajos que demuestran la coinfección de algunos pacientes giardiásicos con diversos patógenos gastrointestinales, especialmente por *Vibrio cholerae*, no se ha demostrado aún la posible asociación de este protozooario con el género *Shigella*, necesitando mayores estudios para argumentar dicha conclusión (Zerpa y Huicho, 1995; Bilenko y col., 2004). La presencia de *Entamoeba coli* en los individuos, se correlacionó con un aumento en los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri*. Aunque *Entamoeba. coli* es un organismo comensal, que habita ocasionalmente el intestino del individuo sin causar ninguna patología, se ha visto asociado en individuos con diarrea frecuentes, provenientes de localidades donde las condiciones de higienes son limitantes ([http://www.cmpt.ca/pdf\\_para\\_2007/0710\\_2\\_gila.pdf](http://www.cmpt.ca/pdf_para_2007/0710_2_gila.pdf), 2007). Posiblemente las infecciones

causadas por *Shigella flexneri* podría estar favoreciendo la colonización por otros patógenos, como *Entamoeba coli*. Sin embargo no se ha reportado todavía ninguna posible asociación de este protozooario con *S. flexneri*.

El extracto crudo de *E. coli* presentan proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora específica en saliva. Los niveles de este anticuerpo resultaron más elevados en los individuos de las comunidades indígenas que en la población urbana, no obstante las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (**Tabla 15**). Esta bacteria es una de las principales especies que forma parte de la microflora intestinal, activando el sistema inmunitario de la mucosa y a su vez estimulando una respuesta humoral de IgA secretora, pudiendo explicar que las diferencias encontradas en los niveles de IgA secretora anti-*E. coli* no resultaron ser estadísticamente significativos (Nowrouzian y col., 2003; Yan y Brent, 2004). La discrepancia de los niveles de este anticuerpo en los individuos de la población urbana con los individuos de las comunidades indígenas, pueden deberse a la deficiencia de los factores ambientales de esta última, que favorecen la reinfección y el contacto continuo con otras cepas de *E. coli* enteropatógenas. Aunque existen una gran variedad de cepas de *E. coli*, éstas comparten antígenos comunes, que llevan a una reacción cruzada en la respuesta de anticuerpo, pudiendo aumentar los niveles de IgA secretora específica en saliva por parte de los niños indígenas. En concordancia con esta conclusión, se ha reportado que niños de Pakistán, expuestos constantemente a nuevas cepas de *E. coli*, tienen una fuerte respuesta de IgA secretora específica en saliva (Mellander y col., 1985).

Al relacionar los niveles de IgA secretora específica contra *E. coli* con los parámetros evaluados; tales como sintomatología clínica y prevalencia de algunos parásitos intestinales, encontramos que los niveles de este anticuerpo aumentan cuando los niños presentan síntomas, así como

también cuando tienen infecciones ocasionadas por *Giardia lamblia* en las poblaciones de Panare y Amalia Pellin, y *Entamoeba coli* en todas las comunidades (**Tabla 16 y 17**). Un estudio realizado por García y colaboradores (1995) demostró que los niños que tenían diarrea persistente experimentaban un sobrecrecimiento de la microflora intestinal, lo que podría conllevar a un aumento de algunas bacterias residentes como *E. coli*. Este estudio lleva a pensar que los niveles de IgA secretora específica contra esta bacteria aumentan cuando los individuos presentan síntomas o se encuentran infectados por otras cepas de *E. coli*. Los niveles de IgA secretora anti-*E. coli* fueron significativamente más altos en los individuos que presentaban *Entamoeba coli*. Sin embargo, en la literatura no se ha reportado ninguna relación entre estos dos patógenos. Posiblemente las infecciones causadas por otras cepas de *E. coli* que sean patógenas, que conlleva a un aumento de la microflora intestinal, favorezca la colonización de protozoarios comensales como *Entamoeba coli*. Por otra parte, como mencionamos anteriormente las infecciones ocasionadas por el protozoario *Giardia lamblia* podría estar desestabilizando la barrera intestinal, promoviendo la entrada de algunas bacterias comensales a la región sub-epitelial, lo que conllevaría a un aumento de la IgA secretora específica contra ésta (Cotton y col., 2011).

Para poder estimar la posible asociación que existe entre los niveles de IgA secretora total con los niveles del NO en saliva, procedimos a cuantificar este metabolito mediante el método de detección colorimétrico del reactivo de Griess. Los niveles de NO fueron significativamente más elevados en los individuos analizados provenientes de la etnia Panare, seguido de los individuo provenientes de la comunidad Warao y Amalia Pellin (**Tabla 18**). La diferencia de estos valores pueden deberse al alto grado de infecciones que presentan los niños indígenas, debido a que se ha reportado que el aumento del NO se encuentra relacionado con el control de la patogénesis,

enfermedades infecciosas, procesos autoinmunes y enfermedades crónicas autogenerativas (Bodgan, 2001). Los individuos de la comunidad Panare, que dieron los mayores niveles de este metabolito, pudieran estar presentando infecciones respiratorias o desordenes inflamatorios de las vías aéreas, como el asma, que se han relacionado directamente con un aumento de los valores del ON tanto exhalado como en esputo (Barroso y col., 2008; Apaza y col., 2004). Además, se ha reportado que el aumento del ON juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal, esto podría sugerir que los niños indígenas, sobre todo los pertenecientes a la etnia Panare, podrían estar presentando una inflamación a nivel de las encías que ocasiona un aumento de este metabolito en la saliva (Silva y col., 2011). Otra explicación posible, radica en los altos valores de desviaciones estándar obtenidos por este método (**Tabla 18**), que refleja el intervalo grande de valores extremos que podrían estar sobreestimando el resultado. Se descarta error en el montaje experimental (número bajo de repeticiones) debido a que cada muestra fue realizada por triplicado, por lo que el esfuerzo muestral es considerado el adecuado para reducir el error estándar. Es importante resaltar que la cuantificación de este metabolito se realizó en muestras humanas, las cuales generalmente no se distribuyen de forma normal en la población, por los que los valores de desviaciones estándar encontrados suelen ser muy grandes.

La correlación del ON con los niveles de IgA secretora total que se encontró en este trabajo fue negativa ( $r < 0,2$ ) pero significativa, indicando que en niños sometidos frecuentemente a infecciones podrían estar aumentando la producción de este metabolito, principalmente a aquellos niños pertenecientes a la etnia Panare. Es importante resaltar que la única correlación positiva, entre estas dos variables, obtenidas por comunidad, fue la de los individuos de la población Amalia Pellin, la cual se encuentra sometida a menos infecciones, por lo que el ON podría estar participando en la producción de la SIgA a nivel intestinal. Sin embargo, la relación

reportada en este trabajo no permite inferir que esté ocurriendo el mecanismo propuesto por Mora y Andrian (2009), por lo que se recomienda la realización de un estudio que incluya sólo a individuos considerados sanos.

Para analizar mejor la capacidad antigénica del extracto crudo de *S. flexneri* y *E. coli* no patógena, y poder estimar cuales son las masas moleculares de las proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva, en las muestras que resultaron positivas en el ensayo de ELISA, se realizó un análisis de Western blot. Previamente fue estandarizada la cantidad de saliva a utilizar para esta metodología, obteniéndose según los resultados que la dilución óptima es 1/10 (**Figura 27**).

Cuando se ensayaron las salivas de las poblaciones estudiadas frente al extracto crudo de *S. flexneri*, se observó principalmente el reconocimiento de cuatro proteínas, con una masa molecular estimada de 62; 29,6; 26,6 y 24 kDa (**Tabla 19 y Figura 31**). Las proteínas que presentan mayor frecuencia de reconocimiento en todos los individuos evaluados fueron la de 26,6 y 24 kDa. El patrón de reconocimiento entre los individuos de las comunidades indígenas y la urbana fue distinto, ya que en esta última hubo mayor detección de las proteínas de 26,6 y 24 kDa, exceptuando la 62 kDa que fue frecuentemente reconocida por la etnia Warao, mientras que las inmunoglobulinas de los individuos de la comunidad Amalia Pellin reconocieron mayoritariamente la proteína de 29,6 kDa.

La proteína de 62 kDa reportada en este trabajo, coincide con la masa molecular de la proteína IpaB, que ha sido reportada ser potente inmunógeno en el suero de monos infectados experimentalmente y en niños Tailandeses con infecciones naturales, no obstante en el mismo estudio los autores reportaron que otras proteínas codificadas por los genes que conforman el

plásmido de virulencia de *S. flexneri* también tuvieron relevancia para estimular una respuesta de anticuerpo, entre las que se destacan las proteínas IpaA (78 kDa), IpaC (42 kDa) e IpaD (39 kDa) (Oaks, E., 1986; Venkatesan y Buysse, 1989). En el presente estudio las proteínas mencionadas anteriormente pudieron haber tenido un bajo reconocimiento o no fueran detectadas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en la saliva de las poblaciones estudiadas, lo que podría deberse a que son poco inmunógenas en la población ó no se encontraban presente en grandes cantidades en el extracto crudo de *S. flexneri*. Las proteínas codificadas por el plásmido de virulencia son sintetizadas por la bacteria, creciendo *in vitro*, cuando son estimuladas al crecer en el medio Rojo Congo (RC) (Forbes y col., 2011). El reactivo RC asemeja el proceso de unión a la región basolateral del enterocito, estimulando a la bacteria para que aumente la expresión de los genes codificados por el plásmido de virulencia (Cabello y Benavente, 2002). Este paso no fue realizado en el protocolo de obtención del extracto crudo de *S. flexneri*, por lo que estas proteínas pudieran estar en menores cantidades.

En otros estudios realizados por Mukhopadhaya y colaboradores (2003) reportaron que las principales proteínas transmembranas de *S. flexneri* que estimulan una respuesta de IgA en suero, en conejos inmunizados con bacterias muertas de una cepa *S. flexneri* 2a, son aquellas que tienen una masa molecular de 38, 34, 23 y 20 kDa. Las proteínas menos reconocidas fueron las de 29 y 27 kDa, mientras que la de 19 kDa no resultó ser inmunogénica. Al comparar los resultados obtenidos con este estudio, se pudiera sugerir que las proteínas de 29,6; 26,6 y 24 kDa son las mismas proteínas de membranas de masa molecular de 29, 27 y 23 kDa respectivamente. La diferencia en la estimación de las masas moleculares puede deberse a arreglos post-traduccionales o diferencias metodológicas. En concordancia con esta conclusión, en otro estudio realizaron una corrida electroforética de las proteínas de membrana externa de *S. sonnei*,

reportando una banda con baja intensidad relativa de 29 kDa, lo que sugiere que esta proteína pudiera ser un antígeno compartido con otras especies de *Shigella* sp (Martínez y col., 2008). Otra proteína de 29 kDa, codificada por el gen *mxiE*, ha sido identificada en una cepa *S. flexneri*. Su función, aunque no está clara aún, se propone que es regular la expresión de ciertos genes de virulencia que participan en la invasión de las células de mamíferos (Kane y col., 2002).

La proteína 26,6 kDa identificada en este estudio, pudiera ser una proteína que ha sido reportada ser codificada por un gen que se encuentra en el plásmido de invasión, denominada IpaR y de masa molecular de 27 kDa. Esta proteína aunque se ha reportado que no compromete la habilidad de la bacteria para invadir y diseminarse por las células del epitelio, disminuye su virulencia, ya que no permite causar infecciones de keraconjutivitis en cobayos (Buysse y col., 1997). Estudios posteriores han demostrado que una proteína de la misma masa molecular forma parte de la estructura del sistema de secreción tipo III, por lo que podría estar implicado en el transporte de las proteínas de virulencia, como las proteínas Ipa, codificadas por el plásmido de invasión (Tamano y col., 2000). En el caso de la proteína de 24 kDa hallada en este estudio pudiera ser una proteína de membrana que ha sido reportada que se une al reactivo Rojo Congo, estimulando a la bacteria *in vitro* a activar el sistema de secreción tipo III y secretar los factores de virulencia (Chambers y col., 1985). Probablemente esta proteína pudiera ser el sitio de unión con la región basolateral del enterocito, que lleva la activación de SSTT.

La saliva del niño utilizado como control negativo para la comunidad Panare presentó un fuerte reconocimiento, mientras que las salivas utilizadas como controles negativos para la comunidad Amalia Pellin y Warao presentaron congruencia con los resultados obtenidos por el método de ELISA (**Figura 30**). Esto pudiera deberse a que los controles negativos de las comunidades fueron aquellos que dieron los valores más bajos de anticuerpos IgA anti-*S. flexneri*, más no

representaban la saliva de niños que no se encontraban infectados por dicha bacteria, por lo que podría existir cierta respuesta de anticuerpo presente en estas salivas. Por otra parte, la técnica de Western blot posee mayor sensibilidad y poder de resolución que el ensayo de ELISA, amplificando la señal obtenida de los anticuerpos presentes en las muestras de salivas.

Algunas de las salivas de los niños de la comunidad Amalia Pellin no presentaron reconocimiento de ninguna de las proteínas presentes en el extracto crudo de *S. flexneri*, sin embargo descartamos cualquier hipótesis de “mal mantenimiento”, ya que fueron las mismas que se utilizaron en el ensayo de Western blot de *E. coli*, en el cual presentaron anticuerpos IgA secretora que reconocieron las proteínas del extracto crudo de *E. coli* (**Figura 30 y 32**, respectivamente).

El ensayo de Western blot con el extracto crudo de *E. coli* mostró un patrón diverso de proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva, siendo las más frecuentes aquellas que presentan una masa molecular de 139,3; 97,1; 67,6 y 54,3 kDa (**Tabla 20 y Figura 33**). Los anticuerpos IgA secretora presentes en las salivas de los individuos analizados provenientes de las etnias Panare y Warao, reconocieron con mayor frecuencia las proteínas de masa molecular estimada de 54,3 y 67,7 kDa. Las salivas de los individuos de la comunidad Amalia Pellin también tuvieron una mayor frecuencia de reconocimiento por las proteínas anteriormente mencionadas, más la proteína de 97,1 kDa. En la población total las más frecuentes fueron aquellas con una masa molecular de 67,6 y 54,3 kDa (**Tabla 20**). Este resultado contrasta con el trabajo realizado por Manjarrez-Hernandez y colaboradores (2000), donde no hallaron respuesta de anticuerpo de IgA secretora específica contra una *E. coli* comensal, en muestras de leche materna provenientes de mujeres de bajo nivel socioeconómico.

La proteína de masa molecular estimada de 97,1 kDa reportada en este trabajo, pudiera ser una proteína de membrana externa de la misma masa molecular que ha sido reportada en *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), denominada EaeA, o intimina, y se ha demostrado ser potente inmunógeno, provocando una respuesta de IgG en el suero de voluntariados infectados previamente con EHEC. Su función es mediar la fijación de la bacteria a las células del epitelio intestinal y subsecuentemente la desaparición de las microvellosidades, sugiriendo el uso de este antígeno como componente potencial para vacunas (Donnenberg y col., 1993; Louie y col., 1993). La función de esta proteína ha sido demostrada tanto en modelos animales como en cultivo de tejido (Donnenberg y col., 1993; McKee y col., 1995). Aunque no se ha reportado en cepas de *E. coli* comensal, ésta proteína podría representar un antígeno común por otras cepas de *Escherichia coli*. En otro estudio demostraron la presencia de una proteína de 67 kDa tanto en una *E. coli* enteropatógena (EPEC) como en una *E. coli* no patógena, que coincide aproximadamente con la masa molecular de la proteína reportada en este estudio (66,7 kDa). La proteína de 67 kDa resultó ser inmunógena, provocando una respuesta de anticuerpo IgG en suero de voluntariados infectados con EPEC (Jarvis y col., 1995). Ésta proteína se encuentra ubicada en la membrana externa, sin embargo su función todavía es desconocida. La proteína de 54 kDa encontrada en este trabajo podría ser una proteína denominada EscC (Garmendia y col., 2005). Su función principal viene relacionada con el transporte de proteínas a través de la membrana externa por un gran complejo anular homomultimérico que pertenece al SSTT (Hueck, 1998).

En el caso de la proteína de 139,3 kDa no se ha encontrado reportes ni para cepas de *E. coli* comensal ni para otro tipos de cepas, lo cual representa un nuevo hallazgo en esta línea de

investigación. Sería importante la caracterización y el estudio de esta proteína, de tal manera de generar conocimiento sobre su función e importancia desde el punto de vista inmunológico.

Los resultados obtenidos indican que la técnica de Western Blot es más sensible que el ensayo de ELISA, al permitir identificar cualitativamente las proteínas antigénicas de distintos extractos bacterianos, y más aún las diferencias en cuanto al tipo de antígenos que son reconocidos en grupos de niños que difieren en cuanto a su grupo étnico y localización geográfica en el país. Estas consideraciones son importantes ya que Venezuela es un país multi étnico, y desde este punto de vista los antígenos que generan una respuesta protectora, podrían variar dependiendo de la composición étnica de la población de distintas localizaciones geográficas. Sin embargo, es importante resaltar que la metodología empleada sólo permite estimar la masa molecular de las proteínas son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva, más no permite la identificación de éstas. Por lo que se recomienda, luego de este estudio preliminar, aislar y secuenciar las proteínas identificadas en los extractos de *E. coli* y *S. flexneri*. La secuenciación de proteínas es lo que nos permitirá corroborar si las conjeturas mencionadas en este trabajo sobre la posible identificación de estas proteínas son ciertas. Además permitirá la estandarización de ensayos de ELISA con antígenos específicos.

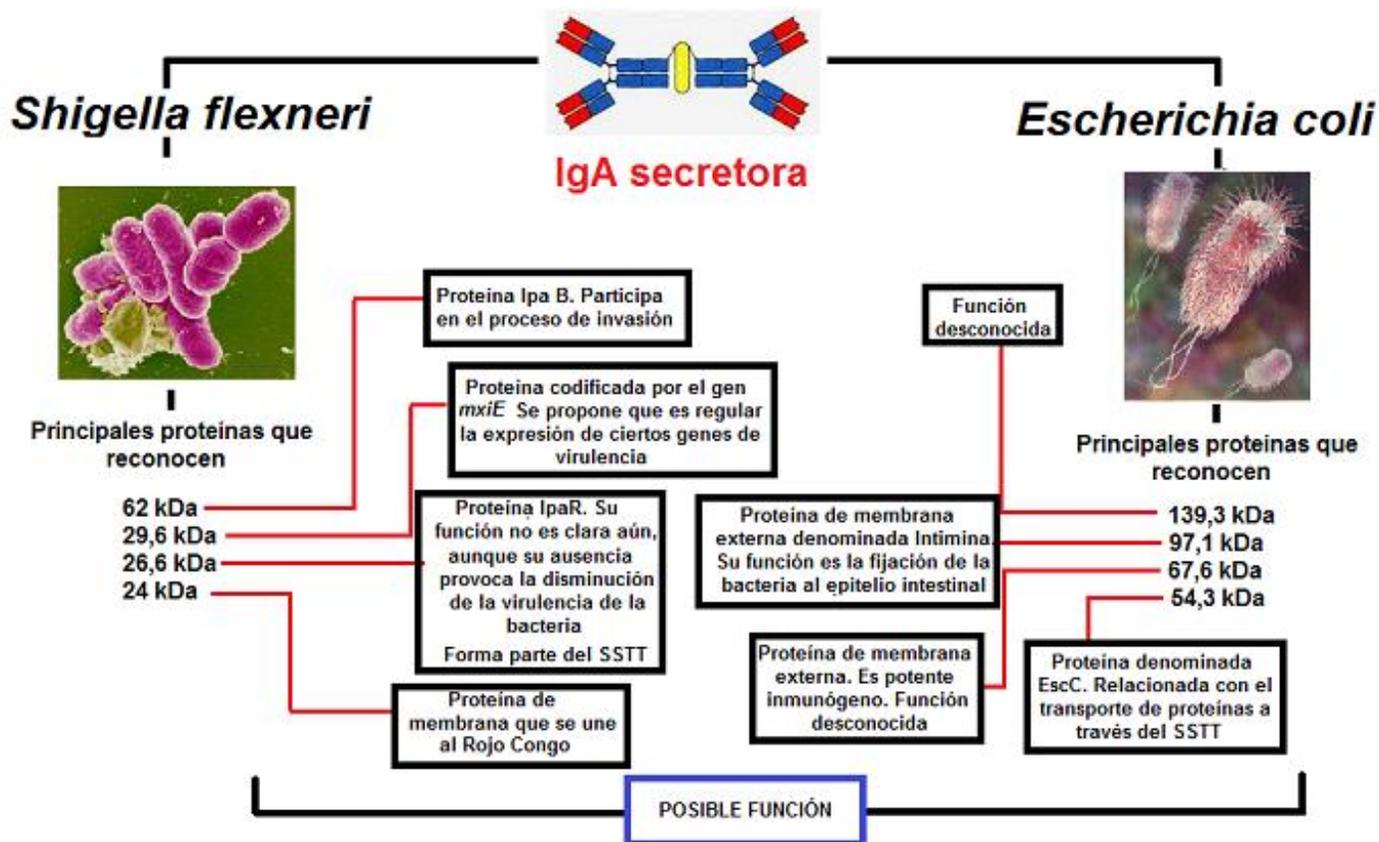


Figura 34. Esquema de las principales proteínas que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora específica (anti- *S. flexneri* y anti-*E. coli*) en saliva detectadas en esta investigación y su posible función reportada en la literatura.

Es importante destacar que en este estudio, preliminar, por primera vez se midieron anticuerpos IgA contra a *Shigella* sp en niños venezolanos, estableciéndose importantes asociaciones con la sintomatología clínica y la presencia de diarrea en distintas comunidades del país. Los resultados obtenidos sugieren que el desarrollo de técnicas como Western Blot permitiría identificar antígenos específicos relacionados a la presencia de la infección así como aquellos que confieren protección frente a ésta, proporcionando así una herramienta importante para el seguimiento y control de la enfermedad. Este trabajo abre así una nueva línea de investigación interdisciplinaria para aportar tecnologías aplicables dirigidas a conseguir un mejor bienestar y calidad de vida para los niños venezolanos particularmente de comunidades rurales.

## VIII. CONCLUSIONES

1. El análisis de la prevalencia de los parásitos intestinales, indicó que la población indígena se encuentra altamente parasitada, principalmente la etnia Panare.
2. Los niveles de IgA secretora total fueron significativamente más elevados en las salivas de los individuos analizados de la etnia Warao seguido de las salivas de los niños provenientes de las comunidades Amalia Pellin y Panare.
3. Se estandarizó un ensayo de ELISA que permitió cuantificar los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* y anti-*E. coli*, resultando como condiciones óptimas la concentración para ambos antígenos al 2 µg/100µL y PBS-Suero de Caballo al 10% como solución de bloqueo.
4. Los resultados de los ensayos de ELISA, utilizando tanto el extracto crudo de *S. flexneri* como de *E. coli*, indican la presencia de proteínas que son reconocidas por la IgA secretora en la saliva de los niños estudiados.
5. Los niveles de IgA secretora anti-*S. flexneri* resultaron ser estadísticamente más elevados en las salivas de los niños analizados de las comunidades indígenas con respecto a las salivas de los individuos provenientes de la población urbana.
6. Los niveles de IgA secretora anti-*E. coli* encontrados entre las poblaciones no fueron estadísticamente significativos, sin embargo hubo una tendencia de valores más elevados en las poblaciones indígenas evaluadas con respecto a la comunidad urbana.
7. Los niveles de NO fueron significativamente más altos en los individuos de la etnia Panare, seguido de los individuos de la comunidad Warao y Amalia Pellin.

8. No se encontró ninguna relación del NO con los niveles de IgA secretora total, por lo que no se puede sugerir que este metabolito estimula la producción de este anticuerpo en los casos estudiados.
9. El aporte más importante de este trabajo fue la estandarización de la metodología, que condujo a la estimación de la masa molecular de las proteínas presentes en los extractos crudos de *S. flexneri* y *E. coli*, que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños venezolanos de comunidades endémicas. La masa molecular estimada de las proteínas que son reconocidas principalmente en el extracto crudo de *S. flexneri* son las de 62; 29,6; 26,6 y 24 kDa, mientras que en el extracto de *E. coli* las más frecuentes son las de 139,3; 97,1; 67,6 y 54,3 kDa. La proteína de masa molecular de 139,3 kDa, en el extracto crudo de *E. coli*, representa un nuevo hallazgo en esta línea de investigación.

## IX. RECOMENDACIONES

Con los ensayos realizados se detectaron proteínas, tanto en el extracto crudo de *S. flexneri* como de *E. coli*, que son reconocidas por los anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva de niños venezolanos pertenecientes a comunidades endémicas. La continuación de esta línea de investigación, involucraría el aislamiento, secuenciación y caracterización de estas proteínas. Una vez que se hayan identificado, se pudiera proceder a la realización de los siguientes experimentos:

1. Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora de las proteínas de interés, a través del uso de modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.
2. Estudiar la cinética de los niveles de anticuerpos contra la proteína de interés, en la saliva de niños infectados naturalmente con *S. flexneri*, desde que presentan la enfermedad hasta que culmine la infección, de tal manera de generar parámetros que intenten explicar el curso de la enfermedad.
3. Generar una metodología de ELISA, con el acoplaje de la proteína de interés, que sirva para el diagnóstico de la shigellosis, siendo este un ensayo no invasivo y fácil de realizar.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Apaza, C., Apaza, N., Recabarren, A. 2004. Dosaje de nitritos en esputo de niños sanos y asmáticos. *Enferm Torax*. **48(1)**: 59-62.
- Barrantes, K., Achí, R. 2008. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* sp. *Panam Infectol*. **11(2)**: 56-61.
- Barroso, N., Pérez, E., Sardón, O., Reverté, C., Gartner, S., Korta, J. 2008. Óxido nítrico exhalado en niños: un indicador no invasivo de la inflamación de las vías aéreas. *Arch Bronconeumol*. **44(1)**: 41-51.
- Basualdo, W., Allende, I., Cabrera, T., Arbo-Sosa, A. 2001. Estudio de brote de diarrea disintérica por *Shigella* sp en una comunidad rural. *Arch Pediatr Urug*. **72(1)**: 65-71
- Bilenko, N., Levy, A., Dagan, R., Deckelbaum, R., El-On, Y., Fraser, D. 2004. Does co-infection with *Giardia lamblia* modulate the clinical characteristics of enteric infections in young children?. *Eur J Epidemiol*. **19(9)**: 877-883.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. **2**: 907-916.
- Boullier, S., Tanguy, M., Kadaoui, K., Caubet, C., Sansonetti, P., Corthésy, B., Phalipon, A. 2009. Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol*. **183**: 5879-5885.
- Bourdet, R., Rudiger, J., Gounon, P., Sansonetti, P., Nhieu, G. 1999. Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J*. **18 (21)**: 5853-5862.
- Buysse, J., Duniak, D., Hartman, A., Venkatesan, M. 1997. Identification and molecular characterization of a 27 kDa *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen, IpaJ. *Microb Pathog*. **23(6)**: 357-369.
- Cabello, R., Benavente, H. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial médica panamericana. Madrid, España.
- Chacón, M., Flores, M., Rodríguez, D., Valles, L., Petrola, C., Torres, A., Pachecho, M. 2004. Niveles de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva en una población sana del estado caracabobo (Venezuela). *Salus*. **8(1)**: 6-11.
- Chambers, C., Stockman, S., Niesel, D. 1985. Thermoregulated expression and cloned Congo red binding activity gene of *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol*. **28**: 281-286.
- Cohen, D., Block, C., Green, MS., Lowell G., Ofek, I. 1989. Immunoglobulin M, A, G antibody response to lipopolysaccharide O antigen in symptomatic and asymptomatic *Shigella* infections. *J Clin Microbiol*. **27**: 162-167.
- Corteguera, R. 2008. Agentes parasitarios. Editorial ciencias médicas. La Habana, Cuba.

- Cotton, J., Beatty, J., Buret, A. 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol.* **41(9)**: 925-933.
- Davidson, J y Adams, R. 1980. Bioquímica de los ácidos nucleicos de Davidson. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Devera, R., Finali, M., Franceschi, G., Gil, S., Quintero, O. 2005. Elevada prevalencia de parasitosis intestinal en indígenas del Detal Amacuro. *Rev Biomed.* **16**: 289-291.
- Díaz, I., Zulfbey, R., Bracho, A., Castellanos, M., Acurero, E., Calchi, M., Atencio, R. 2006. Prevalencia de enteroparásitos en niños de la etnia Yukpa de Toromo, Estado Zulia, Venezuela. *Rev. Méd. Chile.* **134**: 72-78.
- Donnenberg, M., Tzipori, S., McKee, M., Brien, A., Alroy, J., Kaper, J. 1993. The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* **92**:1418–1424.
- Escobedo, A., Cañete, R., Núñez, F. 2008. Prevalence, risk factors and clinical features associated with intestinal parasitic infections in children from San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *West Indian Med.* **57**: 377-382.
- Espinosa, M., Alazales, M., García, A. 2011. Parasitosis intestinal, su relación con factores ambientales en niños del sector “Altos de Milagro”, Maracaibo. *Rev Cubana de Med Integral.* **27(3)**: 396-405.
- Ferreccio, C., Prado, V., Ojeda, A., Cayazzo, M., Abrego, P. Guers, L., Levine, M. 1991. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol.* **134**: 614-627.
- Forbes, S., Bumpus, T., McCarthy, E., Corthésy B., Mantis, N. 2011. Transient suppression of *Shigella flexneri* type 3 secretion by a protective O-antigen-specific monoclonal IgA. *M. Bio.* **2 (3)**: e00042-11.
- García, Y., Arbelo, T., Valdes, M., Sagaro, E., Gorrin, N. 1995. Estudio de la microflora intestinal en niños con diarrea aguda y persistente. *Rev Gastroenterol Perú.* **15**: 35-41.
- Garmendia, J., Frankel, G., Crepin, V. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun.* **73(5)**: 2573-2585.
- Hagel, I., Rodríguez, O., Sánchez, P., Rodríguez, P., Palenque, M. 2005. Factores inmunológicos protectores frente a la infección por *Ascaris lumbricoides* en niños indígenas y criollos de comunidades rurales de Venezuela. *Bol Malariol Salud Ambiental.* **45 (1)**:37-45.

- Hagel, I., Salgado, A., Rodríguez, O., Ortiz, D., Hurtado, M., Puccio, F., Di Prisco, M y col. 2001. Factores que influyen en la prevalencia e intensidad de las parasitosis intestinales en Venezuela. *Grac Méd Caracas*. **109(1)**: 82-92.
- Henry, F. 1991. The epidemiologic importance of dysentery in communities. *Rev Infect Dis*. **13**: 238-244.
- Hernández, I., Godoy, G. 2002. *Shigella sp.* aisladas en Ciudad Bolívar. Prevalencia y su sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. **22**: 22-26.
- Hueck, C. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol Biol Rev*. **62**: 379-433.
- Infante, B., Zabala, M., Cordero, R., León, G., White, A., Hurtado, M., Roque, M y col. 2008. El comedor escolar. Estrategia nutricional para intervenir en salud pública y lograr bienestar en escolares de comunidades rurales en estado de pobreza. *Informed*. **10(12)**: 689-698.
- Jarvis, K., Girón, J., Jerse, A., McDaniel, T., Donnenberg, M., Kaper, J. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Microbiol*. **92**: 7996-8000.
- Jennison, A., Verma, N. 2004. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev*. **28 (1)**: 43-58.
- Kadaoui, K., Corthésy, B. 2007. Secretory IgA Mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J. Immunol*. **179**: 7751-7757.
- Kane, C., Schuch, R., Day, W., Maurelli, A. 2002. MxiE Regulates Intracellular Expression of Factors Secreted by the *Shigella flexneri* 2a Type III Secretion System. *J Bacteriol*. **184(16)**: 4409-4419.
- Keusch, G y Bennish, M. 1989. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatr Infect Dis J*. **8**: 713-719.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W. 2008. Diagnóstico microbiológico. Editorial médica panamericana. Sexta Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. **(4)**: 471-479.
- Kotloff, K., Herrington, D., Hale, T., Newland, J., van de Verg, L., Cogan, J., Snoy, J y col. 1992. Safety, immunogenicity and efficacy in monkeys and humans of invasive *Escherichia*

- coli* K-12 vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun.* **60**: 2218–2224.
- Kotloff, K., Losonsky, G., Nataro, J., Wasserman, S., Hale, T., Taylor, D., Newland, J y col. 1995. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy in healthy adults of four doses of live oral hybrid *Escherichia coli*–*Shigella flexneri* 2a vaccine strain EcSf2a- 2. *Vaccine* **13**: 495–502.
  - Kotloff, K., Winickoff, J., Ivanoff, B., Clemens, J., Swerdlow, D., Sansonetti, P. 1999. Carga mundial de infecciones por *Shigella*: implicaciones para el desarrollo de vacunas y la aplicación de estrategias de control. *Bulletin of the World Health Organization.* **77 (8)**: 651-666.
  - León, S. 2002. Shigellosis (Disentería Bacilar). *Salud Tab.* **8**: 22-25.
  - Llop, A., Valdés, M., Zuazo, J. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas. Tomo I. La Habana, Cuba.
  - Lodish, H., Berk, C., Matsudaira, K., Kaiser, R., Krieger, D., Scott, A., Zipursky, y col. 2005. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición. Buenos Aires, Argentina.
  - Louie, M., De Azavedo, C., Handelsman, M., Clark, C., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P y col. 1993. Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. Immun.* **61**:4085–4092.
  - Lu, L., Walker, A. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr.* **74**: 1124S-30S.
  - Luiggi, J. 2009. Diagnóstico clásico y molecular de *Salmonella* y *Shigella*, en personas con síndrome diarreico agudo en la ciudad de Cumaná, Estado Sucre. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
  - Manjarrez-Hernandez, H., Gavilanes-Parra, S., Chavez-Berrocal, E., Navarro-Ocaña, A., Cravioto, A. 2000. Antigen detection in enteropathogenic *Escherichia coli* using secretory immunoglobulin a antibodies isolated from human breast milk. *Infect Immun.* **68(9)**: 5030-5036.
  - Marcos, L., Maco, V., Terashima, A., Samalvides, F., Miranda, E., Gotuzzo, E. 2003. Parasitosis intestinal en poblaciones urbana y rural en Sandia, Departamento de Puno, Perú. *Parasitol Latinoam.* **58**: 35-40.
  - Martínez, O., Riverón, L., Alemán, A., Talavera, A., Montano, I., Soto, C., Diez, R y col. 2008. Selección de cepas de *Shigella sonnei* para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la shigellosis. *VacciMonitor.* **17(3)**: 13-20.

- Martínez, R., Batista, O. 2011. Parasitismo intestinal y factores asociados en la población infantil de la comunidad Santa Bárbara, Venezuela. *Rev Panam Infectol.* **13(2)**: 38-45.
- McKee, M., Melton-Celsa, A., Moxley, R., Francis, D., D.O'Brien, A. 1995. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEP-2 cells. *Infect. Immun.* **63**:3739-3744.
- Mellander, L., Carlsson, B., Jalil, F., Soderstrom, T, Hanson, LA. 1985. Secretory IgA antibody response against *Escherichia coli* antigens in infants in relation to exposure. *J Pediatr.* **107**: 430-433.
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. 2009. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* **3**: 247-259.
- Mora, J., Soto, L., Salvador, G. 2003. Diarreas asociadas a *Shigella* con un patrón de resistencia antimicrobiana alto en el cantón de Coto Brus, Costa Rica. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* **24**: 55-60.
- Mora, J., von Andrian, U. 2009. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin Immunol.* **2 (1)**: 28-35.
- Moragrega, J. 1996. Valores de referencia de inmunoglobulina A en saliva. *Revista de actualizaciones bioquímicas clínicas latinoamericanas.* **30(2)**: 141-149.
- Morales, C., Gustavo, A., Pino de Morales, L., Arteaga, C., Martinella, L., Rojas, H. 1999. Prevalencia de geohelminCIAS intestinales en 100 municipios de Venezuela (1989-1992). *Rev Soc Bras Med Trop.* **32**: 263-270.
- Mukhopadhaya, A., Mahalanabis, D., Khanum, J., Chakraborty, M. 2003. Protective efficacy of oral immunization with heat-killed *Shigella flexneri* 2a in animal model: study of cross protection, immune response and antigenic recognition. *Vaccine.* **21**: 3043-3050.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. *Inmunología de Janeway*. Mc Graw Hill. Séptima Edición. México.
- Noemí, I., Retamal, C., Guiraldes, E., Reyes, H., Rebolledo, L., Muñoz, P., Gutiérrez, C y col. 1981. IgA secretora en saliva de niños infestados por *Giardia lamblia* y en niños controles. *Rev Chil Pediatr.* **52(1)**: 20-4.
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalma, R., Strannegard, I., Aberg, N., Wold, A., Adlerberth, I. 2003. *Escherichia coli* in infants intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res.* **54**: 8-14.

- Ortiz, D., Afonso, C., Hagel, I., Rodríguez, O., Ortiz, C., Palenque, M., Lynch, N. 2000. Influencia de las infecciones helmínticas y el estado nutricional en la respuesta inmunitaria de niños venezolanos. *Pan Am J Public Health*. **8(3)**: 156-163.
- Phalipon, A., Sansonetti, P. 2007. *Shigella* sp ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?. *Immunol Cell Biol*. **85**: 119-129.
- Ponferrada, A. 2006. Mecanismos de disfunción de la barrera mucosa e inflamación en el colon de ratas tras exposición al estrés. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Pore, D., Mahata, N., Pal, A., Chakrabarti, M. 2011. Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a, induces protective immune response in a mouse model. *PLoS ONE*. **6(7)**: e22263.
- Rivera, C. 2011. Tesis de grado: Parasitosis intestinal en niños y niñas de la escuela “Libertad” Portoviejo Manabí. Universidad técnica de Manabí. Ecuador.
- Robin, G., Keisari, Y., Slepon, R., Ashkenazi, S., Cohen, D. 1999. Quantitative analysis of IgG class and subclass and IgA serum response to *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup> polysaccharides following vaccination with *Shigella* conjugate vaccines. *Vaccine*. **17**: 3109-3115.
- Rodríguez, O., Hagel, I., González, Y., Roque, M., Vázquez, N., López, E., Di Prisco, M. 2004. Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *J Trop Pediatr*. **50(2)**: 68-72.
- Rousham, E. 1994. An increase in *Giardia duodenalis* infection among children receiving periodic anthelmintic treatment in Bangladesh. *J. Trop. Pediatr*. **40**: 329-333.
- Sandra, L., Martínez, A., Valero, K., Ávila, Y. 2002. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de especies de *Shigella* sp aisladas de niños con diarrea en Maracaibo, Venezuela. *Kasmera*. **30(1)**: 7-16.
- Sansonetti, P. 2006. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*: The yin and yang of innate immunity. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol*. **17**: 117-119.
- Sasakawa, C. 2010. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. *Proc. Jpn. Acad, Ser. B*. **86**: 229-243.
- Schultz, C., Qadri, F., Hossain, S., Ahmed, F., Ciznar, I. 1992. *Shigella*-specific IgA in saliva of children with bacillary dysentery. *FEMS Microbiol. Rev*. **89**: 65-72.

- Silva, D., Rico, J., Partata, E., Rivas, J., Correa de Toledo, B., Spolidorio, L., Palomari, D. 2011. El papel del óxido nítrico en la modulación del proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*. **49(4)**: 1-9.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katamaya, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A, Nagai, S y col. 2000. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J*. **19(15)**: 3876-3887.
- Tenorio, F., Del Valle, L., Pastelín, G. 2005. Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **36**: 31-41.
- Terragno, R., Caffer, M., Binsztein, N. 2007. Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de *Shigella spp.* Centrol regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Urrestarazu, M., Liprandi, F., Pérez, E., Gonzalez, R., Schael, I. 1999. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Public Health*, **6(3)**: 149-153.
- Venkatesan, M., Buysse, J. 1989. Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen gene ipaA from *Shigella flexneri* 5a. *Nucleic Acids Research*. **18(6)**: 1648.
- Yan, F., Brent, D. 2004. Comensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol*. **20**: 565-571.
- Zerpa, R y Huicho, L. 1995. Intestinal coinfection with numerous *Giardia* trophozoites and *Vibrio cholerae* in hospitalized children with watery diarrhea. *Wilderness Environ Med*. **6(2)**: 167-172.

### ***Referencias electrónicas***

- De Quadros, C. 2004. Vacunas prevención de enfermedades, protección de la salud. <http://www.paho.org/spanish/dd/pub/vacunas-lu.pdf> (En línea 18 de Noviembre de 2012)
- OMS, 2009. Enfermedades diarreicas. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/index.html> (En línea 12 de Noviembre de 2012)
- OMS, 2010. República Bolivariana de Venezuela: perfil de salud. <http://www.who.int/gho/countries/ven.pdf> (En línea 12 de Noviembre de 2012)

- Thermo scientific. BCA Protein Assay Reagent. [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) (En línea 12 de Octubre del 2011)
- [http://www.cmpt.ca/pdf\\_para\\_2007/0710\\_2\\_gila.pdf](http://www.cmpt.ca/pdf_para_2007/0710_2_gila.pdf) (En línea 30 de Enero de 2013)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (En línea 30 de Enero de 2013)

## **XI. ANEXOS**