



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**“Impacto de la respuesta inmune humoral durante las infecciones con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)”**

---

**Tesista: Lic. Alan Mauro Bernal**

**Director/a: Dra. Marina Sandra Palermo**

**Codirector/a: Dr. Martín Rumbo**

**Año: 2024**



# AGRADECIMIENTOS

Finalmente, me senté a escribir la última parte de la tesis... los agradecimientos. Pensé que todo iba a fluir de manera más natural, pero la verdad que, para variar, tampoco me es algo fácil. Son muchísimas las personas a las cuales les quiero agradecer por haber formado de una u otra manera parte de este trabajo, porque por más individual que parezca, estuvo guiado y formado de sostenes imprescindibles para poder lograrlo. A todos ellos que me acompañaron en este largo camino: ¡GRACIAS! 😊

A **Marina**, mi directora, gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu equipo, por haberme guiado en este camino y dado la libertad de trabajar en lo que me gusta. Por haberme escuchado, por estar siempre presente que lo necesité y por haberme enseñado todo lo que estuvo a tu alcance. Por tu objetividad y por tus sabios consejos, muchísimas gracias. También, agradecerte por tu calidad humana, porque no todo fue trabajo, hubo muchos almuerzos con charlas y momentos divertidos, así como también congresos, reuniones, etc. En fin, gracias por todo y, por último, por no haber perdido nunca tu motivación después de todos estos años de trabajo y por demostrarme que sos una máquina.

A **Martín**, mi codirector, y a su grupo, especialmente a **Agustina**, por sus observaciones, por siempre estar dispuestos a colaborar en lo que fuese necesario y por habernos introducidos en el mundo de la flagelina, gracias.

A mi grupo de investigación, empezando por **Vicky**, que más allá de toda la ayuda laboral, me quedo con toda la ayuda personal que me has dado. Por tus consejos, tus anécdotas divertidas, tu cariño, por haberme cedido tu pecera o locutorio que digamos es un poco más mío que tuyo, y por ponernos la radio Aspen mientras pipeteamos deleitándonos con tu canto 😊. Por hacer que mi paso por el laboratorio haya sido más divertido, por darme esa chispa de motivación cuando estaba medio decaído, por haber sido como una hermana mayor en este proceso del doctorado, gracias. A **Romi**, por haberme enseñado e introducido en el mundo de la inmunología de la mucosas, por haberme acompañado en mis primeros pasos del doctorado y por toda la ayuda recibida, muchas gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, mis pares, empezando por la más antigua y que ya no está, **Andre**, muchas gracias porque básicamente si nunca más se me contaminó un cultivo celular fue por compartir conmigo tu manera muy prolija de trabajar. Por las tardes de chisme compartidas en el cuartito, por tus imitaciones y por todos los momentos divertidos. A las más recientes, **Yina y Cami**, por su ayuda fundamental en estos últimos meses en los cuales estaba escribiendo y ustedes me han dado una mano enorme con muchos experimentos, sobre todo con las Caco, y por todos los momentos divertidos que pasamos dentro y fuera del labo. A mi otro yo del laboratorio, **Fer**, un gran compañero y amigo que me dejó este doctorado. Gracias por ser mi segunda básicamente en todo, por pipetear a la par mío siempre que lo necesité, por escucharme cuando necesitaba hacer catarsis de la vida misma dentro y fuera del labo (con mis 15-20 minutos de audio), por las salidas, pijamadas, congresos, vacaciones y por dejarme compartir mi vida con vos, te quiero un montón ❤️.

A todos los **becarios de Inmuno I** que, en mayor o menor medida, siempre me inspiraron a ser la mejor versión de mí mismo. A **Joa**, por ser durante los últimos dos años como mi cable a tierra, la persona que tranquiliza a mi cabecita loca incluso estando a 12000 km de distancia, gracias por tu amistad y por ser la persona que sos, por todos los momentos compartidos juntos ❤️. A **Mariano**, que también digamos fuiste como un cable a tierra, gracias por todos tus consejos y opiniones, por tu forma de ser tan particular que sabes que en mi mayor momento de ansiedad, pasar tiempo con vos fue una de las cosas que mejor me hacía sentir. A **Florcita**, mi primera gran amiga de Inmuno I, gracias por toda la ayuda que me diste estos años en el labo, por quedarte acompañándome aun cuando muy ilusos decíamos “esto lo hacemos rápido, a las 5 terminamos” y eran las 8 de la noche y seguíamos ahí. Por todos los momentos vividos, pijamadas, charlas hasta altas horas de la madrugada, chismes de GH, confesiones en la cámara de los secretos y más. Por dejarme compartir con vos la vida, gracias ❤️. A **Agus**, por escucharme este último tiempo todo lo que necesité, y si bien es la más reservada de todos nosotros, siempre tiene una buena observación para hacer, y siempre muy acertada. A **Fede**, por ser nuestro representante, gracias por toda tu iniciativa, por tu buena predisposición en gestionar lo que sea necesario y también por escucharme siempre que necesité algún consejo u opinión tuya. A **Cari**, que quizá fue con el que menos compartí porque básicamente cuando yo llegaba a trabajar, él se iba; o estaba siempre muy a las corridas de acá para allá, pero entendemos que los hombres casados manejan otros tiempos y responsabilidades 😊. Más allá de todo eso, todos los momentos compartidos con vos fueron muy divertidos, todas tus anécdotas e historias, gracias por compartir y dejarme compartir con vos. Al resto de las chicas de Inmuno I: **Marine, Joss, Yas, Jor y Alexia**, que si bien empezaron hace poquito o algunas ya se fueron, todas ustedes dejaron algo significativo en mí, gracias por eso ❤️.

A las **investigadoras de Inmuno I: Pau, Vero, Barbi, Gaby y Lu**, porque algo de todas ustedes tiene este trabajo o mi persona. Gracias por compartir conmigo sus experiencias, por aconsejarme cuando tuve dudas académicas, por darme esos empujones de motivación y por demostrarme que, aunque se tenga un deadline en 2 días, se pueden hacer 15489156156 cosas. Ojalá cuando sea grande sea ¼ de todo lo que son ustedes.

A las chicas del tercero que, a pesar de estar allá escondidas, encontré ahí un buen refugio. A **Monti**, porque todo lo que sé de buenas prácticas en ratones es gracias a vos, gracias por enseñarme todo a medida que lo ibas aprendiendo y, más allá de lo laboral, gracias por tus anécdotas súper divertidas y por los espacios de catarsis. A **Mercedes** que, por más de que te vendas como un ogro, lejos de serlo. Si algo me divertía cuando tenía tiempo libre era subir al tercero para charlar con vos, porque más allá de que me sugeriste muchísimas cosas y experimentos que me fueron útiles para mi tesis, me quedo con esos momentos de charlas y risas compartidos. También, gracias por actualizarme y ponerme al día con todo lo que estaba pasando en el mundo, no sólo en el científico, y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A las investigadoras del Leloir, a **Vanina y Jimena**, por abrirme las puertas de su laboratorio y tratarme como a uno más de su grupo, dejando todo a mi

disposición. Por enseñarme del mundo de las proteínas y producción y purificación de nanoanticuerpos, y por las charlas de la vida durante esos 90 minutos de ultracentrífuga, ¡gracias!

A mis compañeras y amigas de la facultad: **Mai, Tefi, Agus, Cami, Car, Nanu y Nacha**, por haberme ayudado a tomar la decisión de hacer un doctorado. Porque más allá de que el tiempo nos encuentra en distintos lugares y haciendo cosas diferentes, las recuerdo con mucho cariño siempre y estoy muy contento de lo grande profesionales y personas que son ❤️.

A mis mejores amigas, **Agus y Sabri**, por su apoyo y amor incondicional siempre, por haber caminado a mi lado todos estos años a pesar de todo, por ser mi sostén cuando las cosas se ponen feas y porque no imagino mi vida sin ustedes, las amo y gracias por todo ❤️. A **Augusto**, mi primo y amigo, mi falso mellizo, nada mejor que haber crecido con vos y haber hecho todo juntos, creo que eso hizo que todo sea más fácil para mí. A **Sofi y Fede**, porque juntos somos la mejor triéja. Gracias por todos los momentos compartidos, por las salidas, paseos, vacaciones, por todo el cuidado y amor que nos damos cuando estamos juntos, los quiero un montón. A **Santi**, que es muy loco como la vida nos encontró parados en el mismo lugar y eso hizo que conectáramos enseguida. Porque rápidamente te convertiste en uno de mis amigos más cercanos, por todo lo compartido, desde muchas vacas juntos hasta incluso tardes de tesis, por escucharme siempre, por tus consejos y calma, por dejarme ser parte de tu vida y ser parte de la mía, te quiero un montón, gracias ❤️. A mis amigos de la vida, **Marqui, Mavi y Miru**, porque a pesar de que no nos veamos tan seguido, cada vez que compartimos parece que no pasó el tiempo. Gracias por haberme bancado todos estos años. A **Blanqui** que, a pesar de no vernos tan seguido, cuando nos juntamos compartimos un montón de cosas, entre ellas la tesis. Y, por último, no quería dejar de mencionar a **Marita**, gracias por tu admiración, por siempre preguntarme que estoy haciendo, por querer que le explique a quien sea cuál es mi proyecto de investigación y por ser como sos con todos nosotros ❤️.

A mi **mamá y papá**, por su apoyo incondicional. Por haberme permitido estudiar y hacer lo que me gusta, y por aguantarme todos estos años de tesis. A mi **hermano**, por aguantar mis cambios de humor y todos los buenos momentos juntos, de risas y peleas. Los quiero mucho. A mi familia, **primos (Yesi, Gastón, Gonza), tías (Mariela y Moni) y a mi abuela Luisa**, que por momentos imponía mayor presión que mi jefa con preguntas como “¿ya entregaste la tesis?” o “¿cuándo la vas a entregar?”. A **Fiore**, mi familia y amiga, porque a pesar de la edad sos mi gran confidente, por todos los momentos compartidos juntos y los que todavía nos quedan ❤️, gracias por compartir la vida conmigo.

A **Marta**, por hacer que todos los viernes a las 11 sea un momento de encuentro único, muchos de ellos hablando un buen rato de la tesis. Por tu ayuda y por haber hecho que supere muchísimas cosas que creía imposible, gracias.

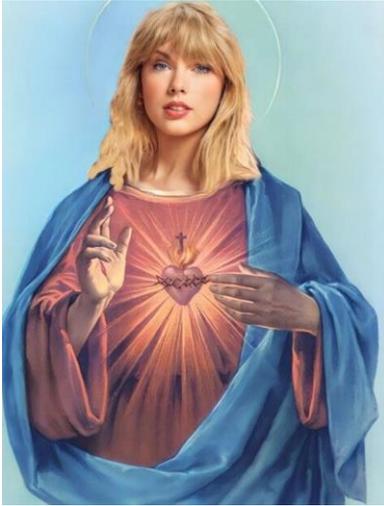
Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (**CONICET**) y a la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica** por haberme dado los recursos económicos necesarios para la realización de esta tesis.

Gracias a mis fieles compañeras: a mi perra, con sus miles de nombres y apodos, pero vamos a dejarle **Netu**, por estar acompañándome siempre al lado mío todas las largas tardes y noches de escritura, y por hasta incluso señalarme

los momentos en los que era necesario parar de escribir para jugar un poco. Y a Taylor, porque los últimos 4 meses lo único que acompañaba los momentos de escritura, además de mi perra, era THE ERAS TOUR SETLIST; y no sólo los momentos de escritura, básicamente todos los sucesos que iban transcurriendo en mi vida.

Por último, a todos aquellos que no están, pero de algún modo siguen estando. Porque nunca voy a saber lo que podríamos haber sido, pero sí lo que somos y fuimos. Porque siguen estando muy dentro de mí, gracias ❤️.





*You're on your own, kid  
Yes, you can face this  
You're on your own, kid  
You always have been*



# ÍNDICE

Abreviaturas	17
Resumen	22
Hipótesis de trabajo y objetivos	27
Introducción	30
1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.	32
2. EL AGENTE ETIOLÓGICO Y SUS FACTORES DE VIRULENCIA.	36
2.1. Toxina Shiga y su mecanismo de acción.	37
2.2. Lipopolisacárido (LPS) O157.	39
2.3. Flagelo H7.	40
2.4. Plásmido pO157.	42
2.5. Isla de Patogenicidad cromosómica: locus para la destrucción del enterocito (LEE).	43
2.6. Otras adhesinas.	44
2.7. Otras Islas de Patogenicidad (PAI).	44
3. FISIOPATOLOGÍA DEL SUH.	45
4. TRATAMIENTOS PARA LA PREVENCIÓN DEL SUH.	48
4.1. Tratamientos dirigidos a reducir la colonización del ganado.	50
4.2. Tratamientos dirigidos a la prevención del SUH en humanos.	51
4.2.1. Prevención de la infección con cepas STEC.	52
4.2.2. Prevención del desarrollo del SUH.	55
5. CONCEPTO DE TOLERANCIA Y RESISTENCIA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS.	59
5.1. Tolerancia y resistencia de ratones BALB/c (BALB) y C57BL/6 (C57) frente a distintas infecciones.	61
6. MODELOS MURINOS DE SUH.	63
7. INMUNIDAD DE MUCOSAS.	65
7.1. Barrera física.	66
7.2. Barrera biológica: Microbiota intestinal.	67
7.3. Barrera inmunológica: Inmunidad innata.	70
7.3.1. Péptidos antimicrobianos.	70

7.3.2. Reclutamiento de células inmunes.	71
<b>7.4. Barrera inmunológica: Inmunidad adaptativa.</b>	<b>72</b>
7.4.1. Sitios inductores.	73
7.4.2. Sitios efectores.	75
7.4.3. Presentación antigénica.	76
7.4.4. Polarización de linfocitos T y respuesta efectora.	77
7.4.5. Linfocitos B y producción de anticuerpos T-dependiente y T-independiente.	79
7.4.6. Memoria inmunológica.	83
<b>7.5. Anticuerpos y su función efectora según su isotipo.</b>	<b>84</b>
7.5.1. Secreción de IgA en la mucosa.	86
7.5.2. Relevancia de la IgA en la homeostasis y en la respuesta protectora.	87
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>90</b>
1. CEPAS BACTERIANAS.	92
2. CULTIVOS BACTERIANOS.	92
2.1. Preparación del extracto bacteriano para los ensayos de infección de ratones a la edad del destete.	93
2.2. Preparación del extracto bacteriano para los ensayos de infección de ratones adultos.	93
2.3. Preparación del extracto bacteriano para la obtención de H7.	94
2.4. Obtención y preparación de extractos de bacterias comensales.	94
3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE H7.	95
3.1. Determinación de la pureza de la H7 obtenida por SDS-PAGE.	95
3.2. Identificación de H7 mediante Western Blot.	96
4. MODELOS MURINOS.	96
4.1. Ratones y declaración institucional sobre el uso de animales de experimentación.	97
4.2. Administración de Stx2a e.v.	98
4.3. Esquema de depleción de linfocitos B.	99
4.4. Esquema de inmunización con H7 y FliC.	99
4.5. Infección de ratones BALB y C57 al destete con la cepa STEC O157:H7.	100

4.6.	Infección de ratones depletados de linfocitos B con la cepa STEC O157:H7. _____	100
4.7.	Infección de ratones adultos con la cepa pW. _____	101
4.8.	Esquema de reinfección. _____	102
4.9.	Intercambio de crías. _____	102
5.	<b>ENSAYOS REALIZADOS CON RATONES INFECTADOS <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i>.</b>	
	103	
5.1.	Colonización intestinal y excreción bacteriana. _____	103
5.2.	Análisis de la permeabilidad intestinal. _____	103
5.3.	Estudios histológicos de riñón e intestinos. _____	104
5.4.	Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH). ____	104
5.5.	Neutralización de Stx2 <i>in vivo</i> . _____	105
5.6.	Protección con nanoanticuerpos anti-Stx2. _____	105
5.7.	Transferencia de plasma de ratones BALB infectados a ratones C57.	105
6.	<b>OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.</b> _____	106
6.1.	Bazo. _____	106
6.2.	Ganglio mesentérico y mediastínico. _____	107
7.	<b>CULTIVOS CELULARES.</b> _____	107
7.1.	Cultivo de la línea celular reportera Caco-2 CCL20:luc. ____	107
7.2.	Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). _____	108
7.3.	Cultivo de leucocitos y tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). _____	109
8.	<b>ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ELISA.</b> _____	109
8.1.	Determinación de IgG anti-Stx2B en plasma. _____	109
8.2.	Determinación de IgA e IgG anti-flagelina en plasma y sobrenadantes de materia fecal. _____	110
8.3.	Determinación de IgA e IgG anti-STECS en plasma y materia fecal.	111
	8.3.1. Preparación de bacterias STEC como antígeno. _____	111
	8.3.2. Determinación de IgA e IgG específica. _____	111
8.4.	Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos.	112
9.	<b>ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.</b> ____	113
9.1.	Determinación de IgA unida a bacterias. _____	113

9.1.1.	<i>Preparación de la muestra.</i>	113
9.1.2.	<i>Adquisición.</i>	113
9.2.	<b>Determinación de la opsonización <i>in vitro</i>.</b>	114
9.3.	<b>Determinación de la depleción de linfocitos B.</b>	114
9.4.	<b>Determinación del porcentaje de BMDC maduras activadas.</b>	115
9.5.	<b>Determinación de la proliferación celular.</b>	116
<b>10.</b>	<b>ESTUDIOS FUNCIONALES CON LOS PLASMAS DE LOS RATONES INFECTADOS.</b>	116
10.1.	<b>Inhibición de la motilidad.</b>	116
10.2.	<b>Inhibición del crecimiento bacteriano.</b>	117
<b>11.</b>	<b>MÉTODOS ESTADÍSTICOS.</b>	117
<b>Resultados</b>		<b>119</b>
<b>1.</b>	<b>SUSCEPTIBILIDAD DE LOS RATONES BALB Y C57 FRENTE A LA INFECCIÓN CON BACTERIAS STEC O157:H7.</b>	121
1.1.	<b>Evaluación de la mortalidad.</b>	121
1.2.	<b>Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante la infección con STEC O157:H7.</b>	123
1.2.1.	<i>Determinación de la concentración plasmática de urea.</i>	123
1.2.2.	<i>Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica.</i>	124
1.2.3.	<i>Ganancia o pérdida de peso y consumo de alimento p.i.</i>	124
<b>2.</b>	<b>SUSCEPTIBILIDAD DE LOS RATONES BALB Y C57 FRENTE AL DESAFÍO E.V. CON STX2A.</b>	126
2.1.	<b>Evaluación de la mortalidad.</b>	126
2.2.	<b>Parámetros bioquímicos y clínicos analizados durante la intoxicación con Stx2a.</b>	127
<b>3.</b>	<b>CARGA BACTERIANA EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.</b>	129
3.1.	<b>Colonización intestinal.</b>	129
3.2.	<b>Excreción bacteriana.</b>	130
<b>4.</b>	<b>CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL INTESTINO Y RIÑÓN DE RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.</b>	131
4.1.	<b>Análisis histológico del intestino grueso.</b>	132
4.2.	<b>Análisis histológico del intestino delgado.</b>	133
4.3.	<b>Análisis histológico del riñón.</b>	134
<b>5.</b>	<b>CAMBIOS FUNCIONALES EN LA BARRERA INTESTINAL DE RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.</b>	135

<b>6. RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA EN MUCOSA INTESTINAL EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.</b>	<b>136</b>
<b>7. RESPUESTA HUMORAL SISTÉMICA EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.</b>	<b>138</b>
<b>8. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE A LAS INFECCIONES CON STEC O157:H7.</b>	<b>140</b>
<b>8.1. Administración de anticuerpo neutralizante anti-Stx2 a ratones C57 infectados.</b>	<b>140</b>
8.1.1. <i>Evaluación de la mortalidad.</i>	<b>140</b>
8.1.2. <i>Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.</i>	<b>141</b>
<b>8.2. Desafío de ratones BALB sobrevivientes a la infección con Stx2 e.v.</b>	<b>142</b>
<b>8.3. Transferencia de inmunidad por plasma de ratones BALB infectados a ratones C57.</b>	<b>142</b>
<b>9. ROL DE LOS LINFOCITOS B EN LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LAS INFECCIONES CON STEC O157:H7.</b>	<b>143</b>
<b>9.1. Evaluación del esquema de depleción de linfocitos B.</b>	<b>144</b>
<b>9.2. Evaluación de la mortalidad de los ratones BALB depletados de linfocitos B frente a una infección con STEC O157:H7.</b>	<b>146</b>
9.2.1. <i>Evaluación de la mortalidad.</i>	<b>146</b>
9.2.2. <i>Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.</i>	<b>147</b>
9.2.2.1. <i>Determinación de urea plasmática y seguimiento del peso diario post infección.</i>	<b>147</b>
9.2.2.2. <i>___ Determinación del recuento total y diferencial de leucocitos.</i>	<b>148</b>
<b>9.3. Determinación de la respuesta inmune humoral a 3 días p.i.</b>	<b>149</b>
<b>10. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-STE C O157:H7.</b>	<b>151</b>
<b>10.1. Esquema de reinfección.</b>	<b>151</b>
<b>10.2. Evaluación de la capacidad opsonizante.</b>	<b>153</b>
<b>10.3. Evaluación de la capacidad neutralizante.</b>	<b>158</b>
10.3.1. <i>Inhibición de la motilidad bacteriana.</i>	<b>158</b>
10.3.2. <i>Inhibición del crecimiento bacteriano.</i>	<b>159</b>
<b>10.4. Presencia de anticuerpos anti-H7 en ratones infectados sobrevivientes.</b>	<b>160</b>
<b>11. ROL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-STE C O157:H7 EN LA MUCOSA INTESTINAL EN LA PREVENCIÓN DEL SUH.</b>	<b>161</b>

<b>11.1. Elección de la H7 como antígeno para planes de inmunización.</b>	<b>162</b>
11.1.1. <i>Obtención, purificación y caracterización de H7.</i>	162
<b>11.2. Esquema de inmunización con H7.</b>	<b>163</b>
11.2.1. <i>Análisis de la respuesta inmune humoral anti-H7 en plasma.</i>	163
11.2.2. <i>Análisis de la respuesta inmune humoral anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal de ratones inmunizados.</i>	165
<b>11.3. Esquema de inmunización con FliC.</b>	<b>166</b>
11.3.1. <i>Análisis de la respuesta inmune humoral anti-FliC en plasma de ratones inmunizados.</i>	167
11.3.2. <i>Análisis de la respuesta inmune humoral anti-FliC en sobrenadantes de materia fecal de ratones inmunizados.</i>	168
<b>11.4. Estudio de la existencia de reacción cruzada entre anticuerpos anti-FliC y anti-H7.</b>	<b>169</b>
<b>12. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR ANTI-H7.</b>	<b>170</b>
<b>12.1. Activación de BMDC por H7.</b>	<b>170</b>
12.1.1. <i>Expresión de CD86 en la superficie de BMDC.</i>	170
12.1.2. <i>Perfil de citoquinas secretadas por BMDC.</i>	171
<b>12.2. Evaluación de la memoria inmunológica en ratones inmunizados con H7.</b>	<b>172</b>
12.2.1. <i>Proliferación específica de esplenocitos de ratones inmunizados con H7.</i>	173
12.2.2. <i>Proliferación específica de leucocitos provenientes del ganglio mediastínico de ratones inmunizados.</i>	174
12.2.3. <i>Perfil de citoquinas liberadas en los cultivos mixtos por linfocitos T activados de bazo.</i>	176
12.2.4. <i>Perfil de citoquinas liberadas en los cultivos mixtos por linfocitos T activados de ganglio mediastínico.</i>	177
12.2.5. <i>Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH).</i>	178
<b>13. DESAFÍO CON STEC O157:H7 EN RATONES INMUNIZADOS CON H7, FLIC Y CONTROLES.</b>	<b>179</b>
<b>13.1. Evaluación de la mortalidad.</b>	<b>179</b>
<b>13.2. Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.</b>	<b>180</b>
13.2.1. <i>Determinación de urea plasmática y seguimiento del peso diario p.i.</i>	180

13.2.2. <i>Determinación del recuento total y diferencial de leucocitos.</i>	181
<b>13.3. Colonización intestinal de pW.</b>	<b>182</b>
<b>13.4. Evaluación funcional de la barrera intestinal luego de la infección con pW.</b>	<b>183</b>
<b>13.5. Evaluación de los ratones inmunizados con H7 sobrevivientes al desafío infeccioso.</b>	<b>184</b>
13.5.1. <i>Parámetros bioquímicos y clínicos.</i>	184
13.5.2. <i>Análisis de la respuesta inmune humoral.</i>	185
<b>14. INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES POR STEC.</b>	<b>186</b>
<b>14.1. Intercambio de crías.</b>	<b>186</b>
14.1.1. <i>Evaluación de la mortalidad de ratones BALB y C57 frente al desafío con la STEC O157:H7 en el modelo de intercambio de crías.</i>	187
14.1.2. <i>Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con STEC O157:H7.</i>	188
14.1.2.1. <i>Ganancia o pérdida de peso y consumo de alimento p.i.</i>	188
14.1.2.2. <i>Determinación de la concentración de urea plasmática.</i>	190
14.1.2.3. <i>Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica.</i>	190
<b>14.2. Efecto de la disbiosis inducida en la progresión a SUH en ratones BALB y C57.</b>	<b>191</b>
14.2.1. <i>Evaluación de la sobrevida en ratones BALB tratados con ampicilina e infectados.</i>	192
14.2.2. <i>Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con la STEC O157:H7 pW en ratones BALB tratados con ATB.</i>	193
14.2.3. <i>Evaluación de la sobrevida en ratones C57 tratados con ampicilina e infectados.</i>	194
14.2.4. <i>Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con pW en ratones C57 tratados con ATB.</i>	195
14.2.5. <i>Comparación de la sobrevida de ratones BALB y C57 tratados con ATB e infectados con la dosis más baja de pW.</i>	196
<b>Discusión</b>	<b>198</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>232</b>
<b>Referencias</b>	<b>236</b>



# Abreviaturas



A/E: pegado y borrado  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ANOVA: análisis de varianza  
APRIL: ligando inductor de la proliferación  
ARN: ácido ribonucleico  
aSUH: síndrome urémico hemolítico atípico  
BAFF: factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF  
BALB: ratones BALB/c  
BALT: tejido linfoide asociado al árbol bronquial  
BCR: receptor de células B  
BMDC: células dendríticas derivadas de médula ósea  
C57: ratones C57BL/6  
CCL: ligando de quimioquina C-C  
CCR: receptor de quimiocinas C-C  
CD: clúster de diferenciación  
CD71: receptor de transferrina  
CD89/FcαRI: receptor para el fragmento cristalizante de la inmunoglobulina A  
CFSE: éster de succinimidil-carboxifluoresceína  
CLR: receptores de lectina tipo C  
DC: células dendríticas  
DL100: dosis letal 100%  
DO: densidad óptica  
DTH: reacción de hipersensibilidad de tipo retardada  
Dx-FITC: Dextrán conjugado a isotiocianato de fluoresceína  
e.v.: endovenosa  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
Efa-1': factor de *Escherichia coli* enterohemorrágico para la adherencia-1  
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágico  
ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción  
FcRγ: receptor para el fragmento cristalizante de la inmunoglobulina G  
FLA: folículos linfoides aislados  
FlhC: flagelina de *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028  
GALT: tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal  
Gb3: glucoesfingolípido globotriaosilceramida  
GF: ratones libres de gérmenes  
H&E: hematoxilina y eosina  
H7: flagelina H7  
HcpA: pili de *E. coli* enterohemorrágico  
IFM: intensidad de fluorescencia media  
IFN: interferón  
Ig: inmunoglobulina  
IL: interleuquina  
LAA: locus de adhesión y autoagregación  
LB: Luria-Bertani  
LEE: locus para la destrucción del enterocito  
LP: lámina propia  
LPS: lipopolisacárido

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas  
mARN: ARN mensajero  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad  
MLN: nódulos linfáticos mesentéricos/ganglio mesentérico  
NALT: tejido linfoide asociado al tracto nasofaríngeo  
NK: natural killer  
NLR: receptores similares a NOD  
NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótidos  
p.i.: post infección  
PAI: islas de patogenicidad  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: tampón fosfato salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PFA: paraformaldehído  
plgR: receptor de inmunoglobulina polimérica  
PMN: polimorfonucleares  
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
PP: placas de Peyer  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
RRP: receptores de reconocimiento de patrones moleculares  
SCFA: ácidos grasos de cadena corta  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio  
SEM: error estándar de la media  
SFB: suero fetal bovino  
SMAC: agar MacConkey Sorbitol  
SPF: ratones libres de patógenos específicos  
STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga  
Stx: toxina Shiga  
Stx2B: subunidad B de la toxina Shiga variante 2  
SUH: síndrome urémico hemolítico  
T3SS: sistema de secreción de tipo 3  
TCR: receptor de células T  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta  
Th1: linfocito T CD4+ colaborador tipo 1  
Th17: linfocito T CD4+ colaborador tipo 17  
Th2: linfocito T CD4+ colaborador tipo 2  
Thf: linfocitos T CD4+ colaborador folicular  
TI: timo independiente  
Tir: receptor de intimina  
TLR: receptores tipo Toll  
TNF: factor de necrosis tumoral  
Treg: linfocitos T regulatorios  
TSB: caldo tripticasa de soja  
UAL: unidades arbitrarias de luminiscencia  
UFC: unidades formadoras de colonias  
URF: unidades relativas de fluorescencia

VHH 2vb8: nanoanticuerpo neutralizante anti-Stx2 (anticuerpos de dominio simple)

# Resumen



El síndrome urémico hemolítico típico o post entérico (SUH) es una enfermedad que se caracteriza por la triada anemia hemolítica no inmune, trombocitopenia y falla renal aguda. En el 95% de los casos, el SUH está asociado a infecciones con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (Stx) (STEC), dentro del cual el 70% de los aislamientos clínicos se corresponde al serotipo O157:H7. En nuestro país, este síndrome presenta un comportamiento endemo-epidémico diagnosticándose de 200 a 400 nuevos casos anuales, presentando la mayor incidencia a nivel mundial, incluso significativamente mayor que en el resto de los países de América Latina. Durante la última década, la tasa de incidencia anual fue de 6-10/100.000 niños menos de 5 años; grupo etario al que afecta principalmente. Estos índices representan el 10-15% de pacientes infectados, ya que el 85-90% resolverá la infección espontáneamente. Actualmente, no existe vacuna para humanos ni tratamientos específicos aprobados para esta enfermedad, y la mayoría de las estrategias en desarrollo buscan inhibir o neutralizar a la toxina.

Por todo lo detallado anteriormente, nos propusimos investigar qué mecanismos están involucrados en la resolución de la infección, y utilizar este conocimiento para desarrollar algún método preventivo que contribuya a controlar la infección gastrointestinal y pudiera ser útil en las personas susceptibles a desarrollar la enfermedad sistémica.

Para ello, infectamos ratones BALB/c y C57BL/6 a la edad del destete con una cepa STEC y observamos diariamente su estado de morbi-mortalidad. Además, comparamos la respuesta de ambas cepas frente a la intoxicación con Stx y realizamos ensayos de colonización y excreción bacteriana, estudios histológicos de intestino y riñón, análisis funcionales de la permeabilidad intestinal, así como también estudios para evaluar la participación de la microbiota intestinal en las infecciones. Por último, caracterizamos la respuesta inmune humoral antiinfecciosa, la función efectora de los anticuerpos específicos encontrados y su relevancia en la prevención de la enfermedad sistémica.

Encontramos que, frente a la misma dosis infectiva, los ratones BALB/c presentan una mayor sobrevivencia en comparación a los ratones C57BL/6 infectados, los cuales mueren con daño renal. Observamos que los ratones de ambas cepas son igualmente sensibles a la intoxicación con Stx y presentan una carga bacteriana similar. A pesar de esto, encontramos que los ratones C57BL/6 infectados presentan una mayor permeabilidad intestinal y mayor daño histológico, tanto en intestino como en riñón, en comparación con los ratones BALB/c infectados. El principal hallazgo diferencial encontrado entre estas cepas murinas es que los ratones BALB/c desarrollan rápidamente anticuerpos específicos anti-Stx y anti-bacteria con capacidad opsonizante y/o neutralizante, ausentes en los ratones C57BL/6. A su vez, al depletar de linfocitos B a los ratones BALB/c observamos, como es esperado, ausencia de anticuerpos específicos y un significativo incremento en la mortalidad frente a la infección.

Estos hallazgos nos permitieron concluir que la rápida producción de anticuerpos anti-bacteria y anti-toxina es central para la definición de las infecciones con STEC y que, si bien no se obtuvieron resultados concluyentes, la microbiota intestinal podría participar en la protección al competir con el patógeno por un mismo nicho ecológico y/o al estimular al sistema inmune de mucosas.

Al determinar que los anticuerpos específicos tienen un papel fundamental en la resolución de las infecciones, nos propusimos generar una respuesta inmune humoral en mucosa intestinal capaz de neutralizar los factores patogénicos involucrados en la colonización bacteriana.

Seleccionamos a la flagelina H7, una proteína relevante en la patogénesis bacteriana y con alta inmunogenicidad, para realizar planes de inmunización y caracterizar la respuesta inmune humoral y celular específica, así como también la protección de ratones adultos frente a la infección en un modelo de SUH utilizando antibiótico.

Observamos que los ratones inmunizados con flagelina H7 presentan altos títulos de anticuerpos específicos en plasma y en materia fecal. Además,

desarrollan una respuesta celular T específica con un perfil mixto Th1/Th2/Th17. Encontramos que, frente al desafío infeccioso, todos los ratones inmunizados con flagelina H7 sobreviven hasta la finalización de los experimentos en comparación a los ratones controles, que mueren con daño renal.

Estos mecanismos inmunológicos, fundamentalmente la producción de anticuerpos específicos anti-flagelina H7, participan en la protección de los ratones inmunizados frente a la infección con una dosis letal de STEC.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis nos permiten concluir que la respuesta inmune humoral específica anti-bacteria en la mucosa intestinal es relevante en el control y la resolución de la infección, así como también en la prevención del desarrollo del SUH.

# **Hipótesis de trabajo y objetivos**



**Hipótesis de trabajo:** La respuesta inmune humoral local y sistémica desencadenada durante las infecciones con cepas STEC O157:H7 determina su resolución en el tracto gastrointestinal o, por el contrario, la evolución hacia complicaciones sistémicas.

**Objetivo general:** Comprender qué mecanismos se montan en un hospedador con capacidad para limitar y/o contener la patogenicidad de las cepas STEC O157:H7. Utilizar este conocimiento para la selección de un candidato vacunal que contribuya a reducir la alta incidencia del SUH en nuestro país.

**Frente a este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos.**

1. Evaluar el impacto de los factores genéticos y epigenéticos frente a la infección con cepas STEC O157:H7 en un modelo murino de SUH. Para ello nos propusimos:
  - 1.1. Estudiar la evolución de la infección con cepas STEC O157:H7 en dos cepas murinas genéticamente distintas (ratones BALB y C57).
  - 1.2. Caracterizar la respuesta inmune humoral específica desencadenada, así como también la función efectora de los anticuerpos y su relevancia en la protección frente a la infección.
  - 1.3. Evaluar la influencia de la microbiota intestinal en las infecciones por STEC O157:H7.
  
2. Evaluar si el desarrollo de una respuesta inmune humoral en mucosa que limite el daño local durante la infección con cepas STEC O157:H7 es suficiente para evitar la progresión a SUH.
  - 2.1. Seleccionar un factor de virulencia involucrado en la colonización intestinal y con capacidad inmunogénica.
  - 2.2. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular específica.
  - 2.3. Evaluar la protección de los ratones inmunizados frente al desafío con una dosis letal de STEC O157:H7.

# Introducción



## **1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.**

El síndrome urémico hemolítico (SUH) está caracterizado por la tríada anemia hemolítica no autoinmune, trombocitopenia y falla renal aguda. Se distinguen dos formas de presentación del SUH que difieren en su etiología: el SUH asociado a infecciones por cepas de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en el que los pacientes usualmente presentan pródromo gastrointestinal, o el SUH mediado por una disfunción en la regulación de la vía alterna del complemento que da como resultado su activación desinhibida, conocido como SUH atípico (aSUH) [Jokiranta. 2017]. La presentación clínica y la patología renal son similares, independientemente de la causa primaria.

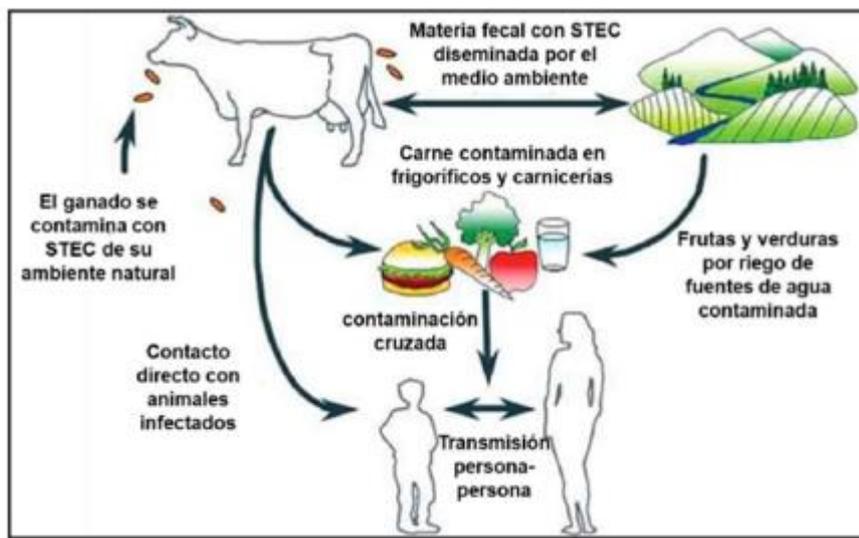
El aSUH es una enfermedad genética y poco frecuente que puede presentarse durante la niñez o la adultez, y los episodios pueden ser disparados por infecciones febriles del tracto respiratorio o gastrointestinal, trasplantes o el embarazo [Fakhouri y col., 2010; Kavanagh y col., 2013]. El aSUH está asociado a mutaciones, reordenamiento genético o delección en un gen que codifica para componentes del complemento o a autoanticuerpos contra factores reguladores o proteínas del complemento. Las mutaciones pueden involucrar pérdida de función en reguladores como el factor H, el factor I, la proteína cofactor de membrana o trombomodulina; o una ganancia de función en C3 o el factor B [Karpman y col., 2017]. La enfermedad asociada a mutaciones del complemento o autoanticuerpos contra el factor H se encuentra en el 70% de los pacientes [Loirat y col., 2016]. En el aSUH la activación descontrolada y deposición del complemento sobre el endotelio del hospedador genera daño endotelial que expone en superficie al factor tisular, con el cual interactúan las plaquetas activadas agregándose y, finalmente, dando lugar a la formación de coágulos con la consecuente fragmentación de los glóbulos rojos [Jokiranta. 2017]. Sin embargo, han sido descritos casos de aSUH con función normal del sistema complemento. En esos pacientes se han detectado defectos en la proteasa ADAMTS 13, cuya función consiste en inactivar multímeros del factor de von Willebrand, favoreciendo su persistencia en circulación y estimulando la

agregación plaquetaria y la lesión endotelial [Manea y Karpman. 2009; Karpman y col., 2017].

Otras formas de presentación del SUH están asociadas a: otras bacterias productoras de Stx (como *Shigella dysenteriae* y *S. sonnei*) y bacterias productoras de neuraminidasa (como *Streptococcus pneumoniae*), responsables de casos raros de SUH [Adams y col., 2017; Borkowska y col., 2020; Datta y col., 2021].

La causa más común de SUH es la que se da secundaria a infecciones con STEC. En nuestro país, este síndrome presenta un comportamiento endemo-epidémico diagnosticándose de 200 a 400 nuevos casos anuales, presentando la mayor incidencia a nivel mundial, incluso significativamente mayor que en el resto de los países de América Latina. Durante la última década, la tasa de incidencia anual fue de 6-10/100.000 niños menos de 5 años; grupo etario al que afecta principalmente [Boletín Epidemiológico Nacional N° 663. 2023]. Como consecuencia de esta alta tasa de incidencia, el SUH es la primer causa de falla renal en la niñez y la segunda causa de trasplante renal en la adolescencia en Argentina [Pianciola y Rivas. 2018; Carbonari y col., 2022].

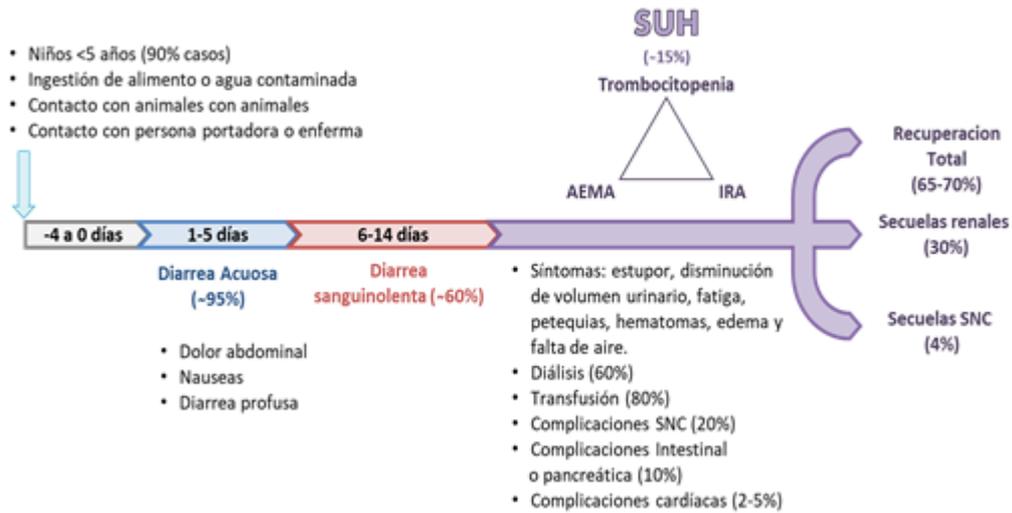
Las vías de transmisión incluyen el consumo de alimentos contaminados con cepas STEC presentes en la carne insuficientemente cocida, vegetales, jugos naturales o leche (incluyéndose derivados lácteos) sin pasteurizar, contaminación cruzada de productos alimenticios o de utensilios, consumo de agua contaminada, transmisión persona a persona o el contacto con animales portadores de STEC [Terijama y col., 2017; Torres y col., 2018]. Se requiere de una dosis infectiva baja, de 10-100 unidades formadoras de colonias (UFC), y el SUH asociado a cepas STEC no suele recurrir [Karpman y col., 2017; Idland y col., 2022]



**Imagen 1.** Representación de las vías de transmisión de cepas STEC (Scalise, 2021).

La proporción de pacientes expuestos a STEC que desarrollarán diarrea varía considerablemente en función de factores inmunológicos, características particulares de las cepas, así como también características del individuo y factores ambientales y de comportamiento [Dundas y col., 2001; Gould y col., 2013]. Una media de 4 días luego de la ingestión del inóculo, los pacientes usualmente presentan diarrea, náuseas y dolor abdominal [Terijama y col., 2017]; los vómitos y la fiebre son menos frecuentes. La diarrea sanguinolenta sólo ocurre en un segundo estadio entre 1 a 5 días luego del comienzo de los síntomas [Tarr. 2009]. La complicación más severa es la colitis hemorrágica, la cual puede incluso requerir escisión del intestino o generar prolapso rectal [De Buys Roessingh y col., 2007; Rahman y col., 2012]. La infección se limita al colon y no es propensa a bacteriemia [Karpman y col., 2017]. Por otro lado, la proporción de pacientes infectados con cepas STEC que evolucionaran a la enfermedad sistémica, el SUH, es aproximadamente el 10-15%; mientras que un 85-90% de los pacientes infectados resolverá espontáneamente la infección o no presentará sintomatología alguna [Gould y col., 2013; Khalid y Andreoli. 2018]. Los pacientes con SUH presentan típicamente signos de falla renal, como edema, oliguria y/o presión arterial alta, proteinuria, hematuria y leucocituria, como también niveles séricos elevados de creatinina y urea [Corrigan y Boineau. 2001; Ahmed Ali y col., 2017]. También, se pueden observar signos como hematomas, petequias, estupor, falta de aire y fatiga. Además, pueden presentar manifestaciones

extrarrenales como alteraciones cardíacas, neurológicas, respiratorias, pancreáticas y hepáticas [Karpman y col., 2017].



**Imagen 2.** Esquema donde se representa la fisiopatología de la infección por *E. coli* enterohemorrágico (Pineda, 2022).

Las alteraciones histológicas observadas en el colon consisten en erosiones y ulceraciones del epitelio que llevan a perforación transmural en casos severos, edema, hiperemia, infiltrado inflamatorio y hemorragia, exudados de fibrina, trombosis vascular, necrosis mural o de mucosa y formación de pseudomembrana [Karpman y col., 2017].

El riñón es el principal órgano blanco y los pacientes con SUH asociado a STEC suelen presentar en la etapa aguda patología renal debida a la coagulación intravascular y al daño tubular directo, mientras que las lesiones tardías o crónicas están relacionadas con la isquemia producida por la trombosis vascular. En biopsias de pacientes con SUH se observa retracción del glomérulo, desprendimiento del endotelio capilar glomerular de la membrana basal y, ocasionalmente, necrosis e hiper celularidad y proliferación mesangial. Las arterias y arteriolas presentan disminución del lumen debido a la expansión del subendotelio, proliferación e hinchazón de la íntima como consecuencia de la acumulación de glóbulos rojos y fibrina, y necrosis y trombosis de la pared. Frecuentemente se observa daño con atrofia y necrosis en los túbulos proximales corticales, así como también una marcada fibrosis intersticial [Remuzzi y Ruggenti. 1995; Porubsky y col., 2014].

Algunos pacientes con SUH asociado a STEC desarrollan síntomas neurológicos después de una media de 4 días luego del desarrollo de la enfermedad sistémica, y todas las estructuras del sistema nervioso central pueden ser afectadas. Las principales manifestaciones son coma y convulsiones, aunque también pueden ocurrir síndromes piramidales o extrapiramidales, así como defectos focales [Nathanson y col., 2010]. Las manifestaciones neurológicas, la leucocitosis y la trombocitopenia son factores relacionados con mal pronóstico [Karpman y col., 2017; Costigan y col., 2022].

## **2. EL AGENTE ETIOLÓGICO Y SUS FACTORES DE VIRULENCIA.**

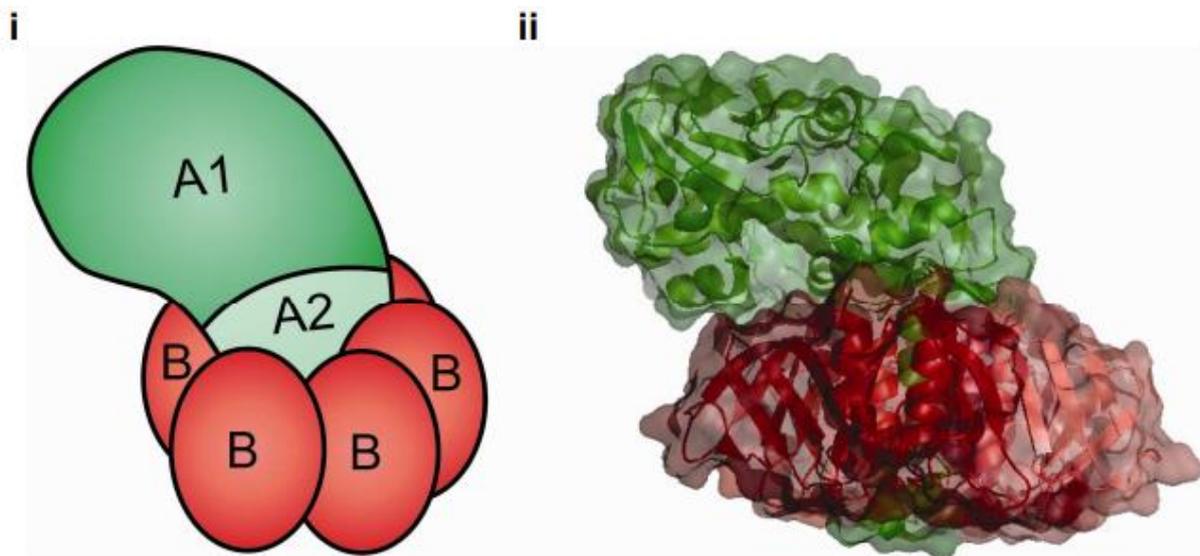
Las cepas de *Escherichia coli* que son capaces de causar enfermedad en individuos sanos, principalmente diarrea, pueden ser clasificadas en 6 grupos: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* de adherencia difusa y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Estas se diferencian en base a sus características patogénicas que reflejan su perfil de virulencia [Croxen y col., 2013; Gomes y col., 2016]. Se hace referencia al término STEC para denotar a aquellas cepas de *E. coli* diarreogénicas que tienen en común la presencia de un bacteriófago  $\lambda$  temperado inserto en su cromosoma, el cual posee los genes que codifican para la producción de la Stx [Croxen y Finlay. 2010]. Las cepas de STEC constituyen un grupo pleiotrópico de aislamientos que incluye varios serogrupos y serotipos. Dentro de los cuales algunos poseen los factores de patogenicidad característicos de las cepas EHEC, como el caso de las cepas STEC O157:H7, que se destaca particularmente por ser el serotipo más frecuentemente asociado a enfermedad en humanos, desde diarrea y colitis hemorrágica hasta SUH [Guth y col., 2010]. La “O” se refiere al antígeno somático (parte inmunodominante de las moléculas de lipopolisacáridos), mientras que la “H” al antígeno flagelar. También, otros serotipos de STEC no-O157 están implicados en el SUH, principalmente en nuestro país los serotipos O145, O121, O26 y O174 [Rivas y col., 2016].

Los aislamientos clínicos de STEC O157:H7 se caracterizan por la presencia de un conjunto específico de genes, dentro de los cuales se destacan aquellos que codifican a la Stx, a la intimina, a la hemolisina A, al antígeno O157 y a la flagelina

H7 (H7) [Mellman y col., 2008; Pianciola y Rivas. 2018]. Las cepas que producen Stx2 son más virulentas que las que producen Stx1 e incluso Stx1 y Stx2, y están relacionadas con mayor frecuencia a SUH, principalmente aquellas que albergan al gen *stx2a* [Reiland y col., 2014]. En nuestro país, STEC O157:H7 es el agente etiológico responsable de más del 70% de los casos de SUH, y se observa una circulación casi exclusiva de este serotipo perteneciente al clado 8 hipervirulento, con un predominio del linaje I/II tanto en cepas humanas como bovinas y de los genotipos *stx2a/stx2c* [Pianciola y Rivas. 2018]. Por lo expuesto anteriormente, las características genóticas de las cepas que circulan en Argentina contribuyen a la alta incidencia del SUH en el país.

### 2.1. Toxina Shiga y su mecanismo de acción.

La Stx es un tipo de toxina AB<sub>5</sub> que consta de una subunidad A monomérica (32 kDa) enzimáticamente activa unida no covalentemente con una subunidad B pentamérica (7,7 kDa cada una), responsable de la unión al glucoesfingolípido globotriaosilceramida (Gb3, también conocido como CD77 o antígeno Pk en eritrocitos), un receptor específico en la superficie celular [Johannes y Römer. 2010].



**Imagen 3.** Estructura de la Stx. i. Esquema representativo de Stx, formado por la subunidad A (StxA), la cual se cliva en los fragmentos A1 y A2 y las cinco subunidades B que constituyen el homopentámero de unión al receptor (StxB). ii. Diagrama de cintas de Stx. Se puede observar como el fragmento A2 se inserta en

el poro central del pentámero de StxB. En verde se observa StxA y en rojo el pentámero StxB (Mejías, 2013).

La expresión de Gb3 en humanos está restringida a podocitos, células endoteliales (mayormente las situadas en la microvasculatura glomerular), plaquetas, centros germinales de linfocitos B, eritrocitos y neuronas [Kavaliauskiene y col., 2017]. En las células Gb3 positivas, el complejo Stx-Gb3 induce la invaginación de la membrana plasmática mediante endocitosis. Es importante destacar que este proceso inicial de invaginación está en manos de la estrecha conexión del Gb3 a balsas lipídicas, las cuales contienen caveolina donde su polimerización proporciona la plataforma sobre la que se forman los endosomas tempranos. A continuación, el complejo Stx-Gb3 se dirige desde los endosomas tempranos hacia el retículo endoplasmático a través de transporte retrógrado, lo que posibilita su escape de la degradación lisosomal, y durante el transporte la subunidad catalítica A es clivada en dos fragmentos por la proteasa furina: A1 (27,5 kDa) y A2 (4,5 kDa). En el retículo endoplasmático, el puente disulfuro que une a ambos fragmentos es reducido y el fragmento A1 se transloca hacia el citoplasma, por transporte anterógrado, donde ejerce sus efectos citotóxicos mediante la eliminación de una base de adenina en la posición 4324 del ARN ribosómico 28S, subunidad componente de los ribosomas eucariotas, inhibiendo así la síntesis de proteínas. Sin embargo, la síntesis de proteínas no es la única responsable de la muerte celular; la translocación del fragmento A1 al citoplasma da como resultado la inducción de apoptosis no sólo debido al estrés ribotóxico, sino también por la liberación de citoquinas y quimioquinas [Römer y col., 2007; Müthing y col., 2009; Kavaliauskiene y col., 2017].

La Stx existe como dos variantes inmunológicamente distintas, Stx1 y Stx2, que comparten la misma estructura y función, pero no están neutralizadas de forma cruzada con anticuerpos heterólogos debido a que comparten solamente un 50% de homología y hasta el presente se describieron 6 subtipos para Stx1 y 16 subtipos para Stx2. Entre las producidas por los aislamientos de STEC en

humanos, los subtipos Stx2a y Stx2c muestran la mayor asociación con enfermedad severa y SUH [Rivas y col., 2006; Scheutz y col., 2012]. Tanto la Stx1 como la Stx2 están codificadas en el genoma del profago  $\lambda$  temperado. El daño al ADN y señales de estrés activan a la respuesta SOS bacteriana, la cual conduce a la transcripción secuencial de genes tempranos y tardíos del fago. Los genes tempranos son responsables de la replicación del genoma del fago, aumentando así el número de copias del gen *stx2* dentro de la bacteria, y los genes tardíos conducen a la producción de Stx2, la lisis bacteriana y a la liberación de toxinas [Wagner y Waldor. 2002].

Con relación a la actividad *in vivo* de las distintas variantes de la Stx, se ha demostrado en estudios en ratones que la dosis letal 50 de la Stx2 es de 100-400 veces mayor que para la Stx1. La Stx2 es más estable que la Stx1, aunque la Stx1 posee mayor afinidad por el Gb3 que la Stx2. Sin embargo, la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de ambas toxinas es equivalente [Melton-Celsa. 2014].

## **2.2. Lipopolisacárido (LPS) O157.**

La característica de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas es la presencia de dos membranas celulares donde el LPS se encuentra exclusivamente en la superficie de la membrana externa. Las células inmunes del hospedador reconocen al LPS de las bacterias como un antígeno exógeno y montan mecanismos de defensas que contribuyen a eliminarlas [Simpson y Trent. 2019].

Trazas de LPS absorbido en el tracto gastrointestinal inflamado o la estimulación de la mucosa por el LPS podrían ser suficientes para inducir una respuesta inmune sistémica, particularmente inflamatoria y protrombótica en pacientes con SUH. Estudios *in vivo* llevados a cabo en modelos murinos (o animales) demostraron que la toxicidad de la Stx es incrementada por el LPS, y las lesiones microangiopáticas trombóticas renales, similares a las observadas en pacientes con SUH, son reproducidas por inyección endovenosa (e.v.) de Stx junto con LPS [Palermo y col., 2000; Keepers y col., 2006; Sauter y col., 2008]. Muchas sustancias, incluyendo prostaglandinas, citoquinas, factores procoagulantes y vasoactivos, son estimulados por el LPS [Shultz y Raji. 1992]. Entre ellos, el factor

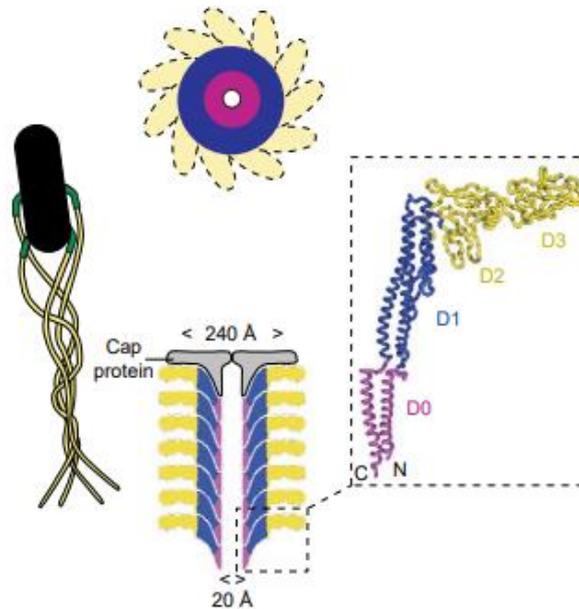
de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL) 1 e IL-6 aumentan considerablemente la expresión de receptores para la Stx y sensibilizan a las células endoteliales de la microvasculatura (glomerular y otras) a la injuria inducida por la Stx [Tesh y col., 1994; van Setten y col., 1997]. De manera recíproca, se sugirió que la Stx incrementaría los efectos procoagulantes del LPS [Louise y Obrig. 1992].

### **2.3. Flagelo H7.**

El flagelo, y todas las proteínas que lo componen, son secretados y ensamblados por un sistema de secreción tipo III (T3SS); particularmente el T3bSS [Altegoer y Bange. 2015; Diepold y Armitage. 2015]. Estructuralmente es un filamento largo que se proyecta hacia el exterior de la superficie bacteriana y en *E. coli*, los flagelos son peritricos, es decir, poseen más de uno y se distribuyen por toda la superficie celular [DiLuzio y col., 2005]. El filamento externo se compone de una proteína llamada flagelina y está anclado a una proteína llamada “proteína de codo” o “gancho”, que está próxima a la superficie celular y su función es articular la unión entre el filamento y el cuerpo basal; además, el filamento externo es el encargado de transmitir el movimiento. El cuerpo basal está dentro de la pared celular y anclado a la membrana plasmática; consta de un conjunto de proteínas necesarias para el movimiento [Herlihey y Clarke. 2017].

Como se mencionó anteriormente, la flagelina es el monómero estructural del flagelo bacteriano y tiene la particularidad de desencadenar una respuesta inflamatoria en el hospedador a través de distintos receptores de la respuesta innata, particularmente el receptor tipo Toll (TLR) 5. Estructuralmente, la flagelina se caracteriza por presentar 4 dominios globulares denominados D0, D1, D2 y D3 [Lu y Swartz. 2016]. Las regiones N y C-terminal de los dominios D0 y D1 están altamente conservados entre distintas especies bacterianas [Beatson y col., 2006] y resultan fundamentales para el ensamblaje del flagelo [Murthy y col., 2004], mientras que los dominios D2 y D3 constituyen una región hipervariable entre cepas y especies en tamaño y secuencia que resulta altamente

inmunogénica [Steimle y col., 2019]. La zona de interacción con el receptor TLR5 se ubica en el dominio D1 [Lu y Swartz. 2016].



**Imagen 4.** Estructura y organización del flagelo y la flagelina. Se representan a los flagelos como las estructuras que sobresalen de las bacterias: en color verde oscuro se observa a las proteínas codo o gancho y en amarillo a los filamentos externos. Se representan vistas esquemáticas transversales y longitudinales del flagelo y un diagrama de cinta de la flagelina. Los dominios globulares de flagelina están esquematizados de la siguiente manera: las cadenas de α-hélice terminales (D0, púrpura), las cadenas de α-hélice centrales (D1, azul) y la región hipervariable con hojas β plegadas (D2 y D3, amarillas). Tomado de la revisión de Ramos y colaboradores, 2004.

Por un lado, la flagelina es capaz de promover respuestas proinflamatorias a través del TLR5, que se ubica en la membrana plasmática de determinadas células del sistema inmune; y, por otro lado, la presencia de flagelina en el citosol de células mieloides desencadena la activación del inflamasoma [Lightfield y col., 2008; Vijay-Kumar y col., 2010]. Esta respuesta se caracteriza por la secreción de diversas citoquinas y quimioquinas mediadas por el factor de transcripción NF-κB y la proteína adaptadora MyD88. Dada su capacidad de estimular al sistema inmune y de inducir una robusta respuesta humoral, se ha propuesto a la flagelina como adyuvante de mucosas [Asadi Karam y col., 2016]. Una propiedad de la flagelina que resulta de interés es que activa la maduración de células dendríticas

(DC) presentes en distintas mucosas [Rumbo y col., 2006] y promueve la regulación positiva de moléculas coestimuladoras en su superficie, como el clúster de diferenciación (CD) 80 y 86 [Fougeron y col., 2015].

Estudios *in vitro* demostraron la relevancia que poseen los flagelos en la adherencia a líneas celulares epiteliales intestinales, así como también en la motilidad de *E. coli* [Haiko y Westerlund-Wikström. 2013; Nakamura y Minamino. 2019]. A su vez, demostraron ser relevantes en la colonización en un modelo de infección en pollitos y en un esquema de inmunización de vacas con H7 [Best y col., 2005; McNeilly y col., 2008]. Además, se ha demostrado que los genes que codifican para el flagelo de STEC O157:H7 no se expresan luego del contacto con el epitelio intestinal, sugiriendo que los flagelos presentan un rol importante en las primeras etapas del establecimiento de la colonización y una vez concretado dicho contacto, aumenta la expresión de los genes involucrados en la transcripción de los componentes del T3SS para establecer una unión a largo plazo a través de la interacción intimina-receptor de intimina (Tir) [Mahajan y col., 2009]. También, se ha demostrado que los flagelos interactúan directamente con la mucina, proteína que constituye la capa de mucus que recubre y protege todo el tracto gastrointestinal, y que induce *ex vivo* e *in vitro* sobre células T84 polarizadas la liberación de IL-8 y  $\beta$ -defensina 2 durante la infección con STEC O157:H7 [Erdem y col., 2007; Lewis y col., 2016]. Con relación a lo anterior, también se vio que la exposición de células epiteliales intestinales humanas a la H7 resulta en un aumento de la producción del ligando de quimioquina C-C (CCL) 20, con un marcado influjo de polimorfonucleares (PMN) y DC a la región subepitelial de la mucosa [Miyamoto y col., 2006; Farfan y col., 2013].

#### **2.4. Plásmido pO157.**

Este plásmido está presente en todas las cepas de STEC O157:H7, tiene un peso molecular de 92 kb y porta diversos genes que codifican para distintos factores de virulencia, dentro de los cuales se destacan: *espP* (codifica para una proteasa de serina que está involucrada en la colonización intestinal de terneros y en la adherencia a células epiteliales humanas *in vitro*), *katP* (catalasa-peroxidasa

que podría facilitar la colonización del intestino del hospedador reduciendo el estrés oxidativo), *hlyA* (hemolisina que forma poros en la membrana plasmática de las células eucariotas, como en los eritrocitos, contribuyendo a la lisis de éstos), *etpC* (sistema de secreción tipo II, el cual está involucrado en el ensamblaje del pili tipo 4 que está involucrado en la adherencia al epitelio intestinal y en la formación de biopelículas), *toxB* (modula la secreción de proteínas que son requeridas para la adhesión intestinal), *stcE* (metaloproteasa involucrada en la inhibición de la esterasa C1 del sistema del complemento, así como también en la reducción de la capa de mucus), *lifA/efa* (factor inhibidor de la activación de linfocitos) y *Saa* y *Sfp* (fimbrias involucradas en la etapa inicial de adherencia a los enterocitos) [Yoon y Hovde. 2008; McWilliams y Torres. 2014].

### **2.5. Isla de Patogenicidad cromosómica: locus para la destrucción del enterocito (LEE).**

El LEE codifica reguladores de la transcripción, los genes necesarios para la traducción de la adhesina intimina, los genes para el ensamblaje del T3SS responsable de la translocación de translocadores, chaperonas y proteínas efectoras incluyendo al Tir [Etcheverría y Padola. 2013].

Estas proteínas actúan en forma sincronizada y secuencial, generando finalmente la formación de las lesiones características del proceso de pegado y borrado (A/E) con la unión íntima de la bacteria al enterocito, la desorganización de las microvellosidades y la formación de estructuras similares a un pedestal rico en actina dentro del enterocito y debajo del sitio de adherencia [Garmendia y col., 2005; Yoon y Hovde. 2008]. La formación del pedestal requiere de la secreción de factores bacterianos en la célula del hospedador a través del T3SS. Este aparato de secreción consiste en una estructura tipo jeringa que conecta la membrana bacteriana con la membrana del enterocito. De esta forma, Tir es insertado en la membrana plasmática del enterocito, donde es fosforilado convirtiéndose en el receptor para la proteína de membrana externa bacteriana intimina. Finalmente, la unión de la intimina a Tir conduce al mencionado rearrreglo del citoesqueleto con la formación del pedestal de actina debajo de la bacteria [Frankel y Phillips. 2007; Ho y col., 2013; McWilliams y Torres. 2014]. La

diarrea acuosa observada inicialmente en las infecciones con cepas STEC está asociada a la formación de las lesiones A/E [Nataro y Kaper. 1998].

La presencia de LEE les confiere a las cepas STEC una mayor virulencia, pues los serotipos LEE positivos (como es el caso de las STEC O157:H7) aparecen más comúnmente asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE negativos [Terijama y col., 2016]. Sin embargo, es importante aclarar que la presencia de esta isla no es indispensable para la patogénesis, dado que un amplio número de cepas STEC LEE negativas son capaces de causar SUH en humanos [Bettelheim. 2007].

## **2.6. Otras adhesinas.**

Aunque la intimina es la adhesina principal en las STEC O157:H7, se destacan otras proteínas que están involucradas en la adhesión celular como las fimbrias polares largas (siendo LPF1 y LPF2 las presentes en las cepas O157:H7, las cuales interactúan con proteínas de membrana, tal como laminina, colágeno IV y fibronectina), la fimbria F9 y la fimbria tipo 1 (involucradas en la adhesión a células epiteliales y a superficies no abióticas), el pili común de *E. coli* (EcpA) (fortalece la colonización a través de la formación de microcolonias y/o biopelículas), Iha, Efa1 y los autotransportadores EhaA, EhaB y Sab (involucrados en la formación de biopelículas, en la adhesión a células del hospedador y en la autoagregación bacteriana) [McWilliams y Torres. 2014].

## **2.7. Otras Islas de Patogenicidad (PAI).**

La virulencia de patógenos bacterianos puede ser modulada por la adquisición de elementos genéticos móviles, como bacteriófagos, transposones, plásmidos, e islas genómicas [Lawrence. 2005]. En cepas STEC no-O157 se han identificado genes asociados con la virulencia: *ent*, *nleB* y *nleE* que se encuentran en la isla de patogenicidad denominada O-122 [Wickham y col., 2006]. Otras islas de patogenicidad descritas en cepas STEC no-O157 asociadas a casos de SUH fueron O57 y O71 [Coombes y col., 2008].

Las cepas LEE negativas poseen PAI que codifican sustratos translocados del T3SS que podrían tener un papel importante en la virulencia STEC. Particularmente, *nleB* es uno de los principales genes efectores propuesto como un marcador de virulencia que participa en la acción de T3SS durante la infección por cepas STEC LEE negativas [Cadona y col., 2020]. NleB es una glicosiltransferasa que modifica las proteínas del huésped con N-acetil-d-glucosamina para inhibir las respuestas antibacterianas e inflamatorias del hospedador permitiendo que las bacterias persistan en la primera etapa de la infección [Gao y col., 2013; Cadona y col., 2020].

Una nueva PAI es el locus de adhesión y autoagregación (LAA). LAA se ha asociado a enfermedades graves en humanos, cuyo posible predictor es el gen *hes*, que participa en varios fenotipos asociados a la colonización, que incluyen hemaglutinación, adhesión y autorregulación [Vélez y col., 2020]. El papel de LAA en la colonización intestinal se demostró en un modelo murino de infección con cepas STEC, sugiriendo que LAA también puede estar involucrado en la adherencia de STEC al intestino humano [Montero y col., 2019; Montero y col., 2020].

Recientemente se ha reportado que alrededor del 46% de cepas STEC aisladas en Argentina presentaron LAA. Las cepas fueron aisladas de diversos orígenes: ganado vacuno, carne, queso, y pertenecían a varios serotipos que incluyen O91, O103, O113 y O174, que han sido asociados a enfermedad en humanos. Por lo tanto, la detección de genes de LAA y *hes* en STEC podría complementar los esquemas actuales de evaluación genética, permitiendo clasificar las cepas STEC LEE negativas en cepas LAA positivas o LAA negativas [Vélez y col., 2020].

### **3. FISIOPATOLOGÍA DEL SUH.**

Una vez ingerida, la STEC O157:H7 debe atravesar varias barreras previo a la colonización intestinal. En primer lugar, debe resistir al pH ácido del estómago (3.5-4) y a las enzimas digestivas. Para ello, dicha bacteria posee 3 mecanismos de resistencia ácida: un mecanismo reprimido por glucosa y dos mecanismos dependientes de glutamato y arginina [Foster. 2004]. Aquellas bacterias que

logren resistir el pH ácido del estómago y el cambio brusco de pH al atravesar el duodeno (pH 6-8), deben atravesar la capa de mucus que protege a los enterocitos. Esto se consigue gracias a los elementos proteicos móviles (como flagelos, fimbrias y pilis) y con la secreción de metaloproteasas, como la StcE que reduce la capa de mucus más íntima en contacto estrecho con los enterocitos [Hews y col., 2017]. A través de los distintos factores de patogenicidad descritos en el inciso 2, las cepas patógenas logran adherirse firmemente al enterocito y subvertir su fisiología. La Stx juega un papel en reforzar la adherencia de STEC O157:H7 al epitelio aumentando la expresión de nucleolina, otro receptor de superficie de la intimina [Robinson y col., 2006]. También, las bajas concentraciones de oxígeno en el intestino facilitan la adherencia de STEC al epitelio [Carlson-Banning y Sperandio. 2016].

Cuando se establece la colonización intestinal, como respuesta a la injuria ocasionada por el patógeno, las células epiteliales liberan citoquinas y quimioquinas que junto con la acción de péptidos antimicrobianos y secreción de mucina generan un entorno inflamatorio atrayendo células presentadoras de antígeno y neutrófilos. Una vez en el foco de infección, los neutrófilos se degranulan liberando diversas enzimas como peroxidasas, lisozima, defensinas, hidrolasas ácidas y una variedad de proteasas neutras, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan principalmente a las membranas bacterianas y la pared celular. Todo este entorno inflamatorio genera estrés en la bacteria patógena, que se ve reflejado en la activación de la respuesta SOS y como se mencionó anteriormente, en la lisis bacteriana y liberación de viriones y Stx [Bridger y col., 2010; Bruballa y col., 2020; Węgrzyn y Muniesa. 2021]. Otros autores proponen además un sistema de secreción bacteriana para Stx que no requiere la lisis, sino que involucra a vesículas de membrana externa que se desprenden naturalmente de la membrana de las bacterias Gram negativas. Las vesículas de membrana externa formadas durante la infección bacteriana podrían ser fusionadas a la membrana plasmática de la célula epitelial o internalizada por la misma mediante endocitosis, y así contribuir al daño epitelial accediendo a la circulación sistémica [Bielaszewska y col., 2017].

Existen varias rutas posibles de translocación de Stx del lumen intestinal hacia la circulación sistémica en los primeros estadios de la infección, entre las que se destacan:

- **La transcitosis:** a través de células epiteliales Gb3 negativas (mediante una vía transcelular independiente del transporte retrógrado, el cual involucra el pasaje de los endosomas tempranos directamente al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico), a través de células Gb3 positivas (se demostró que el LPS, citoquinas proinflamatorias y la infección con STEC pueden aumentar la expresión de Gb3 en células epiteliales y endoteliales y, por lo tanto, llevar a la transcitosis de Stx mediante transporte retrógrado o independiente de esta vía; a su vez, se observó la expresión de Gb3 en células de Paneth y la unión de la Stx a éstas podría proporcionar un sitio de entrada hacia los tejidos subyacentes) o a través de células M (las cuales captan y translocan mediante endocitosis antígenos luminales, dentro de los cuales también se incluyen a toxinas bacterianas. Cabe destacar que las STEC se adhieren predominantemente en los folículos linfoides aislados (FLA) del colon y en este área se concentran las células M) [Schüller. 2011]
- **La translocación paracelular:** la infección con STEC genera una redistribución de las proteínas involucradas en las uniones estrechas de las células epiteliales, y por lo tanto disminuye la función de la barrera epitelial. La disrupción de las uniones estrechas a causa de la infección o a causa de la transmigración de neutrófilos, como respuesta a la infección y a la injuria, puede proporcionar una ruta para que la Stx alcance la circulación sistémica [Schüller. 2011].

Una vez que alcanza la circulación sistémica, la Stx se une a su receptor en las células endoteliales de la microvasculatura en el riñón y en el sistema nervioso central. Se demostró *in vivo* que la Stx puede circular unida a glóbulos rojos (por su unión con Pk, el cual posee una estructura glicoesfingolípídica similar al Gb3), a plaquetas y leucocitos (neutrófilos y monocitos), o dentro de microvesículas liberadas por estas células sanguíneas, que le permiten ser endocitadas por sus

células blanco [Karpman y Ståhl. 2014; Ståhl y col., 2015]. El resultado de la apoptosis celular inducida por la Stx es que el endotelio adopta un fenotipo protrombogénico, con el que interactúan las plaquetas, induciendo su activación y agregación, y finalmente la formación de microtrombos [Karpman y col., 2001; Nestoridi y col., 2005]. Además, la Stx estimula la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas inflamatorias en el endotelio que potencian su citotoxicidad y promueve la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, lo que exacerba la trombosis y el daño tisular. La formación de microtrombos formados por agregados de plaquetas y leucocitos, lleva a la oclusión de la microvasculatura renal (promoviendo a la hipertensión) y la fragmentación de los glóbulos rojos circulantes dando como resultado la formación de esquistocitos y la liberación de hemoglobina [Karpman y col., 2017; Zoja y col., 2019]. La caída en el número de eritrocitos da lugar a la anemia hemolítica observada en pacientes con SUH y la formación de agregados de plaquetas disminuye el recuento plaquetario en sangre periférica, observándose trombocitopenia. La citotoxicidad directa de la Stx sobre los podocitos, las células tubulares renales y mesangiales y el daño en la microvasculatura glomerular deviene en una insuficiencia renal aguda de grado variable en los pacientes con SUH [Karpman y col., 2017]. Éstos pueden presentar cuadros de hipervolemia por retención hidrosalina debida a la disminución del filtrado glomerular, que también provoca elevación de los niveles de urea y creatinina en sangre y proteinuria [Mele y col., 2014; Burguet y col., 2022]. La oliguria y anuria son otras características frecuentes, siendo su duración variable [Oakes y col., 2008].

#### **4. TRATAMIENTOS PARA LA PREVENCIÓN DEL SUH.**

Hasta el momento no existen tratamientos específicos aprobados para su uso en humanos durante la fase de infección gastrointestinal o que controlen el daño específico producido por la Stx. El uso de antibióticos no es recomendado para el tratamiento de la infección con cepas STEC porque aumenta el riesgo de contraer SUH. Algunos antibióticos pueden inducir la fase lítica de los bacteriófagos que poseen el gen *stx*, con la consecuente lisis bacteriana y liberación masiva de Stx y/o LPS [Tarr y Freedman. 2022]. También, los agentes antiespasmódicos se

desaconsejan dado que impiden la liberación de la bacteria en las heces aumentando el tiempo de exposición a la toxina, por lo que resultan perjudiciales para el paciente [Fernández-Brando y Ramos. 2015]. Por otro lado, los tratamientos vigentes para pacientes con SUH son de soporte, y consisten en mantener la homeostasis y eliminar los metabolitos tóxicos generados como consecuencia de la falla renal aguda. Este tratamiento incluye terapia de reemplazo renal (diálisis peritoneal o hemodiálisis continua), hidratación y nutrición adecuadas, corrección de las alteraciones de electrolitos y de la acidosis, control de la hipertensión y las convulsiones y, por último, corrección del hematocrito mediante transfusiones de glóbulos rojos sedimentados [Karpman y col., 2017]. Tampoco se recomienda el uso de agentes antiinflamatorios no esteroideos porque pueden disminuir el flujo sanguíneo del riñón [Tidmas y col., 2022]. Además, se desaconseja el uso de agentes antitrombóticos en niños con SUH porque la hipertensión, la azotemia (exceso de cuerpos nitrogenados en sangre) y la trombocitopenia pueden aumentar el riesgo de hemorragia intracraneal [Tarr y col., 2005].

Debido a que la mayoría de los tratamientos específicos se encuentran aún en fase experimental, la prevención continúa siendo de suma importancia. Las principales medidas preventivas contra el SUH se basan en evitar contraer la infección con cepas STEC mediante la cocción completa de los alimentos cárnicos, una correcta higiene en el lugar donde se preparan los alimentos, una buena higiene personal para reducir la transmisión de patógenos de persona a persona por la ruta fecal-oral, consumir lácteos pasteurizados y aguas seguras, etc. [Terajima y col., 2016]

Particularmente en nuestro país se requieren, además, controles más rigurosos en todos los puntos de la cadena alimentaria que aseguren el cumplimiento de las leyes y normativas de control bromatológico, y políticas educativas dirigidas a toda la población que permitan a los consumidores y a aquellos que manipulan alimentos, conocer las medidas sanitarias necesarias para tener una alimentación segura.

#### **4.1. Tratamientos dirigidos a reducir la colonización del ganado.**

Una alternativa para disminuir la incidencia del SUH y/o los efectos secundarios de las infecciones con STEC en humanos sería desarrollar vacunas para el ganado con el fin de reducir la carga de STEC en las heces, y así minimizar la contaminación ambiental y en los derivados cárnicos. El principal problema al intentar la inmunización en ganado es que las cepas de STEC son capaces de colonizar el intestino bovino por meses produciendo sólo una diarrea transitoria y sólo en los terneros, no produciendo enfermedad ya que su riñón no expresa Gb3 [Biernbaum y col., 2023].

Algunos de los antígenos blanco para la vacunación del ganado han incluido proteínas involucradas en la colonización (proteínas del sistema de secreción tipo III, intimina) o el LPS O157. Así se han ensayado distintas formulaciones de vacunas compuestas por subunidades de proteínas dirigidas a 1) polipéptidos de intimina, 2) la proteína EspA, 3) H7, 4) EspA y Tir y 5) intimina y EspB administradas por distintas rutas (principalmente intramuscular y/o intranasal) a terneros, bajo distintos protocolos. Todas ellas indujeron una buena respuesta de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en la mucosa intestinal, observándose diferencias significativas en la colonización y en la excreción bacteriana luego de la exposición con cepas STEC O157; sin embargo, ninguna de ellas ha logrado erradicar la persistencia de estas bacterias en el intestino bovino [Dziva y col., 2007; McNeilly y col., 2008; McNeilly y col., 2010; Vilte y col., 2011]. En conformidad con lo anterior, una vacuna inactivada (compuesta por una cepa STEC O157 inactivada con formalina) indujo también una buena respuesta de anticuerpos a nivel sistémico y en mucosa, logrando reducir los niveles de excreción y colonización iniciales en el intestino bovino, pero de manera transitoria [van Diemen y col., 2007]. Una vacuna para animales está disponible de manera comercial, licenciada por Zoetis Animal Health, y consiste en un extracto bacteriano de *E. coli* O157 junto con receptores de sideróforos y porinas. Estas vacunas no cuentan con antígenos definidos, sino más bien con un cóctel dentro del cual se incluye al LPS O157. Por otro lado, los receptores de sideróforos y porinas están dirigidos contra proteínas utilizadas por las bacterias

Gram negativas para el transporte de hierro, presentes en la superficie bacteriana. La limitación del hierro hace que las STEC O157 se encuentren en desventaja competitiva en relación con otras bacterias intestinales, disminuyendo su capacidad de colonizar y duplicarse [Thomson y col., 2009]. Un estudio realizado recientemente mostró que esta vacuna redujo significativamente la prevalencia y la excreción bacteriana en terneros desafiados oralmente con STEC O157 [Thornton y col., 2009].

Si bien la vacunación no logra erradicar la persistencia de las bacterias STEC en el intestino bovino, logra reducir su excreción significativamente; por lo tanto, una alternativa interesante a tomar en cuenta es el tratamiento del ganado previo a la faena para así reducir de alguna manera la contaminación ambiental y de los productos cárnicos, y evaluar si de esta forma se logra reducir la incidencia y/o los efectos de la infección con STEC en humanos. En este contexto, también se observó que la administración de un cóctel de bacterias *E. coli* no patógenas, o el uso de bacteriófagos, son estrategias capaces de reducir significativamente la excreción de *E. coli* O157:H7 en el ganado adulto, y en los terneros neonatales y al destete [Zhao y col., 2003; Rozema y col., 2009].

#### **4.2. Tratamientos dirigidos a la prevención del SUH en humanos.**

La otra opción es la vacunación en los humanos. En este caso, las opciones serían el bloqueo de la toxina o bien, el bloqueo de la de adherencia de la bacteria al intestino. El hecho que la reincidencia de SUH sea un suceso muy raro, sugiere que la presencia de anticuerpos anti-Stx y anti-STECS en pacientes recuperados, pueden generar protección frente a nuevos eventos infecciosos. Esto confirma la capacidad fisiológica de montar una respuesta inmune protectora, lo cual convertiría a la vacunación contra Stx o contra otros factores de virulencia de las bacterias STEC en una opción viable.

#### 4.2.1. Prevención de la infección con cepas STEC.

Hace unos años se ensayó en Estados Unidos una vacuna conjugada contra LPS O157 en niños de 2 a 5 años, considerándose la población de riesgo. En este estudio no se observaron efectos adversos al aplicar la vacuna y un 81% de los niños vacunados generó una respuesta de anticuerpos anti-LPS en suero con actividad bactericida *in vitro*. Las vacunas dirigidas contra el LPS podrían también ser efectivas contra las STEC, ya que los anticuerpos en suero específicos para LPS serían capaces de filtrarse al lumen intestinal en cantidades suficientes para bloquear la colonización. Sin embargo, no pudo comprobarse su efectividad para disminuir los casos de SUH [Ahmed y col., 2006].

La inmunización a través de las mucosas, especialmente la vía oral y nasal, es de mucho interés, sobre todo para la prevención de enfermedades infecciosas, ya que la gran mayoría de ellas ocurren o comienzan desde una superficie de mucosa y la aplicación tópica de una vacuna resulta atractiva para inducir una respuesta inmune protectora en el lugar de la infección. Sin embargo, a pesar de estas características, en la práctica resulta difícil estimular una fuerte respuesta inmune protectora de anticuerpos en mucosa mediante la administración oral/nasal de antígenos. Hasta la fecha, vacunaciones en mucosa utilizando antígenos proteicos solubles han dado resultados pobres, con muy pocas excepciones en humanos [De Magistris. 2006; Li y col., 2020]. Sin embargo, hay un fuerte desarrollo de vacunas en fase preclínica que apuntan a la inducción de una respuesta específica anti-STECC en mucosas, mediante distintas vías de administración, fundamentalmente oral y nasal. Entre ellas, se destacan formulaciones que consisten en vacunas inactivadas. Arshadi y colaboradores diseñaron en dos estudios distintos dos formulaciones vacunales, una basada en bacterias STEC inactivadas por calor y/o formalina y otra basada en la misma inactivación de las bacterias, pero además agrega a la formulación la subunidad B de la toxina Shiga variante 2 (Stx2B) unida a quitosano, administradas a ratones de manera oral. La formulación que utiliza bacterias STEC con bacterias inactivadas con formalina con o sin quitosano unido a Stx2B mostró una antigenicidad mayor, con niveles significativos de anticuerpos anti-STECC en la mucosa intestinal y una

reducción significativa en la excreción bacteriana. A su vez, dichas formulaciones mostraron una respuesta inmune protectora frente al desafío de ratones con *E. coli* O157:H7 [Arshadi y col., 2020; Arshadi y col., 2022].

Otra propuesta consiste en el desarrollo de una vacuna de ADN que codifica secuencias conservadas del factor de EHEC para la adherencia-1 (*efa-1*´). La administración intranasal a ratones del plásmido de ADN que porta el gen *efa-1*´ logró inducir una respuesta de anticuerpos específicos en el suero y en la mucosa nasal y broncoalveolar, una respuesta celular específica de linfocitos T CD4+ de memoria y una respuesta inmune protectora frente al desafío con *E. coli* O157:H7 cepa EDL933 [Riquelme-Neira y col., 2016].

Otros autores desarrollaron candidatos vacunales con subunidades de proteínas. Una de las formulaciones vacunales consiste en el uso de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) conteniendo una proteína de intimina fusionada a H7. La administración oral de la formulación a ratones indujo una respuesta inmune de anticuerpos robusta con niveles significativos de anticuerpos específicos anti-intimina y anti-H7 en la mucosa intestinal, así como también una respuesta inmune protectora ya que todos los ratones inmunizados sobrevivieron al desafío infeccioso con 100 dosis letales 50% de una cepa de STEC O157:H7 [Abianeh y col., 2023]. Por otro lado, otro candidato vacunal de subunidades de proteínas consiste en la fusión de EspA, Tir, Stx2B y el pili de *E. coli* enterohemorrágico (HcpA). Los ratones inmunizados con esta proteína quimérica fueron capaces de reducir significativamente la excreción bacteriana al ser desafiados con una cepa STEC O157:H7 y, además, desarrollaron anticuerpos específicos con capacidad neutralizante, evaluada tanto *in vivo* (mediante la administración e.v. de Stx2) como *in vitro* (determinado mediante ensayos de citotoxicidad y del bloqueo de la adhesión de bacterias STEC a células epiteliales) [Kordbacheh y col., 2019].

Otra alternativa ha consistido en el diseño de vacunas polisacáridas conjugadas a proteínas. Ma y colaboradores diseñaron un candidato vacunal con el antígeno O157 conjugado con la proteína de unión a maltosa. Los autores

encontraron en ratones inmunizados con esta formulación anticuerpos específicos en suero con capacidad bactericida, así como la presencia de anticuerpos específicos en intestino, y una respuesta inmune celular específica. Sin embargo, en este estudio no se realizan ensayos en los que se evalúe la respuesta inmune protectora frente a la infección con cepas STEC [Ma y col., 2014].

Otros desarrollos consisten en la administración oral de bacterias no patógenas o atenuadas que fueron transformadas con plásmidos de ADN que codifican para la expresión de proteínas relevantes para la patogenicidad de las cepas STEC. Entre estos podemos mencionar la plataforma que consiste en la inserción de un plásmido de ADN que codifica para la proteína de fusión compuesta por EspA y el dominio central del Tir en *Lactobacillus acidophilus*. Los ratones inmunizados oralmente con estas bacterias desarrollaron una robusta respuesta inmune de anticuerpos en la mucosa intestinal y a nivel sistémico, así como también una respuesta inmune celular específica. A su vez, la inmunización protegió al 80% de los ratones de la muerte y redujo la colonización intestinal, así como el daño histológico en intestino y riñón [Lin, R y col., 2017]. Otros autores utilizaron la cepa atenuada de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* como una plataforma vacunal y desarrollaron una proteína quimérica formada por la combinación de determinadas secuencias peptídicas correspondientes a EspA, intimina, Tir y H7. Dicha construcción fue fusionada a una secuencia señal que dispara la síntesis de  $\beta$ -lactamasa en la cepa atenuada de *Salmonella sp.* Cuando las bacterias son expuestas a un agente  $\beta$ -lactámico, se induce la producción de esta enzima junto con la secreción de la quimera al espacio periplásmico bacteriano. La inmunización oral con esta plataforma vacunal desencadenó una respuesta inmune de anticuerpos específicos contra la proteína quimérica tanto en mucosa intestinal, así como también en suero, capaz de proteger a los ratones en un modelo de infección con *E. coli* O157:H7 [Iannino y col., 2022].

Muchas de las formulaciones mencionadas apuntan a prevenir tanto la fase infecciosa como la toxigénica y son capaces de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos anti-STECS en mucosa intestinal. Algunas de estas formulaciones

logran otorgar protección a ratones en modelos de SUH mediante infección con cepas STEC, manifestando que el bloqueo del primer paso en la cascada patogénica del SUH, que es la colonización intestinal, es suficiente para prevenir la complicación sistémica asociada a la infección con cepas STEC. Estos hallazgos hacen que resulte atractivo el desarrollo de plataformas vacunales que apunten a prevenir la infección con cepas STEC O157:H7 en humanos, en lugares donde este serotipo sea el más prevalente.

#### *4.2.2. Prevención del desarrollo del SUH.*

Dado que la Stx es el factor necesario para el desarrollo del SUH, uno de los primeros enfoques en la búsqueda de tratamientos específicos fue la idea de adsorber la Stx libre en el intestino a través de compuestos amorfos o inertes. Con este fin, se desarrolló y ensayó un compuesto cubierto con oligosacáridos conocido con el nombre comercial Synsorb® Pk, el cual fue diseñado para captar a la toxina en el lumen intestinal, y así limitar la cantidad y el tiempo de exposición del epitelio a la misma [Armstrong y col., 1995; Imdad y col., 2021]. Sin embargo, en ensayos clínicos no logró prevenir o disminuir la severidad de las complicaciones sistémicas [MacConnachie y Todd. 2004; Imdad y col., 2021]. El mayor inconveniente que tienen estos tratamientos es que trazas de Stx que logren escapar de dichos agentes bloqueantes en el intestino e ingresen a la circulación, serían suficientes para inducir SUH. Debido a estas consideraciones, se comenzaron a desarrollar polímeros del receptor para Gb3 para ser administrados por vía sistémica. Entre ellos Daisy, que al menos experimentalmente tiene capacidad para neutralizar tanto Stx1 como la Stx2. Con este mismo objetivo, se creó otro compuesto llamado SUPER TWIGS, que está formado por 18 trisacáridos de globotriaosilceramida, que no sólo une la Stx en circulación, sino que induce su captación y eliminación por los macrófagos [Nishikawa y col., 2005].

Otros desarrollos que apuntan a la prevención del SUH incluyen a los inhibidores de la glucosilceramida sintetasa, y dentro de ellos se destacan al eliglustat y al miglustat. Estos compuestos inhiben la expresión del Gb3 al

bloquear a la enzima involucrada en su síntesis, y pueden prevenir de los efectos citotóxicos de la Stx2 al ser preincubados en células epiteliales del colon humano, células epiteliales tubulares renales humanas y células endoteliales glomerulares humanas [Girard y col., 2015; Feitz y col., 2021; Sánchez y col., 2022]. Otro compuesto denominado C-9, un análogo de eliglustat, es un inhibidor específico de la glucosilceramida sintetasa y la preincubación de este compuesto con células epiteliales tubulares renales humanas y células endoteliales glomerulares humanas logra reducir la expresión del Gb3 en ellas y una protección frente al desafío con Stx2. A su vez, el tratamiento oral con C-9 redujo significativamente la mortalidad al 50% en ratas desafiadas con Stx2, con una reducción significativa en la expresión de Gb3 en el riñón [Silberstein y col., 2011; Amaral y col., 2013; Morace y col., 2019]. Sin embargo, estos tratamientos son cuestionables desde el punto de vista que la protección que se observa tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* requiere de una preincubación, pudiendo no ser efectivos incluso en casos de SUH incipiente.

Otro compuesto, denominado Retro-2, es un inhibidor que puede proteger a las células de los efectos tóxicos de la Stx al bloquear selectivamente el transporte retrógrado en la interfaz endosoma temprano-aparato de Golgi sin afectar la integridad de las organelas. Se demostró que Retro-2 tiene efectos protectores en modelos de intoxicación *in vivo* e *in vitro* con Stx2. Sin embargo, su solubilidad extremadamente baja en todos los valores del pH gastrointestinal limita su aplicación. Se ha logrado mejorar su solubilidad en agua al realizar una mezcla de etil-lauroil arginato con Retro-2 en dimetilacetamida con una solución de aceite y tensioactivo en proporciones adecuadas, obteniéndose mejores resultados *in vivo* al observar el bloqueo del transporte de la Stx2 desde el intestino hacia la circulación sistémica [Secher y col., 2015; Gandhi y col., 2019]. Esta observación abre a la posibilidad de que Retro-2 pueda controlar la infección por STEC O157:H7 en aplicaciones clínicas.

Otros desarrollos incluyeron a la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón y humanizados específicos contra Stx1 y Stx2, que mostraron capacidad neutralizante para ambas toxinas *in vitro* e *in vivo*. [Tzipori y

col., 2004; Melton-Celsa y col., 2015; Imdad y col., 2021]. Estos anticuerpos quiméricos retienen los elementos de las inmunoglobulinas murinas requeridos para el reconocimiento antigénico, pero los elementos no requeridos para dicho reconocimiento son reemplazados por sus contrapartes derivadas de inmunoglobulinas humanas. Debido a que los anticuerpos monoclonales quiméricos ratón-humano retienen porciones de elementos de inmunoglobulinas murinas, existe un riesgo de que individuos que reciban éstos desarrollen anticuerpos. Para evitar este problema, se generaron anticuerpos humanizados en ratones transgénicos que contienen genes para las cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas humanas introducidos como minicromosomas o transgenes. En respuesta a la inmunización, estos ratones generan anticuerpos compuestos totalmente por elementos estructurales de inmunoglobulinas humanas. Algunos de los anticuerpos monoclonales humanizados desarrollados contra Stx2 fueron capaces de proteger totalmente a ratones y cerdos desafiados con Stx [Yamagami y col., 2001; Moxley y col., 2015]. Algunos de estos anticuerpos quiméricos y humanizados se encuentran en ensayos clínicos en fase I y II [Dowling y col., 2005; Bitzan y col., 2009; López y col., 2010].

Actualmente, en Argentina se encuentra en ensayo clínico fase 3 un anticuerpo policlonal equino específico contra la Stx, denominado comercialmente como INM004, con capacidad de reconocer y neutralizar las distintas variantes de ésta. Dicho anticuerpo posee potencial de ser aplicado como tratamiento al bloquear específicamente a la toxina y evitar las formas graves del SUH [Hiriart y col., 2019]. El ensayo clínico se está desarrollando en 15 hospitales y clínicas de nuestro país con el fin de evaluar la seguridad y la eficacia en pacientes pediátricos con diagnóstico de SUH incipiente.

Por otro lado, ha habido diversos desarrollos que se han enfocado en vacunas para la población humana basadas en Stx, las cuales serían capaces de prevenir el desarrollo del SUH en personas infectadas con STEC. Se realizaron distintas formulaciones vacunales usando Stx2 como antígeno, mediante la generación de toxoides por ingeniería genética (donde se elimina la actividad tóxica de la subunidad A por sustitución de un/unos aminoácido/s en su sitio activo) o por

inactivación química (con glutaraldehído o formaldehído) observándose distintos grados de protección en modelos murinos, con resultados promisorios [MacLeod y col., 1991; Gordon y col., 1992; Bosworth y col., 1996; Wen y col., 2006]. Sin embargo, una desventaja hallada en la utilización de toxoides es la toxicidad residual asociada a la inactivación.

La subunidad B de la toxina fue propuesta como un candidato vacunal atractivo, dado que los anticuerpos dirigidos contra esta subunidad inhibirían la interacción con su receptor, la internalización en la célula huésped y, por ende, la muerte celular. Uno de los principales inconvenientes en estos desarrollos, es que la Stx2B es poco inmunogénica y no logra inducir una robusta respuesta de anticuerpos neutralizantes [Marcato y col., 2001; Tsuji y col., 2008]. Esto se ha atribuido a que el pentámero de Stx2B es poco estable en solución [Conrady y col., 2010], lo que implicaría una menor disponibilidad de epítopes conformacionales importantes para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Debido a las limitaciones por las dificultades para producir, purificar y mantener de manera estable proteínas conteniendo a la Stx2B, en nuestro laboratorio se desarrollaron previamente dos vacunas a ADN consistiendo en un fragmento de la subunidad A y la subunidad B de Stx2. A pesar de que estas vacunas de ADN lograron inducir la producción de anticuerpos anti-Stx2 con capacidad neutralizante in vitro, sólo se obtuvo protección parcial frente al desafío con una dosis letal de Stx2 en un modelo murino [Capozzo y col., 2003; Bentancor y col., 2009].

También se realizaron distintos desarrollos de vacunas a subunidades de proteínas al inocular a la Stx2B fusionada o en presencia de otras proteínas y/o con la administración de adyuvantes observándose una protección variable de acuerdo con el esquema de inmunización [Gao y col., 2009]. Un híbrido entre la subunidad A de Stx2 (a la cual se le introdujeron tres modificaciones aminoacídicas para eliminar la toxicidad) y la subunidad B de Stx1, fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos con capacidad neutralizante y de otorgar protección contra el desafío e.v. tanto con Stx1 como con Stx2 [Smith y col., 2006]. Sin embargo, no se pudo continuar con los estudios de este inmunógeno

debido a su pobre estabilidad, bajo rendimiento de producción y a una tecnología de purificación complicada. Por lo tanto, se generó una nueva proteína utilizando la subunidad A mutada mencionada y Stx1B, pero esta vez unidas a través de un linker proteico para permitir el correcto plegamiento de las dos subunidades. No obstante, esta proteína otorgó un 100% de protección sólo al desafiar con Stx1 y una protección parcial al desafío con Stx2 y con *E. coli* O157:H7 [Cai y col., 2011].

De manera muy promisorio, un candidato vacunal desarrollado en nuestro laboratorio logró un 100% de protección en modelos murinos de intoxicación, así como de infección, obteniéndose resultados alentadores en la fase preclínica. Este inmunógeno consistió en la fusión de la Stx2B a la lumazina sintasa de *Brucella abortus* [Mejías y col., 2013]. Dicha enzima se considera una proteína carrier al incrementar la inmunogenicidad de péptidos fusionados a su extremo N-terminal sin alterar su estabilidad o plegamiento [Laplagne y col., 2004; Sciutto y col., 2005]. Dicho inmunógeno fue patentado y licenciado a una empresa nacional, que por el momento decidió no avanzar con ensayos clínicos en humanos.

## **5. CONCEPTO DE TOLERANCIA Y RESISTENCIA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS.**

Los conceptos de tolerancia y resistencia fueron inicialmente caracterizados por botánicos al evaluar el estado de salud de las plantas cuando éstas interactuaban con parásitos. Sin embargo, estos conceptos fueron tomados por inmunólogos y microbiólogos y aplicados en modelos infecciosos en vertebrados. El concepto de resistencia hace referencia a la habilidad de atacar directamente a los microorganismos y, por lo tanto, reducir su carga; y el concepto de tolerancia se define como la capacidad de limitar el daño inducido por una determinada carga microbiana. Cabe destacar que con esta terminología no se hace referencia a lo que comúnmente se denomina en inmunología como “tolerancia”, la cual hace referencia a la eliminación de linfocitos T autorreactivos ni tampoco a la tolerización de un individuo a su microbiota comensal y a antígenos dietarios [Schwartz. 2005].

La resistencia es típicamente determinada como la inversa de la intensidad de la infección (número de microorganismos por hospedador o número de microorganismos por gramo/centímetro de tejido). Así definido, la resistencia tiene un efecto negativo sobre el patógeno; cuanto más resistente es un hospedador, menor será su carga microbiana. De acuerdo con esto, puede observarse una relación directa entre resistencia y patógeno, en la cual cuando un hospedador se torna o es resistente a un determinado patógeno, se propone que este último debe evolucionar y sufrir adaptaciones para traspasar este tipo de defensa del hospedador. Por el contrario, la tolerancia es definida como la correlación entre el estado de salud del hospedador frente a una determinada intensidad de la infección [Tiffin y col., 2000; Koskela y col., 2002]. Como no existe una relación directa entre tolerancia y patógeno, ya que la tolerancia es un parámetro que se obtiene a partir de la correlación mencionada anteriormente, el patógeno no podrá sufrir cambios ni adaptarse para superar un determinado mecanismo de tolerancia [Woolhouse y col., 2002; Boots y col., 2008]. Esto remarca lo importante que resulta descifrar los diferentes mecanismos de tolerancia frente a enfermedades infecciosas para aumentar de manera terapéutica la tolerancia en individuos susceptibles. La tolerancia y resistencia juntas determinan cuán bien un hospedador puede estar protegido frente a determinados patógenos [Raberg y col., 2009].

Los mecanismos de resistencia del hospedador responsables de reducir la carga microbiana incluyen tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa. Los mecanismos de tolerancia incluyen a mecanismos de reparación de tejidos dañados, así como también a respuestas inmunológicas que no estén dirigidas al patógeno en sí, sino más bien a toxinas y otras moléculas nocivas producidas por el patógeno. Además, existen mecanismos que pueden afectar tanto a la tolerancia como a la resistencia de manera simultánea o no, por ejemplo: citoquinas proinflamatorias que estimulan al sistema inmune para atacar y así reducir la carga microbiana del patógeno, pero al mismo tiempo generan daño colateral en tejidos afectan a la tolerancia y resistencia en simultáneo; por otro lado, anticuerpos que van dirigidos hacia el patógeno en sí, u otros que atacan a

las toxinas que él mismo produce afectan a la resistencia y tolerancia por separado [Schneider y col., 2008; Raberg y col., 2009].

### **5.1. Tolerancia y resistencia de ratones BALB/c (BALB) y C57BL/6 (C57) frente a distintas infecciones.**

Modelos infecciosos han sido ampliamente caracterizados y utilizados en distintas cepas de ratón. Varias características de las cepas utilizadas en la presente tesis, las han hecho útiles para el estudio de enfermedades infecciosas; sobre todo, por la diferencia en su respuesta inmunológica. La cepa BALB fue descrita como más propensa a desarrollar una respuesta inmunológica con un perfil celular de linfocitos T CD4+ colaborador tipo 2 (Th2) frente a una infección, mientras que la cepa C57 es más propensa a desarrollar un perfil celular de linfocitos T CD4+ colaborador tipo 1 (Th1). Esta diferencia fue utilizada para caracterizar que respuesta inmunológica es conveniente montar frente a determinados patógenos. En general, para microorganismos extracelulares se los considera a los ratones BALB como una cepa más resistente ya que la producción de anticuerpos anti-patógeno ayuda a la eliminación de éstos. Por el contrario, los ratones C57 son más resistentes a microorganismos intracelulares los cuales requieren de un perfil citotóxico para su eliminación.

Acorde a lo mencionado anteriormente, los ratones BALB mostraron mayor resistencia frente a la infección con el helminto *Heligmosomoides polygyrus*. Expulsan lentamente a los helmintos a partir del día 14 y no establecen una infección crónica como los ratones C57 infectados, que representan a la cepa susceptible [Smith y col., 2018]. Frente a la enfermedad chagásica ocasionada por *Trypanosoma cruzi*, la cepa C57 es más resistente; sin embargo, es menos tolerante que la cepa BALB, la cual monta un mecanismo (liberación del factor de crecimiento transformante beta; TGF- $\beta$ ) durante los estadios tempranos de la infección que le garantiza la no cronificación de la enfermedad [Ferreira y col., 2018]. Los ratones C57 mostraron ser más resistentes a infecciones por *Listeria monocytogenes* debido a la producción temprana de IL-12 e IL-15 por células dendríticas, indicando la importancia de la liberación de la IL-12 para promover un perfil Th1 [Liu y col., 2000; Bou Ghanem y col., 2011]. También, la cepa C57 es resistente frente a un patógeno murino intracelular, el *Mycoplasma pulmonis*,

mientras que la cepa BALB es susceptible debido a que estos últimos montan un perfil celular de linfocitos T CD4+ colaborador tipo 17 (Th17) con niveles sostenidos de IL-17A. La administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17A redujo en los ratones BALB la severidad de la infección pulmonar y también el reclutamiento de polimorfonucleares al sitio de infección sin afectar la carga microbiana [Mize y col., 2018], proponiéndose como un mecanismo que ayuda a mejorar la tolerancia. En el modelo de ratón de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi* causa un amplio rango de gravedad que depende del genotipo del ratón infectado. Los ratones BALB regulan la gravedad de la enfermedad al controlar el número de espiroquetas en los tejidos, lo que indica que esta cepa utiliza mecanismos de resistencia para controlar la infección. En contraposición, los ratones C57 no desarrollan artritis severa independientemente del número de espiroquetas encontradas en los tejidos, lo que indica que estos ratones son capaces de controlar la patología a través de mecanismos de tolerancia [Ma y col., 1998]. Frente a infecciones virales, los ratones C57 suelen presentar una mejor evolución que los ratones BALB. Por ejemplo, en la infección con *Cytomegalovirus* fue identificada una población de células “natural killer” (NK) secretoras de interferón (IFN) gamma (IFN- $\gamma$ ) en el bazo de ratones C57 que eficazmente eliminaron al patógeno. La reducción de la carga microbiana les confiere un mecanismo de resistencia a esta cepa murina en comparación a la cepa BALB, en la cual la función deficiente de las células NK se acompañó de una respuesta T CD8+ menos efectiva [Lu y col., 2018]. En cuanto a la infección con *Salmonella typhimurium*, un patógeno extracelular invasivo, los ratones BALB son más resistentes que los ratones C57 debido a la particularidad que poseen mayor cantidad de inmunoglobulinas A innatas polireactivas que son capaces de reconocer inespecíficamente a *S. typhimurium* y, además de su función de exclusión, permiten la translocación de bacterias recubiertas de IgA hacia las PP favoreciendo la inducción de una respuesta inmune específica [Fransen y col., 2015].

## **6. MODELOS MURINOS DE SUH.**

Diversas evidencias demuestran que el ratón es un modelo aceptado para estudiar múltiples aspectos del SUH observado en humanos, especialmente la participación de la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria.

Los ratones son los animales más comúnmente utilizados para la investigación preclínica dado que los costos de mantenimiento son relativamente bajos, son fáciles de manipular y presentan una ventaja en lo que respecta a su reproducción y gestación.

Múltiples modelos murinos de SUH han sido desarrollados simplemente inyectando la Stx2 purificada vía e.v. La inoculación de Stx2 causa daño renal agudo severo y muerte [Pineda y col., 2021], y en algunos casos también se observa daño en el sistema nervioso central [Berdasco y col., 2019]. Las principales lesiones renales agudas que se observan en ratones adultos son focos necróticos en los túbulos renales. A pesar de que el glomérulo del ratón no expresa al receptor Gb3, la inyección e.v. de Stx2 genera lesiones glomerulares que son asociadas a las alteraciones sistémicas ocasionadas, tal como trombosis y una perfusión renal disminuida, secundaria a un desbalance hemodinámico [Karpman y col., 1998; Dran y col., 2002]. Otro modelo de inyección e.v. consiste en administrar Stx2 purificada junto con LPS en ratones adultos, el cual es otro factor de virulencia de las bacterias STEC. En este modelo casi todas las características del SUH observadas en humanos fueron reproducidas [Palermo y col., 2000; Keepers y col., 2006; Sauter y col., 2008]. A su vez, otros signos característicos del SUH fueron observados en los dos modelos descritos anteriormente, tales como activación plaquetaria, trombocitopenia, leucopenia y neutrofilia [Dran y col., 2002; Fernández y col., 2006]. En conclusión, el modelo murino por inyección e.v. de Stx2 permite evaluar distintos parámetros que suceden durante el desarrollo del SUH.

La infección con bacterias STEC y su evolución hacia manifestaciones sistémicas del SUH pudo ser establecida en diversos modelos murinos, en los cuales se observan principalmente insuficiencia renal, deshidratación y muerte. Debido a que los ratones adultos son resistentes a las infecciones con STEC, diversas aproximaciones fueron desarrolladas para hacerlos susceptibles a la

infección. Uno de los primeros modelos murinos consistió en el tratamiento con antibióticos (estreptomicina o mitomicina C) para reducir la microbiota comensal del intestino y así aumentar la capacidad de las STEC para colonizar el intestino en ausencia de competencia [Shimizu y col., 2003; Lin y col., 2017]. Sin embargo, la exposición de bacterias STEC a antibióticos incrementa la liberación de Stx y puede inducir una respuesta inmune anormal en ratones [Domingo y col., 1995; Tarr y Freedman. 2022]. En particular, la mitomicina C no solamente activa fagos temperados que codifican la Stx2, sino que también induce microangiopatía por sí misma [Molyneux y col., 2005]. Dentro de los modelos que consisten en la eliminación de la microbiota comensal intestinal, se agrupa al uso de ratones libres de gérmenes (GF) [Eaton y col., 2017] y ratones gnotobióticos [Saito y col., 2019]. El hecho de lo que los ratones pretratados con antibióticos o GF carezcan de una microbiota intacta introduce limitaciones en su utilidad para estudiar la infección que tendría lugar de manera natural. Una de las ventajas que presenta el modelo murino que usa ratones gnotobióticos consiste en observar la interacción de determinadas bacterias de interés junto con las bacterias STEC, y evaluar su potencial efecto inhibitorio contra la progresión sistémica. Varios investigadores introdujeron otras alternativas en el contexto de una microbiota intestinal normal, como la mantención de ratones bajo condición de malnutrición calórico-proteica después del destete [Kurioka y col., 1998]. La mayor susceptibilidad de ratones malnutridos a bacterias STEC se asoció al deterioro del sistema inmune no específico de la mucosa intestinal, y a una disrupción de la barrera epitelial que se refleja en una mayor permeabilidad intestinal. También, recientemente ha sido propuesto un modelo murino de infección con cepas STEC previo tratamiento con dextrán sulfato de sodio [Hall y col., 2018]. Este químico induce una colitis aguda en los ratones generando inflamación intestinal, daño en los enterocitos y disrupción de las uniones estrechas ocasionando una mayor permeabilidad intestinal. Mohawk y colaboradores desarrollaron un modelo en el que observaron que ratones adultos con una microbiota comensal intacta infectados con una cepa de *E. coli* O157:H7 presentaban colonización intestinal y daño tubular renal, además de aproximadamente un 30% de mortalidad [Mohawk y col., 2010]. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un modelo de SUH mediante la

infección de ratones al momento del destete con una cepa *E. coli* O157:H7. Este modelo mantiene una microbiota comensal intacta y, además, es posible observar manifestaciones sistémicas del SUH posterior a la infección, como insuficiencia renal, leucopenia, neutrofilia y muerte en un 50 % de los ratones [Fernández-Brando y col., 2014].

A pesar del conocimiento generado durante años con relación a la participación de la respuesta inflamatoria sistémica en la patogénesis del SUH, es poco lo sabido acerca de los cambios inducidos localmente en el tracto gastrointestinal durante los primeros estadios de la infección, y su impacto sobre la evolución a enfermedad sistémica. Para definir los cambios que ocurren localmente en la respuesta inmune innata y adaptativa, y su relación con la microbiota, es de vital importancia utilizar un modelo murino de infección gastrointestinal con cepas STEC.

## **7. INMUNIDAD DE MUCOSAS.**

La respuesta inmunitaria que se desencadena frente a antígenos que penetraron los tejidos o se diseminaron en la sangre, se denomina respuesta inmune sistémica y se inicia en los ganglios linfáticos periféricos y en el bazo. Sin embargo, hay otro compartimento del sistema inmunitario localizado en las superficies donde casi todos los agentes patógenos invaden, y a éste se lo denomina sistema inmune de mucosas.

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se enfrenta diariamente a una gran cantidad y variedad de antígenos. El MALT no solamente protege al organismo de la invasión y diseminación sistémica de patógenos y limita el nivel de penetración de los microorganismos comensales, sino que también debe diferenciar entre estos microorganismos proporcionando una inmunidad activa únicamente contra patógenos invasores y no contra microorganismos comensales y/o “beneficiosos”. Se denominan de esa manera ya que proporcionan beneficios esenciales para la salud dentro de los cuales se destacan la prevención de la colonización por patógenos [Pickard y col., 2017], la detoxificación de ácidos biliares [Staley y col., 2017], el metabolismo de

carbohidratos no digeribles [Woting y Blaut. 2016] y la producción de metabolitos claves en la salud humana [Oliphant y Allen-Vercoe, 2019].

El MALT está compuesto por 3 barreras: una barrera física, una barrera biológica y una barrera inmunológica [Assimakopoulos y col., 2018]. Cabe destacar que esta separación no es absoluta, ya que existe un diálogo constante entre ellas. A su vez, estas barreras protegen al hospedador de la colonización y diseminación de patógenos a través de una amplia variedad de mecanismos de defensa.

### **7.1. Barrera física.**

La superficie mucosa de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario está cubierta por células epiteliales que se enfrentan diariamente con un microambiente densamente poblado por microorganismos. Entre los diferentes epitelios, el intestinal es el más estudiado y será tomado como ejemplo para describir la funcionalidad de la barrera epitelial. La barrera epitelial intestinal juega un papel crucial en la protección del hospedador frente a infecciones gastrointestinales [Okumara y Takeda. 2017]. La continuidad del epitelio constituye una primera y formidable barrera frente a los microorganismos presentes en la luz. Dichas células epiteliales presentan microvellosidades que se proyectan desde el polo apical hacia la luz del intestino y están asociadas a una densa red intracelular de filamentos de actina que se conectan con las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales regulando la permeabilidad de la monocapa y, en consecuencia, la función de barrera de este epitelio [Shashikanth y col., 2017].

Además, la capa de células epiteliales está recubierta de una capa espesa de mucus, el cual está ampliamente distribuido a lo largo del tracto gastrointestinal y es producido por las células caliciformes presentes en las criptas y en las vellosidades del intestino delgado, colon y recto [Sansoneetti. 2004; Magalhaes y col., 2007]. El mucus presenta una estructura rígida y viscosa (debido fundamentalmente a las mucinas, su principal componente proteico), donde los microorganismos son atrapados y contiene, además, enzimas y moléculas

antimicrobianas producidas por el hospedador, inmunoglobulinas y microorganismos comensales [Chairatana y Nolan. 2017]. Para que un microorganismo acceda a la superficie apical del epitelio intestinal debe ser capaz de atravesar dicha capa de mucus, y esto es una característica que distingue a los microorganismos patógenos de los comensales [MacDonald. 2003; Newberry y Lorenz, 2005].

Las células epiteliales intestinales son capaces de interactuar con el sistema inmune de mucosas mediante la producción de citoquinas y quimioquinas [Larsen y col., 2020]. La interacción continua entre la microbiota y el epitelio intestinal conduce a una constante activación del sistema inmune [Rescigno. 2014]. La regulación de esta respuesta, junto con la preservación de la integridad y la permeabilidad de la barrera epitelial en presencia de microorganismos comensales y patógenos invasores, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Si esta regulación se ve afectada, puede conllevar a una eventual inflamación y/o infección.

## **7.2. Barrera biológica: Microbiota intestinal.**

La microbiota intestinal consiste en una comunidad microbiana muy diversa, dentro de la cual se incluyen bacterias, hongos y virus, que conviven en un nicho ecológico en simbiosis con el hospedador. En el proceso de colonización de ese nicho por la microbiota comensal, se ven afectadas varias funciones fisiológicas del hospedador, incluida la regulación de la inmunidad protectora contra patógenos [Slack y col., 2009].

Hay diversos mecanismos mediante los cuales la microbiota intestinal previene la colonización, sobrecrecimiento y el daño inducido por patógenos. Uno de ellos se denomina resistencia a la colonización, donde los microorganismos comensales y los patógenos invasores compiten por la disponibilidad de nutrientes y/o por un espacio en ese nicho ecológico [Chiu y col., 2017]. Las bacterias comensales censan continuamente moléculas liberadas durante la duplicación bacteriana en el microambiente intestinal, monitoreando así la densidad de la población y ajustado su expresión genética en consecuencia, un

mecanismo llamado “quorum sensing” [Thompson y col., 2016]. Las bacterias comensales hacen uso de este mecanismo para garantizar la homeostasis intestinal, mientras que los patógenos lo utilizan para minimizar la respuesta inmunológica del hospedador y así aumentar su patogenicidad [Iacob y col., 2018]. Además, la microbiota comensal previene la colonización e infección del hospedador mediante la secreción de diversas moléculas que afectan a la viabilidad de los patógenos, como ROS que generan daño en estructuras celulares (daño al ADN y la oxidación de ácidos grasos y proteínas) [Qin y col., 2020], la liberación de bacteriocinas (que son proteínas con efectos bacteriostáticos o bactericidas) [Kim y col., 2017] y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), los cuales median muchas funciones inmunoprotectoras que se destacarán más adelante.

La microbiota intestinal es necesaria no sólo para defender al hospedador de la colonización con patógenos, sino que también es fundamental para el desarrollo de la inmunidad de mucosas. Estudios en ratones GF demostraron que éstos poseen menor cantidad de linfocitos intraepiteliales y de células plasmáticas secretoras de IgA en la lámina propia (LP), así como también de linfocitos T regulatorios (Treg) en comparación con ratones libres de patógenos (SPF) [Pickard y col., 2017]. También, los ratones GF tienen una menor expresión del ARN mensajero (mARN) de péptidos antimicrobianos en comparación con ratones convencionales [Karlsson y col., 2008]. Además, las placas de Peyer (PP) en los ratones GF poseen centros germinales más pequeños que las de los ratones convencionales [Mcdermott y Huffnagle. 2014]. Por otro lado, los SCFA son producidos por la microbiota intestinal a partir de componentes de la dieta e incrementan la producción de péptidos antimicrobianos y la secreción de mucus por células epiteliales intestinales especializadas y estimulan la maduración y la expansión de Treg en la mucosa intestinal, los cuales atenúan las respuestas inflamatorias locales [Schnupf y col., 2018]. A su vez, los SCFA fomentan la homeostasis intestinal al incrementar la función de la barrera epitelial mediante la inducción de la proliferación y diferenciación de las células madre intestinales a células epiteliales [Lazar y col., 2018]. Además, los SCFA inducen la proliferación y diferenciación de las células innatas linfoides al subtipo 3, las cuales liberan IL-

22, una citoquina involucrada en la síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos por parte de las células epiteliales intestinales e involucrada también en la reparación tisular [Chun y col., 2019].

En individuos sanos, la microbiota se compone principalmente de 4 filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria [Nejadghaderi y col., 2021]. La homeostasis intestinal esta caracteriza por la predominancia de anaerobios estrictos, fundamentalmente del filo Firmicutes y la familia Bifidobacteriaceae, y una expansión de anaerobios facultativos, como Enterobacteriaceae, es un marcador común de disbiosis [Martin-Gallausiaux y col., 2018]. Algunas especies del filo Bacteroidetes pueden producir polisacárido A, el cual inhibe la producción de IL-17 y aumenta la actividad de Treg [Cheng y col., 2019]. En conformidad con lo anteriormente mencionado, la colonización del intestino grueso con cepas de Clostridios aumenta los niveles de TGF- $\beta$  en la LP y promueve la formación de Treg [Nagano y col., 2012]. A su vez, las bacterias comensales estimulan la diferenciación de las células caliciformes con la consecuente producción de la capa de mucus protectora. También, disminuyen la migración de fagocitos, son capaces de estimular a los linfocitos del bazo, intervienen en la activación de los macrófagos y en la maduración de las células NK [Francino. 2014; Khosravi y col., 2014; Owaga y col., 2015; Gorjifard y Goldszmid. 2016].

Mientras que las bacterias comensales poseen una capacidad para inducir Treg y suprimir la inducción de respuestas inflamatorias [Grainjer y col., 2018], los patógenos las favorecen mediante la activación de DC con la sucesiva liberación de citoquinas proinflamatorias y como resultado, los linfocitos T vírgenes se diferencian a linfocitos Th1 y Th17, dando lugar a respuestas inmunes proinflamatorias.

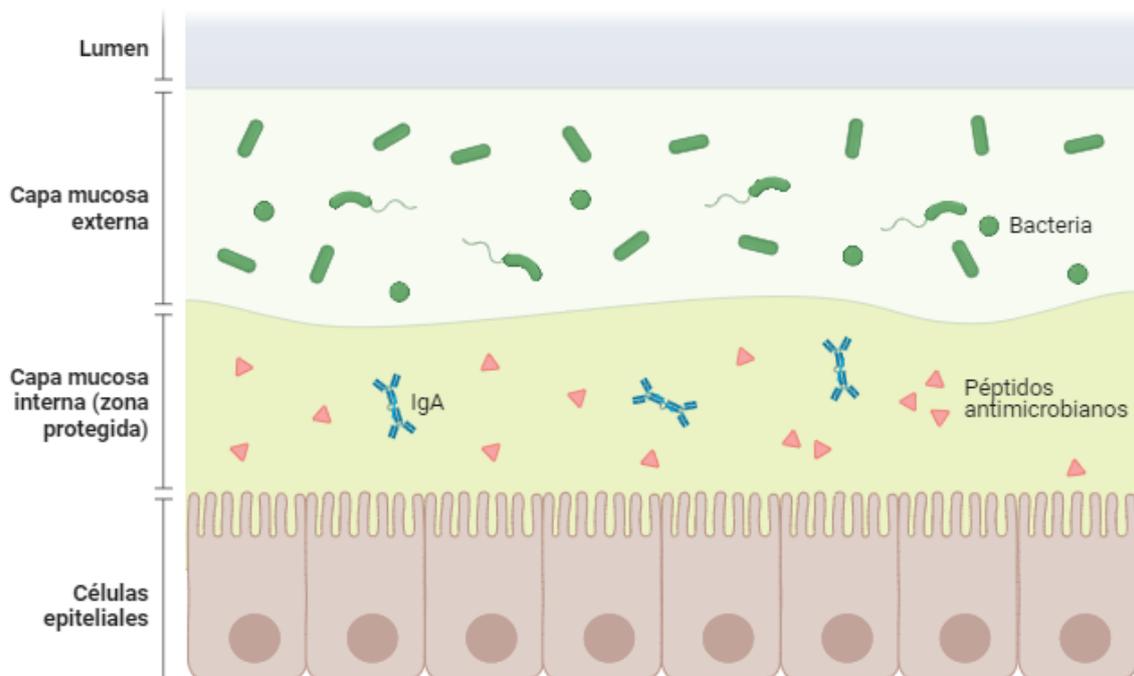
La coexistencia pacífica entre el hospedador y las bacterias comensales es un ejemplo clásico de mutualismo, el cual funciona a pesar de la abundancia de moléculas bacterianas que pueden potencialmente activar receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRP), disparando una respuesta inmune innata [Rakoff-Nahoum y col., 2004].

### 7.3. Barrera inmunológica: Inmunidad innata.

La inmunidad innata proporciona protección inespecífica contra microorganismos que son capaces de colonizar el epitelio de las mucosas durante una primera exposición. Se destacan dos mecanismos principales: la secreción de péptidos antimicrobianos y el reclutamiento de células inmunes.

#### 7.3.1. Péptidos antimicrobianos.

Las células epiteliales y las células de Paneth son las encargadas de producir y secretar péptidos antimicrobianos en respuesta a bacterias o patógenos presentes en el lumen [Cazorla y col., 2018]. Son moléculas con propiedades bactericidas, antiinflamatorias y antiendotóxicas [Vandamme y col., 2012]. Tienen una amplia actividad bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, dadas sus propiedades anfipáticas que les permiten interactuar con las membranas celulares y producir la lisis bacteriana [Ebbensgaard y col., 2015; Malanovic y Lohner. 2016]. Dentro de los péptidos antimicrobianos se destacan a las defensinas, las catelicidinas, las lectinas, entre otros [Blyth y col., 2020].



**Imagen 5.** Esquema representativo simplificado de la estructura y compartimentalización de la mucosa intestinal, observándose la barrera física y la barrera biológica, junto con los péptidos antimicrobianos que conforman a la

inmunidad innata. Plantilla tomada de la aplicación BioRender, creada por Ruslan Medzhitov.

### 7.3.2. *Reclutamiento de células inmunes.*

Cuando los patógenos logran superar todas las barreras físicas, químicas y biológicas; lo que implica atravesar la capa de mucus y competir contra la microbiota comensal y resistir a la acción de péptidos antimicrobianos, entran en contacto estrecho con la capa de células epiteliales. Estas células censan a los microorganismos a través de sus RRP, los cuales reconocen moléculas conservadas en bacterias, virus y hongos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) [Maldonado-Contreras y McCormick. 2011; McClure y Massari, 2014]. Dentro de los RRP, se destacan a los TLR (presentes en la membrana plasmática celular o asociados con organelas intracelulares), receptores de lectina tipo C (CLR), receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (NLR) (citosólicos) y sensores citosólicos de ADN y ARN [Akira y col., 2001; Gewirtz y col., 2001; Hayashi y col., 2001]. Normalmente, la microbiota no se encuentra en contacto estrecho con el epitelio, evitando de esta manera la activación de respuestas inmunitarias innecesarias o que resulten nocivas para el hospedador, sino que están confinadas en la capa de mucus que lo recubre [Johansson y Hansson, 2016]. Por el contrario, los patógenos son aquellos microorganismos que se adhieren firmemente al epitelio para llevar a cabo su colonización y duplicación. Durante este proceso, son reconocidos por los RRP presentes en las células epiteliales y disparan distintas cascadas de señalización que conllevan a la activación de una respuesta inflamatoria apropiada para cada microorganismo [den Besten y col., 2015]. La activación de los RRP conduce a la síntesis y secreción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como IL-8, IL-6, IL-12p70 y el TNF- $\alpha$ , las cuales inducen la activación y/o el reclutamiento de una variedad de células inmunes en el foco de infección [Fukata y Arditi. 2013; Ye y col., 2019], como DC, macrófagos, granulocitos, monocitos, células linfoides innatas, linfocitos intraepiteliales, células NK; entre otros actores, que tienen la labor de identificar y llevar a cabo

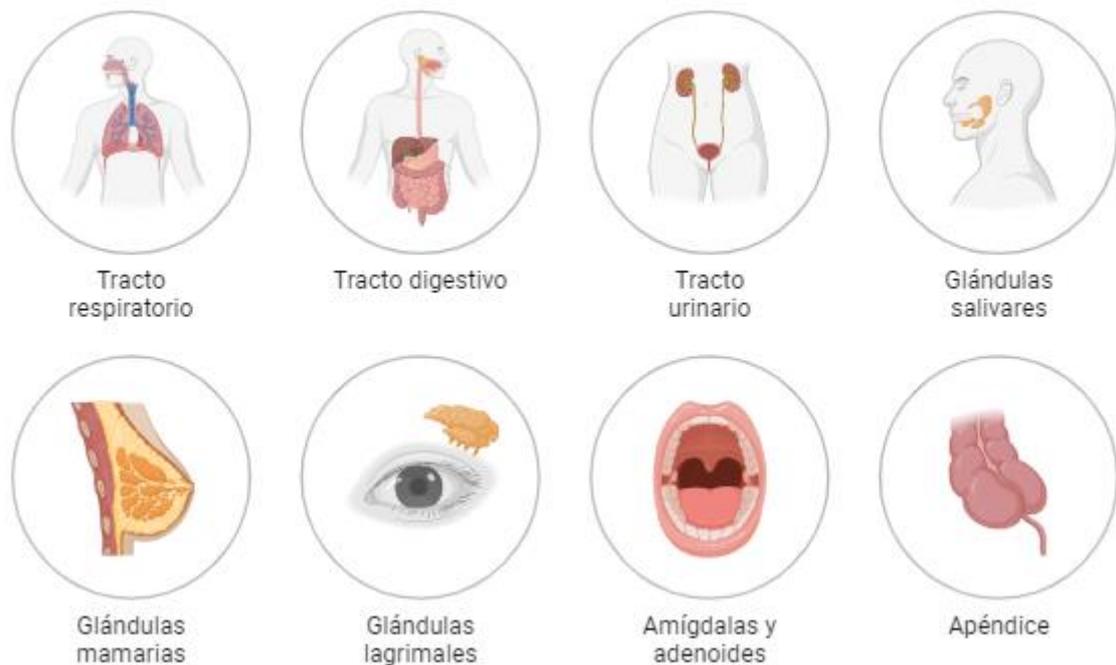
una respuesta inmune exitosa que garantice la neutralización de los patógenos invasores [Qiu y Yang. 2013; Chang y col., 2014; Meehan y col., 2014; Mukherjee y col., 2014; Nikoopour y col., 2015].

Una respuesta inmune innata efectiva posibilita el apropiado reclutamiento y activación de células inmunes específicas necesarias para una respuesta de anticuerpos robusta, promoviendo la eliminación de los patógenos [Bai y col., 2020] y reduciendo la severidad de la patología ante una reinfección [Chakraborty y col., 2016], gracias al montaje de una respuesta inmunológica más rápida y eficiente. Sin embargo, además de proporcionar protección, las células de la inmunidad innata, como los PMN, podrían contribuir con la diarrea y el daño epitelial, formando abscesos en las criptas [Mumy y McCormick. 2009], o con el aumento en la permeabilidad intestinal a toxinas bacterianas [Rogers y col., 2006].

#### **7.4. Barrera inmunológica: Inmunidad adaptativa.**

El conjunto de linfocitos y estructuras linfoides presentes en las mucosas recibe el nombre de MALT, el cual funciona como una unidad, y comprende diferentes sistemas operativos en distintas localizaciones: el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT), el tejido linfoide asociado al árbol bronquial (BALT), el tejido linfoide asociado al tracto nasofaríngeo (NALT), el tejido linfoide asociado a la glándula mamaria, el tejido linfoide asociado a las glándulas salivares y lagrimales, el tejido linfoide asociado a los órganos genitourinarios, el tejido linfoide asociado a la piel y el tejido linfoide asociado al oído interno. Todos los tejidos linfoides que integran al MALT se caracterizan por poseer compartimentos que se clasifican como sitios inductores, donde se lleva a cabo la generación de una respuesta inmune adaptativa, y sitios efectores, donde se despliega dicha respuesta [Chirido. 2008]. Entre los primeros encontramos las PP en el intestino delgado, los FLA presentes a lo largo de todo el intestino delgado y grueso, y los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) que drenan al intestino; en el NALT se destacan las amígdalas palatinas, adenoides y amígdalas linguales, y tanto en el NALT como en el BALT se encuentran folículos linfoides similares a los

intestinales en la pared de la parte alta de las vías respiratorias; así como también ganglios regionales a cada tejido linfóide, dentro de los cuales se destacan los cervicales y los mediastínicos. Los sitios efectores en el GALT están constituidos por la LP y el epitelio intestinal donde las células inmunes adaptativas activadas se localizan y ayudan a mantener la integridad de la barrera epitelial, a la vez que confieren inmunidad protectora [Ahluwalia y col., 2017]; los demás tejidos linfoides que conforman el MALT, cuentan con sitios efectores con una organización similar a la LP del intestino, donde por debajo del epitelio se encuentran numerosas células inmunes que son reclutadas desde los sitios inductores o que yacen allí.



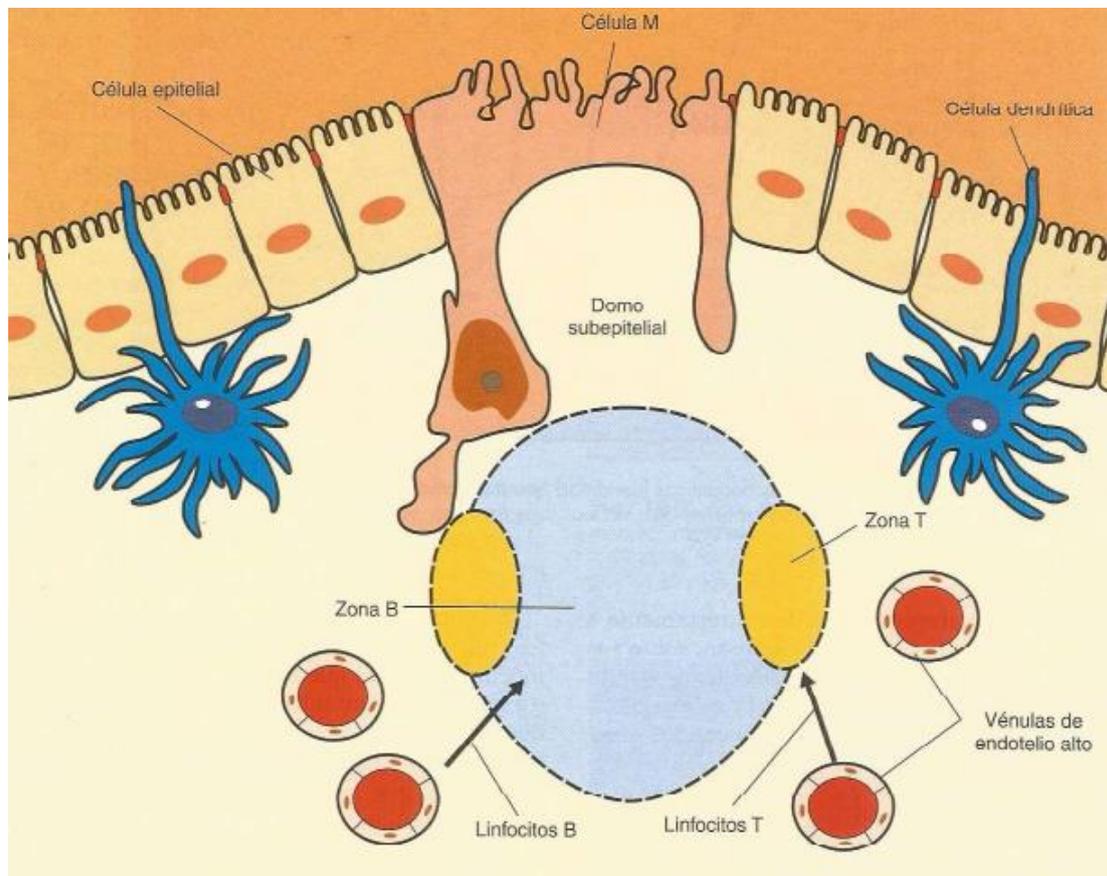
**Imagen 6.** Conjunto de estructuras linfoides que conforman al MALT. Mucosa del tracto respiratorio, del tracto digestivo, del tracto urinario, glándulas salivares, glándula mamaria, glándulas lagrimales, el apéndice, las amígdalas y las adenoides. Cabe destacar que, si bien no se encuentra representado, el tejido linfóide asociado a la piel también conforma al MALT. Plantilla tomada de la aplicación BioRender, no detallándose el nombre del autor.

#### 7.4.1. Sitios inductores.

Nos concentraremos fundamentalmente en describir estructuras pertenecientes al GALT, ya que es el compartimento del MALT que ha sido más

caracterizado y las STEC, bacteria con la que se trabajará a lo largo de toda esta tesis, genera una infección gastrointestinal. Sin embargo, cabe destacar que, por ejemplo, una respuesta inmunológica inducida en el NALT y BALT puede desplegarse hacia el GALT y el tejido linfoide asociado a los órganos genitourinarios, poniendo en evidencia que el MALT funciona como una unidad y que, si bien está compartimentalizado, hay un diálogo constante entre sus componentes [Habibi y col., 2015; Asadi Karam y col., 2016].

Las PP son agregados linfoides macroscópicos localizados en la pared antimesentérica, a lo largo de todo el intestino delgado. Las PP consisten en grandes folículos de linfocitos B, con áreas de linfocitos T interfoliculares. Los FLA tienen una estructura similar a las PP, pero se diferencian de estas porque tienen un menor tamaño. En ambas estructuras, las áreas linfoides están separadas del lumen intestinal por una capa simple de epitelio columnar, denominado epitelio asociado al folículo, que difiere del resto del epitelio ya que presenta menores niveles de enzimas digestivas y microvellosidades menos pronunciadas; además, está cubierto por una escasa capa de mucus y posee una gran abundancia de células M [Reboldi y Cyster. 2016]. Estas células, además de carecer de microvellosidades, son enterocitos que desempeñan un rol fundamental en el transporte de antígenos luminales, incluyendo antígenos bacterianos, víricos y complejos inmunes con IgA mediante transcitosis hacia su cara basolateral [Dillon y Lo. 2019]. Allí, las células M permiten la interacción de los antígenos captados con las células inmunes que se encuentran en el domo subepitelial. Por debajo y en proximidad a dicho domo, se hallan folículos centrales de linfocitos B compuestos por centros germinales activos. Alrededor de ellos, se forma un compartimento denominado manto que contiene linfocitos B vírgenes. El manto, a su vez, está rodeado por una zona marginal más grande que contiene linfocitos B de memoria y linfocitos B fenotípicamente similares a los de la zona marginal esplénica. Junto con los folículos ricos en linfocitos B, las PP y los FLA contienen zonas de linfocitos T perifoliculares que sirven como reservorios de linfocitos T vírgenes y de memoria.



**Imagen 7.** Compartimentalización de una PP en la mucosa intestinal y la localización celular en cada uno de los distintos compartimentos. Dentro del folículo (identificado en la imagen de color celeste), también se encuentran células dendríticas foliculares y linfocitos Thf. En las zonas T (en amarillo), también se hallan células dendríticas convencionales. A fin de simplificar la ilustración, no se incorporaron linfocitos, macrófagos y células dendríticas presentes en estrecho contacto con la superficie basolateral de las células M, ni tampoco a los linfocitos B y T presentes en sus respectivas áreas. Imagen tomada del capítulo “Inmunidad en las mucosas” del libro “Introducción a la Inmunología humana” (Chirido, 2008).

#### 7.4.2. Sitios efectores.

La llegada de las células activadas desde los sitios inductores hacia los sitios efectores ocurre a causa de que, durante la activación, estas células pierden la expresión de L-selectina y aumentan la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y el receptor para quimioquinas C-C (CCR) tipo 9 [Telen. 2014; Habtezion y col., 2016], para el direccionamiento a intestino. Otras moléculas como CCR4, CCR10, la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y el antígeno leucocitario cutáneo están involucrados en el

direccionamiento de las células inmunes a piel; y la proteína inflamatoria de macrófagos 1- $\alpha$  que se une a CCR3 y CCR4 contribuye a la migración de células inmunes a pulmón [Fu y col., 2013].

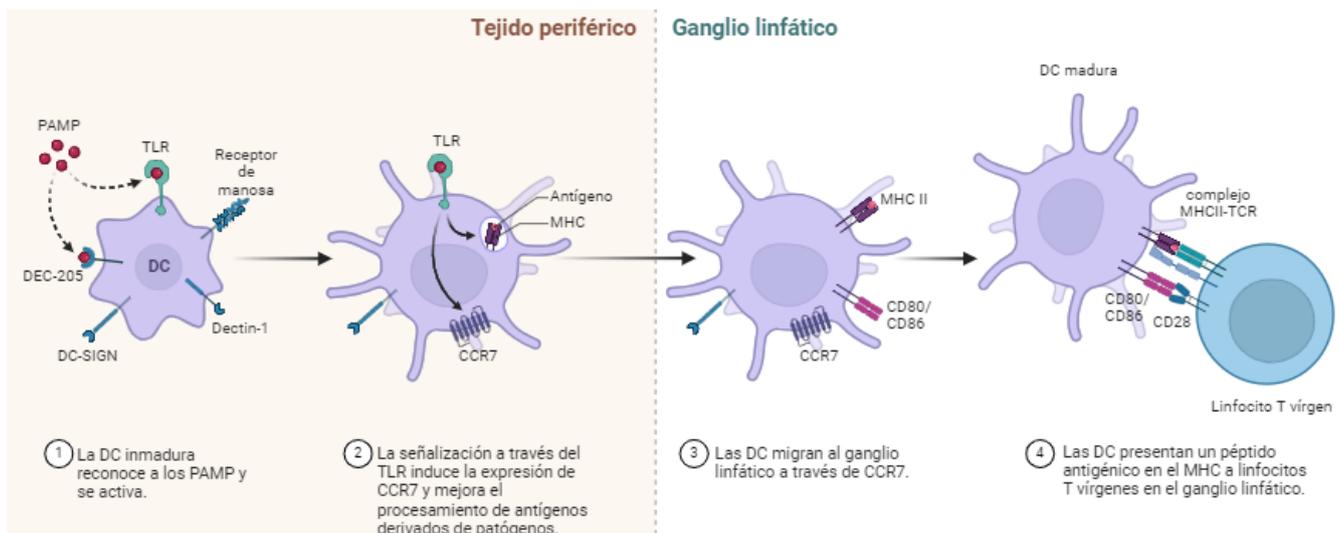
En la adquisición de los receptores que direccionan a las células activadas hacia la LP y hacia la capa de células epiteliales del intestino, donde ejecutan sus acciones efectoras, está implicada la producción de ácido retinoico por las DC. Las DC del GALT sintetizan ácido retinoico a partir de la vitamina A adquirida en la dieta, utilizando la enzima retinal deshidrogenasa [Sirisinha. 2015; Oliveira y col., 2018].

La LP, al igual que otros sitios efectores del MALT, está constituida mayoritariamente por Treg, linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria y efectores, plasmoblastos y células plasmáticas secretoras de anticuerpos; células fundamentalmente de la inmunidad adaptativa. De las células consideradas parte de la inmunidad innata, se destaca la presencia de DC, macrófagos, linfocitos intraepiteliales y las células linfoides innatas. Todas estas células mencionadas anteriormente no están localizadas en un mismo sitio, sino que se encuentran en distintos compartimentos, preferentemente por debajo del epitelio, relativamente adyacentes a la cara basolateral de los enterocitos [Gross y col., 2015; Tanoue y col., 2016; Ahluwalia y col., 2017; Mörbe y col., 2021]. Los linfocitos T CD4+ se distribuyen uniformemente a lo largo de las criptas [Fu y col., 2019], mientras que los linfocitos T CD8+ migran preferencialmente hacia el epitelio. Por otro lado, los linfocitos intraepiteliales se hallan inmersos en el epitelio intestinal [Ahluwalia y col., 2017; Konjar y col., 2017].

#### *7.4.3. Presentación antigénica.*

Las células presentadoras de antígenos, fundamentalmente DC, derivan de precursores hematopoyéticos y son principalmente de linaje mieloide, aunque se ha observado su plasticidad ontogénica [Ardavín. 2003]. Las DC emiten pseudópodos a través de las uniones estrechas de las células epiteliales con la finalidad de captar antígenos luminales o captan los antígenos que les son proporcionados a través de las células M [Rescigno y Borrow. 2001]. El

reconocimiento de PAMP a través de los respectivos receptores induce la maduración de las DC [Gordon. 2002], que se manifiesta a través de la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras, como el clúster de diferenciación (CD) 86 (CD86), CD40, CD80 y al aumento de la densidad del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) y el MHC I [Macagno y col., 2007; Hespel y Moser. 2012; Hervas-Stubbs y col., 2012]. Simultáneamente, se induce la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 p70, IL-23, IL-18, IL-1 $\beta$  e interferones de tipo I ( $\alpha/\beta$ ), entre otras. Las DC maduras que migran a los ganglios linfáticos, o las que se ubican inmediatamente debajo del domo subepitelial, estimulan en la zona perifolicular o en la zona del manto al clon de linfocitos T y/o linfocitos B virgen que a través de su receptor de células T (TCR) o receptor de células B (BCR) reconocen específicamente la secuencia aminoacídica que se les está presentando bajo el contexto péptido/MHC.



**Imagen 8.** Representación de la activación de las DC, la presentación antigénica y de la migración a órganos linfoides secundarios para activar a los linfocitos T. Plantilla tomada de la aplicación BioRender, creada por Akiko Iwasaki.

#### 7.4.4. Polarización de linfocitos T y respuesta efectora.

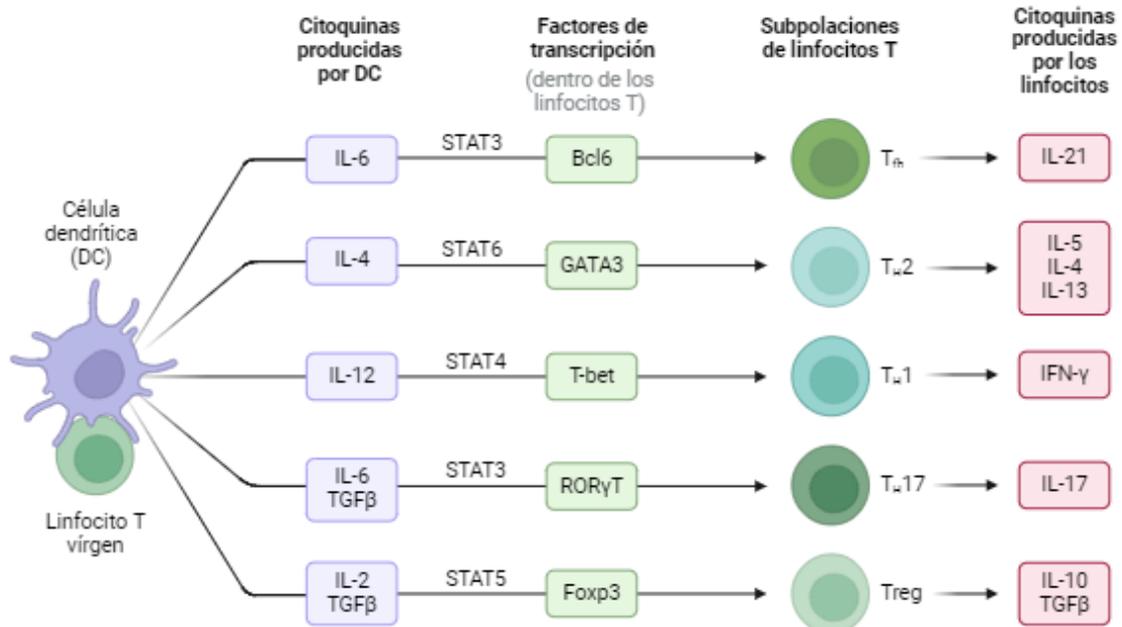
El clon de linfocitos T que reconoce específicamente a través de su TCR al péptido que se le es presentado bajo el contexto MHCII por las DC, se activa y se expande clonalmente gracias también a la interacción del CD28 y del CD40 ligando (CD40L) presentes en la superficie del linfocito T con las moléculas

coestimuladoras expresadas en la DC madura (CD80/86 y CD40). Sin la interacción de estos receptores, el clon del linfocito T entraría en anergia y moriría por apoptosis, no pudiéndose activar, proliferar y diferenciarse [Ewing y col., 2013].

En la diferenciación de los linfocitos se ven involucradas citoquinas proinflamatorias liberadas por las DC como IL-12 e IL-18, que están asociadas a la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un perfil celular de tipo Th1 [Novick y col., 2013; Ashour y col., 2020]. Las citoquinas IL-4 e IL-33 están involucradas en la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes a un perfil de tipo Th2 [Paul, WE. 2010; Peine, M y col., 2016], la secreción de IL-6 e IL-23 en la diferenciación hacia un perfil celular de tipo Th17 [Kimura y Kishimoto. 2010; Yamashita y col., 2011; Revu y col., 2018] y las citoquinas IL-21 e IL-6 intervienen en la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores foliculares (Thf) [Spolski y Leonard. 2010; Eto y col., 2011]. Por otro lado, la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  promueven la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un perfil Treg [Hsu y col., 2015; Wang y col., 2023].

Cada perfil de linfocito T efector produce citoquinas claves que determinan su auto amplificación e inhiben a los otros perfiles. El perfil Th1 se caracteriza por la producción de IFN- $\gamma$  y proporciona protección contra microorganismos intracelulares, como bacterias y virus [Krueger y col., 2021], el perfil Th2 se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y se desarrolla en respuesta a infecciones con parásitos helmintos [Symowski y Voehring. 2019], el perfil Th17 se caracteriza por la producción de IL-17 e IL-22 y participa en la respuesta contra bacterias extracelulares y hongos [Li y col., 2018; Sugaya. 2020; Mills. 2022] y el perfil Thf se caracteriza por la secreción de IL-21 y posee un rol importante en la inmunidad protectora ayudando a las linfocitos B a producir anticuerpos frente a patógenos invasores [Gassen y col., 2021]. Las respuestas inmunes innatas y adaptativas son normalmente contenidas por los Treg y en ausencia de citoquinas proinflamatorias, los Treg y las citoquinas secretadas por estos (IL-10, TGF-  $\beta$ ) aseguran que el estado basal en las mucosas sea un entorno tolerogénico por la inhibición directa de la función o la diferenciación de los linfocitos T efectores [Maynard y Weaver. 2009; Park y col., 2018; Tordesillas y Berin. 2018]. Además, la

tolerización del sistema inmune adaptativo a la microbiota comensal promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia un perfil Treg en lugar de linfocitos T efectores [Barnes y Powrie. 2009; Lyu y col., 2022].



**Imagen 9.** Representación de la polarización de linfocitos T y las citoquinas liberadas por cada perfil celular. Se esquematiza las citoquinas liberadas por las DC maduras, que activan a determinados factores de transcripción involucrados en la polarización de los linfocitos T hacia cada perfil celular. También, se observa las citoquinas efectoras liberadas por cada perfil de linfocito T que los caracteriza. Plantilla tomada de la aplicación BioRender, creada por Akiko Iwasaki.

#### 7.4.5. Linfocitos B y producción de anticuerpos T-dependiente y T-independiente.

Los linfocitos B se originan a partir de una célula madre hematopoyética, de linaje linfoide, y pasan por diferentes etapas hasta convertirse finalmente en linfocitos B maduros y linfocitos B de la zona marginal. Los linfocitos B maduros migran hacia los folículos linfoides, dirigidos por citoquinas y quimioquinas, y recirculan entre estos, la linfa y la sangre en busca de antígenos exógenos [Vieira y Cumano. 2004; Ghosh y col., 2019].

La activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B a plasmoblastos, células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de

memoria se puede iniciar de 2 maneras: una activación dependiente de linfocitos T y una activación independiente de estas células [Zubler. 2001]. Se habla de activación T dependiente, cuando los linfocitos B, particularmente los linfocitos B2 o clásicos, reconocen a antígenos exógenos a través de sus receptores de inmunoglobulina (Ig). Posteriormente, dicho antígeno es internalizado dentro de los linfocitos B2, donde es procesado y vuelto a expresar en la superficie en forma de péptidos en el MHCII. El clon de linfocito T CD4+ que posea un TCR capaz de reconocer específicamente a la secuencia de aminoácidos que el linfocito B2 le presenta bajo el contexto de MHCII, se activará y le suministrará al linfocito B citoquinas y otras señales necesarias para que éste último complete su activación. Cabe destacar que en el proceso de activación de ambas células se ven involucradas moléculas coestimuladoras como CD40 y CD80/86 sobre la superficie del linfocito B y CD40L y CD28 sobre el linfocito T CD4+ activado [Vinuesa y Chang. 2013; Nutt y col., 2015]. Dicho proceso de activación T dependiente se lleva a cabo en la zona de linfocitos T perifoliculares de los sitios inductores [Hoffman y col., 2016]. Los linfocitos B activados en esa zona peri o extrafolicular forman un foco primario de diferenciación hacia plasmoblastos; los cuales aún poseen la capacidad de dividirse y de activar a linfocitos T, mientras que secretan anticuerpos, fundamentalmente Ig de isotipo M (IgM). Estos linfocitos B en forma de plasmoblastos pueden continuar dividiéndose hasta alcanzar una diferenciación terminal y convertirse en células plasmáticas, las cuales ya no son capaces de dividirse. Estas plasmoblastos y células plasmáticas proporcionan anticuerpos que pueden unirse al antígeno, neutralizarlo y/u opsonizarlo para que sea fagocitado y destruido por macrófagos y neutrófilos [Vinuesa y Chang. 2013]. Sin embargo, la afinidad de dichos anticuerpos por el antígeno es relativamente baja, ya que todavía no han experimentado los procesos de hipermutación somática y de selección para la unión al antígeno y, por ende, solamente sirven en una primera instancia para restringir el número de microorganismos mientras se producen anticuerpos de alta afinidad [Chan y col., 2009].

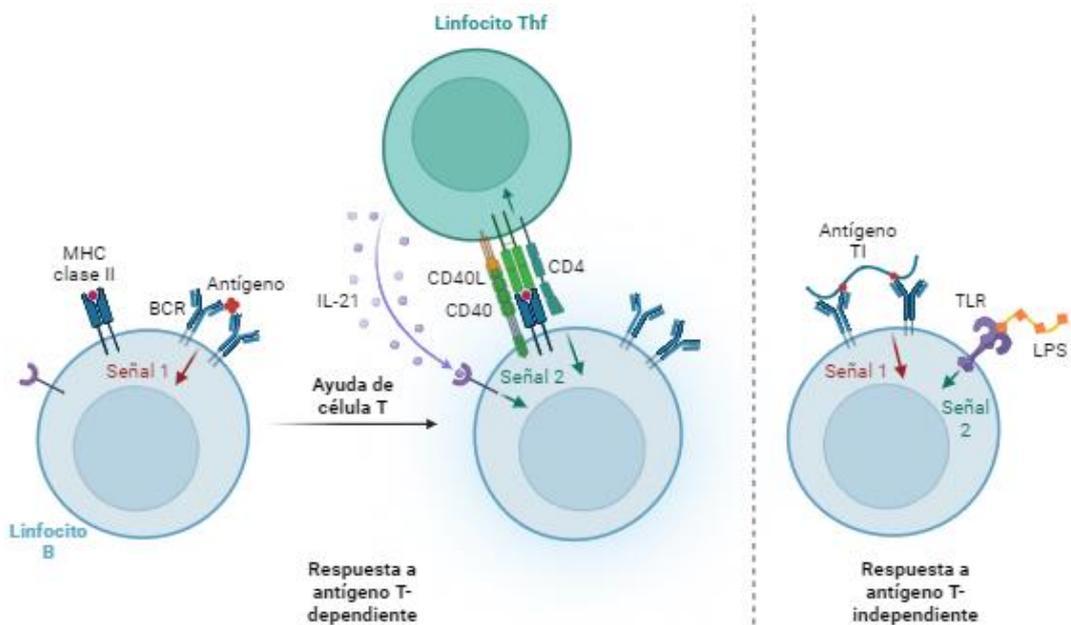
Por otro lado, algunos linfocitos B2 activados en la zona peri o extrafolicular ingresan a los folículos y allí pasan por un proceso de proliferación rápida lo que

da como resultado la formación de grandes acumulaciones de linfocitos B específicos para el antígeno. El folículo se agranda a medida que los linfocitos B2 que ingresan proliferan, y a dicho folículo se lo denomina centro germinal [Tarlinton. 2008]. Allí, los genes de los linfocitos B2 que codifican para las Ig quedan sujetos a 2 procesos importantes: la hipermutación somática y el cambio de isotipo. El primero de estos procesos requiere de la interacción con linfocitos T CD4+ y tiene como resultado la producción de anticuerpos con mayor afinidad y avidéz al antígeno que estimuló originalmente a ese clon de linfocito B2 [Maul y Gearhart. 2010; Methot y Di Noia. 2017]. Para el cambio de isotipo también son necesarias señales coestimuladoras proporcionadas por linfocitos T CD4+ (la interacción CD40-CD40L) o, en ocasiones, la activación de TLR presentes en el linfocito B [Senger y col., 2015]. Normalmente, un linfocito B virgen expresa en su superficie receptores de Ig de isotipo D y M, y ante la presencia de determinadas citoquinas experimenta cambio de isotipo. En presencia de IL-4 realizan cambio de isotipo hacia IgG1 e IgE [Avery y col., 2008; Kashiwada y col., 2010], en presencia de TGF- $\beta$  se produce un cambio de isotipo hacia IgA e IgG2b [Jang y col., 2015; Senger y col., 2015], con IL-5 hacia IgA [Hashiguchi y col., 2020] y con IFN- $\gamma$  hacia IgG3 e IgG2a [Mousavi y col., 2008; Mortensen y col., 2015].

Ciertas subpoblaciones de linfocitos B poseen mecanismos para responder a clases particulares de antígenos con la producción de anticuerpos sin la colaboración de linfocitos T [Prieto y Felipe. 2017]. Estos antígenos suelen ser polivalentes, repetitivos y están compartidos entre muchas especies microbianas y se diferencian en 2 clases: antígeno timo independiente (TI) -1 y TI-2. Los antígenos TI-1, como el LPS bacteriano, estimulan a los linfocitos B a través de sus TLR y solo una pequeña fracción de los anticuerpos producidos serán capaces de unirse de manera eficiente al antígeno, ya que cuentan con una afinidad muy variable. Los antígenos TI-2, como polisacáridos bacterianos capsulares o la flagelina polimérica, son capaces de estimular parcialmente a los linfocitos B a través de sus BCR en ausencia de otras células y no pueden estimular a los linfocitos B inmaduros, ni tampoco actúan como activadores policlonales, a diferencia de los antígenos TI-1 [Bonilla y Oettgen. 2010; Quintanar-Stephano y col., 2010; Trück y col., 2013]. Los antígenos TI también

pueden proporcionar señales activadoras a los linfocitos B a través de las DC. Esto ocurre por la presentación antigénica a los linfocitos B a través de una vía endocítica no degradativa presente en las DC [Bergtold y col., 2005]. Durante este proceso, las DC liberan factores solubles inductores del cambio de isotipo estructural y funcionalmente relacionados a CD40L, incluyendo al factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF), y un ligando inductor de la proliferación (APRIL) [Litinskiy y col., 2002; Schneider. 2005]. BAFF y APRIL inducen el cambio de isotipo activando a los linfocitos B en cooperación con citoquinas liberadas por las DC, macrófagos, células estromales y células epiteliales [Puga y col., 2011].

Los linfocitos B que median la respuesta de antígenos TI son fundamentalmente los linfocitos B1, los cuales predominan en las cavidades pleurales y peritoneales, y su principal función es proteger a dichas cavidades corporales contra infecciones [Haas. 2015]. De hecho, los anticuerpos secretados por los linfocitos B1 reconocen determinantes antigénicos expresados en bacterias del intestino y del sistema respiratorio, y se dirigen principalmente hacia antígenos repetidos comunes como la fosfatidil colina [Prieto y Felipe. 2017]. En respuesta a ligandos microbianos de TLR, los linfocitos B1 migran desde el peritoneo al intestino, incluyendo la LP, donde se diferencian a plasmoblastos y células plasmáticas secretoras de anticuerpos [Ha y col., 2006], y constituyen hasta el 50% del total de la población de células plasmáticas secretoras de IgA [Meyer-Bahlburg. 2015], siendo la principal fuente de anticuerpos naturales. Dichos anticuerpos son cruciales, ya que proporcionan un rápido reconocimiento y protección contra patógenos a los cuales no hubo una exposición previa, otorgando una protección clave durante el período comprendido entre la aparición de la infección y la producción de una respuesta inmune de anticuerpos específicos [Holodick y col., 2017].



**Imagen 10.** Esquema en donde se ve representada la producción de anticuerpos de manera T-dependiente (desencadena por antígenos capaces de ser reconocidos e internalizados por el BCR y presentados en la superficie de los linfocitos bajo el contexto de MHCII a linfocitos Thf) y T-independiente (desencadena por antígenos que activan a los linfocitos B a través de su BCR o de sus TLR y la producción de anticuerpos no requiere de la colaboración de linfocitos Thf). Plantilla tomada de la aplicación BioRender, creada por Akiko Iwasaki.

#### 7.4.6. Memoria inmunológica.

Los linfocitos T de memoria pueden encontrarse en tejidos periféricos y se denominan linfocitos T de memoria residentes, en órganos linfoides secundarios donde reciben el nombre de linfocitos T de memoria central o asociados a tejido no linfoide, en especial mucosas, denominados linfocitos T de memoria efectora [Shin e Iwasaki. 2013]. Por su parte, los linfocitos B de memoria suelen hallarse en órganos linfoides secundarios [Yoshida y col., 2010], mientras que las células plasmáticas de vida media larga se encuentran en médula ósea secretando activamente anticuerpos por meses o incluso hasta años [Halliley y col., 2015]. Tanto los linfocitos B de memoria como los linfocitos T de memoria central, efectora y residentes que fueron estimulados inicialmente por un determinado antígeno, conforman a la llamada memoria inmunológica, y tienen la capacidad de activarse rápidamente y de diferenciarse nuevamente a plasmoblasto, célula

plasmática secretora de anticuerpo, linfocito T efector o a nuevos linfocitos T y B de memoria después de un segundo encuentro con ese mismo antígeno [Netea y col., 2019]. Es decir, la memoria inmunológica se caracteriza por poseer la capacidad de responder más rápida y robustamente ante un segundo, tercer encuentro, y así sucesivamente, contra un mismo antígeno o agente infeccioso.

### **7.5. Anticuerpos y su función efectora según su isotipo.**

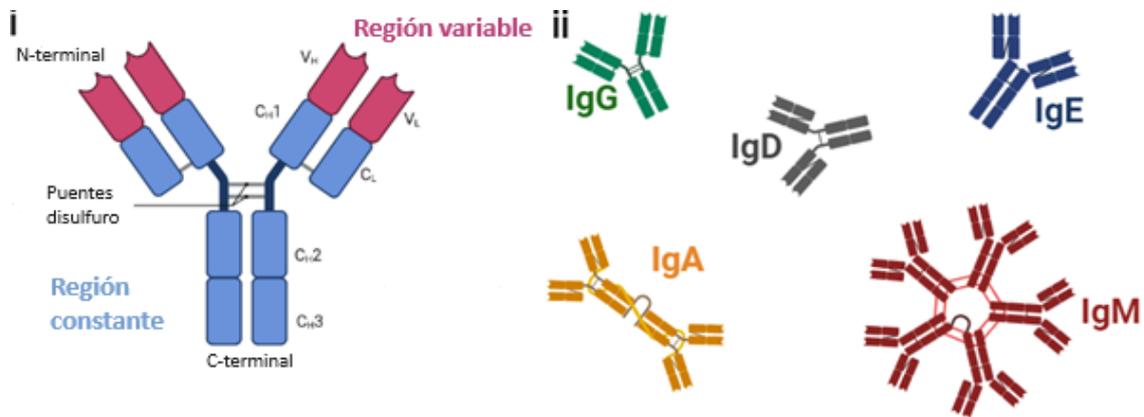
Los anticuerpos son proteínas circulantes producidas por las células plasmáticas, derivadas de los linfocitos B, en respuesta a la exposición a antígenos [Vinuesa y Chang. 2013]. Los anticuerpos existen de 2 formas: unidos a membrana, constituyendo el BCR en la superficie de los linfocitos B, y secretados [Hoffman y col., 2015; Noviski y col., 2018]; los cuales median distintos mecanismos efectores de eliminación de antígenos, dentro de los cuales se destacan la neutralización, la opsonización, la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [Lu y col., 2017]. Los anticuerpos neutralizantes evitan que los patógenos interactúen con las células del hospedador, confiriéndoles protección al interferir con algún efecto biológico que el patógeno posea. Los anticuerpos opsonizantes se caracterizan por ser anticuerpos de unión que no interfieren con la infectividad del patógeno, sin embargo, son útiles para marcar a éstos y alertar a células inmunes, particularmente macrófagos, aunque también neutrófilos, células dendríticas y células NK, para que los fagociten y destruyan.

Los anticuerpos están formados por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas livianas, unidas por enlaces disulfuro. En ellos también se identifican 2 regiones: una variable y la otra constante. La región variable, presente tanto en la cadena ligera como en la pesada, participa en el reconocimiento de antígenos; mientras que la región constante, si bien está presente en la cadena ligera y pesada, sólo las de la cadena pesada median funciones efectoras al interactuar con otras moléculas y células del sistema inmune. La región constante de los anticuerpos puede dividirse en 5 clases o isotipos en función de diferencias en su estructura; y, a su vez, algunos de estos isotipos pueden dividirse en subtipos. Los diferentes

isotipos y subtipos de anticuerpos realizan diferentes funciones efectoras [Hoffman y col., 2015; Lu y col., 2017]. Estos incluyen a:

- IgM: participa en la respuesta inmune primaria a agentes infecciosos o antígenos [Ehrenstein y Notley. 2010]. Puede hallarse como receptor de los linfocitos B y tiene una función efectora relevante en la activación de la vía clásica del complemento [Lu y col., 2017; Noviski y col., 2018]. Posee una vida media circulante de 10 días en suero [Hoffman y col., 2015].
- IgD: tiene una función desconocida contra patógenos. Es el receptor de los linfocitos B que no fueron expuestos a ningún antígeno, por ende, posee un papel esencial en la diferenciación de los linfocitos B vírgenes [Noviski y col., 2018].
- IgE: protege fundamentalmente contra parásitos [Schwartz y col., 2014]. Su función efectora más destacada es la sensibilización de células cebadas: se une a receptores de alta afinidad en mastocitos y basófilos, favoreciendo su desgranulación, causando reacciones alérgicas [Liu y col., 2011]. Posee una vida media circulante de 2 días en suero [Lawrence y col., 2017].
- IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4): es la única Ig capaz de atravesar la barrera placentaria protegiendo al recién nacido y la más abundante en el suero. Posee una vida media circulante de aproximadamente 21 días [Hoffman y col., 2015]; y este tiempo se debe a la capacidad de la IgG de unirse a su receptor Fc neonatal [Lawrence y col., 2017]. Dicho receptor, presente por ejemplo en DC y neutrófilos, transporta a las IgG al interior celular sin dirigirlas a los lisosomas, por lo tanto, las Ig son recicladas y devueltas a la circulación. Todos los subtipos de IgG se destacan por su capacidad neutralizante; sin embargo, la IgG1 se destaca por promover la opsonofagocitosis, la IgG3 por su capacidad de activar la vía clásica del complemento, mientras que la IgG2 e IgG4 se caracterizan por su capacidad de sensibilizar a células NK (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) [Hoffman y col., 2015].
- IgA (IgA1 e IgA2): es el anticuerpo que se encuentra mayoritariamente en las mucosas. Posee una vida media en circulación de 4-6 días y su función

efectora es fundamentalmente la neutralización de patógenos, evitando que colonicen e invadan las mucosas [de Sousa-Pereira y Woof. 2019].



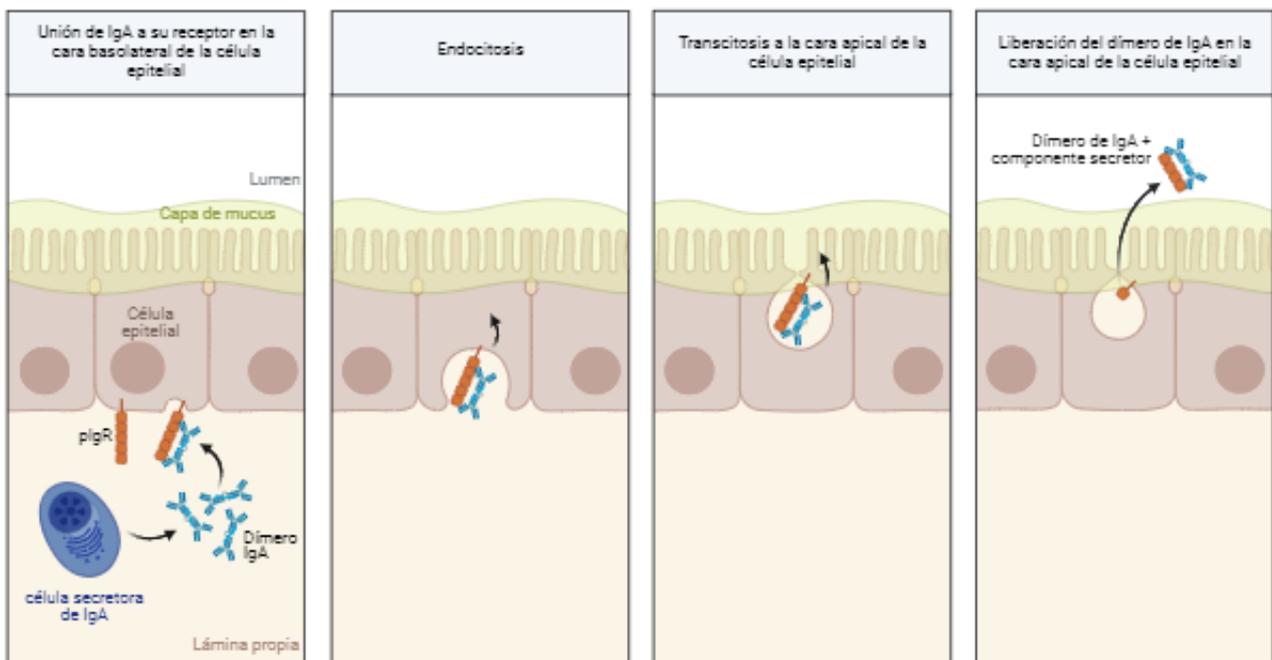
**Imagen 11.** Representación de la estructura general de los anticuerpos (i) y según su isotipo (ii)\*. Plantillas tomadas de la aplicación BioRender. \* Creado por Akiko Iwasaki.

El reconocimiento antígeno-anticuerpo implica una unión no covalente y reversible y, a su vez, es específico [Del Pozo-Yauner y col., 2023]. Cada anticuerpo es capaz de discriminar pequeñas diferencias en la estructura química dentro de un mismo antígeno, y la especificidad de la respuesta es necesaria para que los anticuerpos generados en respuesta a los antígenos de un microorganismo no reaccionen con moléculas propias con una estructura similar. Sin embargo, algunos anticuerpos producidos contra un antígeno pueden unirse a un antígeno diferente, pero con una estructura relacionada. Esto se conoce como reacción cruzada [Mohan y col., 2009], y puede dar lugar a ciertas enfermedades autoinmunes [Trier y Houen. 2023].

### 7.5.1. Secreción de IgA en la mucosa.

Las secreciones de las mucosas contienen dímeros y oligómeros de IgA, tanto en los humanos como en los ratones. Esos polímeros se originan por la interacción de monómeros de IgA con la cadena J, un polipéptido que es sintetizado por las células plasmáticas. Además de ensamblar la IgA monomérica, la cadena J interactúa con el receptor de Ig polimérica (pIgR), una

proteína transportadora de anticuerpos expresada en la superficie basolateral de las células epiteliales de la mucosa. El pIgR transporta a la IgA a través las células epiteliales por un proceso de transcitosis. La IgA se une covalentemente al pIgR, el complejo es internalizado y transportado en una vacuola, y liberado en la región apical de la célula epitelial. Por último, la porción extracelular del pIgR es clivada, constituyendo el componente secretorio que permanece unido a la IgA y que le confiere propiedades mucofílicas y resistencia a la proteólisis. La IgM comparte el mismo mecanismo de transporte que la IgA, aunque el transporte de IgA en la mucosa supera al de IgM [Chen y col., 2020; Wei y Wang. 2021].



**Imagen 12.** Esquema de la translocación de IgA al lumen intestinal mediante transcitosis a través de su unión al pIgR presente en las células epiteliales. Plantilla tomada de la aplicación BioRender, creada por Akiko Iwasaki.

*7.5.2. Relevancia de la IgA en la homeostasis y en la respuesta protectora.*

La IgA tiene un rol importante tanto en condiciones basales o de homeostasis como durante procesos infecciosos. La IgA de alta afinidad que surge como consecuencia de la vía T-dependiente, así como la IgA de baja afinidad que se genera por la vía T-independiente, se ven involucradas en mayor o menor medida en la protección inmune contra la colonización e invasión por microorganismos

patógenos [Slack y col., 2012]. A su vez, la IgA tanto de baja como de alta afinidad resulta importante para confinar bacterias comensales al lumen intestinal en un proceso conocido como exclusión inmune, facilitando la agregación de la microbiota en una biopelícula y anclando a las bacterias a la capa de mucus que cubre la superficie de las células epiteliales [Grasset y col., 2020; Li y col., 2020]. También, la IgA luminal promueve el establecimiento de una relación de mutualismo entre las bacterias comensales y el hospedador, a través de la modulación negativa de la expresión de epítopes proinflamatorios por dichas bacterias y el mantenimiento de comunidades bacterianas apropiadas dentro de segmentos intestinales específicos [Fransen y col., 2015; Weis y Round. 2021].

La IgA puede mediar la transcitosis de antígenos desde la superficie apical al compartimento basolateral a través de las células M o a través de las células epiteliales del duodeno vía el receptor de transferrina (también conocido como CD71) [Mabbott y col., 2013; Mathias y col., 2014]. De esta manera, la entrada de complejos inmunes IgA-antígeno a través de las células M podría ser crítica para la iniciación o amplificación de respuestas inmunes en el intestino al dirigir a los patógenos hacia las DC del domo subepitelial. El receptor para IgA expresado en las DC está constituido por el receptor para el fragmento Fc de la IgA (Fc $\alpha$ RI, también conocido como CD89), que se asocia con la cadena  $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) [Mes y col., 2023]. La unión de la IgA monomérica o dimérica a antígenos para la formación de complejos inmunes inducen respuestas proinflamatorias que requiere la asociación de Fc $\alpha$ RI con la subunidad de la cadena Fc $\gamma$ R [Bakema y van Egmond. 2011].

Finalmente, la IgA es incapaz de activar la vía clásica del complemento [Thurman. 2020] y su principal función efectora es neutralizar toxinas y patógenos sin originar inflamación [Mantis y Forbes. 2010]. Además, los dímeros de IgA remueven microorganismos que superaron la barrera epitelial y esto lo realizan de 2 maneras: transportándolos de regreso al lumen a través del pIgR mencionado anteriormente, y/o promoviendo su eliminación a través del receptor Fc $\alpha$ RI que es expresado por las DC, macrófagos, neutrófilos y otros fagocitos [Phalipon y Corthesy. 2003; Chen y col., 2020].

De esta forma, la IgA contribuye a la homeostasis intestinal al promover una relación de mutualismo con la microbiota intestinal y al proporcionar protección inmune contra patógenos en una forma no inflamatoria que preserva la integridad de la barrera epitelial.

# **Materiales y Métodos**



## **1. CEPAS BACTERIANAS.**

La cepa bacteriana *Escherichia coli* productora de Stx (cepa 125/99) utilizada en la presente tesis fue aislada de la materia fecal de un paciente con SUH, provista generosamente por la Dra. Marta Rivas del Servicio de Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. La cepa 125/99 pertenece al serotipo O157:H7 y al clado 8, y alberga los genes *eae*, *ehxA* y *stx2a*. Presenta una alta citotoxicidad medida *in vitro* en células Vero e *in vivo* [Brando y col., 2008; Amigo y col., 2015]. La cepa 125/99 se mencionará de ahora en más como STEC O157:H7.

Cepa	Origen	Serotipo	Sorbitol	Tipo de Stx	<i>eae</i>	EHEC-Hly	CD50/ml± sd (x10 <sup>11</sup> )
125/99	SUH	O157:H7	-	2	γ	+	17.9 ± 6.2

**Tabla 1. Características de la cepa utilizada en el estudio.**

Esta cepa STEC O157:H7 fue transformada con un plásmido que porta solamente resistencia a ampicilina (125/99 pWSK29) [Fernández-Brando y col., 2020]. Mencionada de ahora en más como pW.

Para la obtención de H7, se utilizó una cepa isogénica de STEC O157:H7 en el que se delecionó el gen *stx2a* ( $\Delta$ Stx2) [Albanese y col., 2015] para evitar la presencia de Stx2 en los sobrenadantes bacterianos a partir de los cuales se purifica H7. Esta cepa fue proporcionada gentilmente por el Dr. Ángel Cataldi.

Las reservas bacterianas fueron conservadas en crioviales a -80°C en caldo tripticasa de soja (TSB, Britania, Argentina) suplementados con glicerol al 10%.

## **2. CULTIVOS BACTERIANOS.**

Las bacterias (ya sea STEC O157:H7, pW o  $\Delta$ Stx2) fueron descongeladas, sembradas en placas de agar Luria-Bertani (LB, Neogen, USA) y crecidas por 18 horas en estufa a 37°C. Se tomaron colonias aisladas con ansa estéril y se resuspendieron en un tubo de centrifuga conteniendo 10 mL de TSB. Las bacterias fueron crecidas a 37°C en estufa con agitación vigorosa (200 rpm) hasta alcanzar su fase exponencial (4-5 horas de cultivo).

### **2.1. Preparación del extracto bacteriano para los ensayos de infección de ratones a la edad del destete.**

Para este modelo de infección se utilizó a la cepa STEC O157:H7. El volumen necesario del cultivo en fase exponencial, conseguido en el paso anterior, se transfirió a un matraz de Erlenmeyer conteniendo entre 50-100 ml de TSB para obtener una dilución final 1/100 del mismo. Se incubó 18 horas a 37°C en estufa con una agitación de 150 rpm. Al día siguiente, el cultivo fue centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Finalmente, el sedimento bacteriano fue resuspendido en un volumen de PBS tal que una dilución 1/100 de la suspensión bacteriana diera una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.7 a 1. Para ello, previamente se realizó una curva de calibración graficando el número de UFC por mL (UFC/mL) de STEC O157:H7 vs la  $DO_{600}$ . Las suspensiones bacterianas fueron cuantificadas (UFC/mL) para cada experimento sembrando diluciones de las mismas en placas de agar LB. Las dosis bacterianas alcanzadas fueron desde  $0,5 \times 10^{11}$  a  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL. Se produjeron nuevas reservas de la cepa STEC O157:H7 a medida que fue necesario colocando 900 microlitros ( $\mu$ L) del cultivo en medio líquido obtenido luego de 18 horas de crecimiento y 100  $\mu$ L de glicerol en un criovial que fue inmediatamente llevado a -80°C.

### **2.2. Preparación del extracto bacteriano para los ensayos de infección de ratones adultos.**

Para este modelo de infección se utilizó a la cepa pW. Luego del cultivo en fase exponencial introducido en el inciso 2, una dilución 1/100 de éste fue llevada a cabo en un tubo de centrifuga conteniendo TSB (10 mL) y este nuevo cultivo se incubó en estufa a 37°C sin agitación. Los cultivos de pW fueron llevados a cabo en presencia de 100  $\mu$ g/mL de ampicilina en todo momento. Después de 18 horas, 1.5 mL del cultivo fue transferido a un microtubo de centrifuga y el mismo se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. El sedimento bacteriano obtenido se lavó dos veces y se resuspendió en PBS con la finalidad de que una dilución 1/2 de dicha suspensión bacteriana en PBS diera una  $DO_{600}$  de 0.7 a 1. Haciendo uso de la curva de calibración, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una

dosis bacteriana que oscile entre  $2.5 \times 10^6$  a  $5.0 \times 10^6$  UFC/mL. El número exacto de UFC/mL fue obtenido mediante recuento de bacterias viables en placas de agar LB.

### **2.3. Preparación del extracto bacteriano para la obtención de H7.**

Para este protocolo de obtención se utilizó a la cepa  $\Delta$ Stx2. Luego del cultivo exponencial en medio TSB, tal como se detalló al comienzo del inciso 2, se realizó una dilución 1/100 de éste en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 100-200 mL de TSB y este nuevo cultivo se incubó en estufa a 37°C sin agitación. Luego de 18 horas, el cultivo se centrifugó, el sedimento se lavó dos veces y se resuspendió finalmente en PBS para obtener una dosis bacteriana que oscile entre  $1.0 \times 10^{11}$  a  $2.5 \times 10^{11}$  UFC/mL haciendo uso de la curva de calibración.

### **2.4. Obtención y preparación de extractos de bacterias comensales.**

Se recolectó por deposición espontánea la materia fecal de un ratón BALB a la edad del destete. Veinte mg de la misma fueron cultivados en 10 mL de TSB en un tubo de centrífuga durante 24 horas a 37°C con agitación. Posteriormente, 10  $\mu$ L de este cultivo líquido fueron sembrados mediante estrías cruzadas en placas de agar eosina azul de metileno durante 24 horas a 37°C para el aislamiento de bacterias comensales. Colonias aisladas correspondientes a una cepa de *E. coli* fueron seleccionadas y cultivadas en 10 mL de TSB durante 18 horas a 37°C. Se produjeron reservas de esta cepa colocando 900  $\mu$ L del cultivo en medio líquido obtenido y 100  $\mu$ L de glicerol en un criovial que fue inmediatamente llevado a -80°C. Cuando fue requerida, esta cepa fue descongelada y 10  $\mu$ L de la misma sembrada mediante estrías cruzadas en agar LB, y crecida durante 18 horas a 37°C. Colonias aisladas de esta cepa *E. coli* fueron crecidas en 10 mL de TSB durante 18 horas a 37°C y los extractos bacterianos, a la concentración requerida, fueron obtenidos haciendo uso de una curva de calibración UFC/mL vs  $DO_{600}$ .

### **3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE H7.**

Para este protocolo de obtención de H7 se utilizó la cepa  $\Delta$ Stx2. La flagelina fue obtenida y purificada como se describió previamente [Hiriart y col., 2012; Kreutzberger y col., 2022]. Mediante agitación de la suspensión bacteriana en vortex a 30 Hz durante 5 minutos, se induce el desprendimiento de los flagelos de la superficie bacteriana. Posteriormente, se centrifugó dicha suspensión a 13000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante libre de bacterias conteniendo los flagelos desprendidos fue recolectado y concentrado mediante ultracentrifugación (165000 g durante 1.5 horas a 4°C en una ultracentrífuga Beckman con un rotor 70Ti, Fullerton, CA, USA). Los flagelos precipitados fueron resuspendidos en PBS y dicha suspensión se calentó durante 10 minutos a 80°C para despolimerizar la flagelina y obtener los monómeros (1-5 mg/L de H7 por cultivo). Luego del calentamiento, se realizó una centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C para precipitar los debris bacterianos. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y la actividad de la flagelina purificada fue evaluada sobre un sistema reportero, la línea celular Caco-2 CCL20:luc [Hiriart y col., 2012; Iraporda y col., 2016] como se detalla en el inciso 7.1. de esta sección.

#### **3.1. Determinación de la pureza de la H7 obtenida por SDS-PAGE.**

La pureza de H7 se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (condiciones de corrida: 150 V, 1.5 horas, amperaje constante) seguido de la tinción con Coomassie-Blue R250 (Sigma, St Louis, MO, USA) toda la noche a temperatura ambiente (0,25% p/v Coomassie Brilliant Blue R-250; 45% v/v etanol; 10% v/v ácido acético glacial). Los geles se destiñeron con solución decolorante (30% v/v etanol; 10% v/v ácido acético glacial). Algunos geles fueron teñidos en paralelo con la tinción de plata, ya que es una técnica más sensible que detecta proteínas a concentraciones más bajas que la tinción con Coomassie-Blue (del orden de los ng). Bandas individuales del peso molecular estimado de H7 (70 kDa) fueron identificadas por ambos métodos. Los niveles de endotoxinas contaminantes (<60 pg LPS/ $\mu$ g H7)

se determinaron mediante la prueba del lisado de amebocito de Limulus (LAL QCL-1000) (Lonza, Walkersville, MD, USA) utilizando LPS de *E. coli* O111:B4 como estándar (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2. Identificación de H7 mediante Western Blot.**

La H7 se corrió a través de un SDS-PAGE al 12% como se mencionó anteriormente y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) utilizando una cuba de transferencia electroforética Trans-Blot (Bio-Rad) (condiciones de transferencia: 60 V, 1.5 horas, amperaje constante). Después de bloquear la membrana con leche en polvo al 5% (p/v) (Sigma) en PBS a 4°C durante 18 horas, se incubó secuencialmente primero con una dilución 1/2000 de un anticuerpo policlonal anti-H7 hecho en conejo (Abcam, Boston, MA, USA), con una dilución 1/50000 de plasma de ratones BALB/c inmunizados con H7 o una dilución 1/10000 de plasma de ratones BALB/c sin inmunizar (control), y segundo con una dilución 1/3000 de anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa, todos ellos diluido en PBS conteniendo leche en polvo al 5% (p/v). Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante al menos 1 hora en un agitador orbital y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tween20 al 0.1% (v/v) en PBS antes y después de cada paso de anticuerpos. Las bandas específicas se visualizaron mediante un sistema de detección quimioluminiscente (ECL) (GE Healthcare Life Sciences) y placas radiográficas Kodak AR film (Kodak).

## **4. MODELOS MURINOS.**

Todos los ratones, independientemente del modelo murino en que serán utilizados, fueron separados al azar en los distintos grupos experimentales. En todos los experimentos luego de la infección con STEC O157:H7, o de la inyección de Stx2, o de la administración de anticuerpos, agua y alimento fueron provistos ad libitum. En todos los modelos murinos llevados a cabo, los ratones fueron observados diariamente. El consumo de alimento y/o el peso corporal fueron

recopilados desde el momento de la infección/inyección hasta la finalización de los experimentos, momento en el cual los sobrevivientes fueron eutanasiados. El peso corporal fue expresado en forma porcentual como la pérdida/ganancia de peso respecto al peso inicial. Según se detalle el tiempo en cada modelo murino, en todos los casos se tomaron aproximadamente 100  $\mu$ L de sangre mediante punción del plexo submandibular con aguja hipodérmica (25Gx5/8”) en un microtubo de centrifuga de 0.5 mL conteniendo 5  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM. El recuento total y diferencial de leucocitos se realizó en un contador hematológico automatizado (Abacus Junior Vet, Diatron, USA). La sangre se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para separar el plasma el cual se almacenó a -20°C hasta la determinación de la urea plasmática mediante un kit comercial enzimático-colorimétrico (Wiener Lab, Argentina) siguiendo las instrucciones de éste y/o la determinación de IgG anti-H7, IgG anti- flagelina de *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028 (FliC), IgG anti-STEC y/o IgG anti-Stx2B por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). La materia fecal, en caso de haber sido recolectada, se pesó y se ajustó a una concentración de 250 mg/mL en PBS con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM (Sigma) (para el caso de los ratones inmunizados o no con H7 y FliC, y posteriormente infectados) o a 1 g/mL de PBS con PMSF 1mM (en el caso de los ratones BALB y C57 infectados al destete). Después de una vigorosa homogeneización con vortex, la materia fecal se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta la determinación de IgA anti-STEC y/o IgA e IgG anti-H7 y anti-FliC por ELISA (indicado de ahora en más como sobrenadantes de materia fecal).

#### **4.1. Ratones y declaración institucional sobre el uso de animales de experimentación.**

Los ratones BALB y C57 se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Medicina Experimental – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – Academia Nacional de Medicina (IMEX-CONICET-ANM). Los ratones se alojaron en jaulas transparentes de propileno en condiciones ambientales controladas (temperatura 24 $\pm$ 2°C; humedad 50 $\pm$ 10%) con un ciclo de 12 horas de luz y 12

horas de oscuridad. Los ratones de cada cepa murina destinados a producción fueron adquiridos del Charles River Laboratories; los mismos eran SPF y todos los ratones producidos a partir de estas colonias madre se mantuvieron bajo los mismos cuidados.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IMEX-CONICET-ANM de acuerdo con los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio [National Research Council (U.S.) 2011. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals]. Los números de protocolos otorgados por el CICUAL fueron el 58/2018 y el 86/2021. La salud y el comportamiento de los ratones se evaluaron dos veces al día. Se evitó cualquier dolor innecesario, molestia o lesión a los animales. Los ratones que con el curso de los experimentos adoptaron un aspecto moribundo (con una pérdida de peso mayor al 30% de su valor inicial y/o niveles plasmáticos de urea superiores a 200 mg%) fueron eutanasiados mediante la administración por vía intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg ratón) y xilacina (15 mg/kg ratón) con posterior dislocación cervical. Se utilizaron las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para definir los puntos finales.

#### **4.2. Administración de Stx2a e.v.**

Para los experimentos en los cuales fueron analizados los efectos específicos dependientes de la Stx2a, ratones BALB y C57 (sexo indistinto) al momento del destete (17-19 días de edad, 6-10 gramos de peso) y con 4 horas de ayuno previas fueron anestesiados con isoflurano e inoculados de manera e.v. a través del plexo retro-orbital con 100  $\mu$ L de Stx2a recombinante, producida y purificada previamente en el laboratorio, conteniendo 1 ng (dosis 1 ng/ratón). Esta dosis corresponde a una dosis letal 100% (1DL<sub>100</sub>) provocando la muerte de los ratones en 3 días aproximadamente. Se utilizó la misma alícuota y dosis de Stx2a recombinante para todos los experimentos. El grupo control recibió el mismo volumen de PBS. Los ratones fueron observados diariamente para constatar la

morbi-mortalidad y al día 3 post inoculación, fueron sangrados para determinar el recuento total y diferencial de leucocitos en sangre entera, y en plasma, la urea.

#### **4.3. Esquema de depleción de linfocitos B.**

Ratones BALB (sexo indistinto) a la edad del destete y con 4 horas de ayuno fueron inoculados con un anticuerpo monoclonal anti-B220 proveniente de líquido ascítico, cedido gentilmente por el Dr. Rumbo. Se inoculó una única dosis de manera e.v. conteniendo 100  $\mu$ L con 2.8 mg de anticuerpo anti-B220 a cada ratón. En paralelo, se administró PBS al grupo control de ratones no deplecionados. A las 4, 24 y 48 h post inoculación, ratones de ambos tratamientos fueron eutanasiados y se les extrajo el bazo y el MLN para su posterior procesamiento y determinación de linfocitos B por citometría de flujo.

#### **4.4. Esquema de inmunización con H7 y FliC.**

Ratones BALB de 6 a 8 semanas de edad (de sexo indistinto) fueron inmunizados por vía intranasal con 20  $\mu$ L de un stock de H7 purificada de 500  $\mu$ g/mL en PBS (10  $\mu$ g de H7 purificada/ratón). Los ratones recibieron 3 dosis, sin adyuvante, a intervalos de 10 días. Se llevaron dos grupos controles: uno que recibió por vía intranasal PBS y otro FliC, proporcionada amablemente por el Dr. Rumbo (10  $\mu$ g/dosis/ratón), siguiendo el mismo esquema para verificar que cualquier protección que se observara fuera específica de los anticuerpos anti-H7. Se obtuvieron muestras de sangre y de materia fecal a diferentes tiempos post inmunización (en los días 17, 27, 41, 62 y 83 post primera dosis) para la determinación de anticuerpos anti-H7. Sangre y materia fecal de los grupos controles (PBS y FliC) fueron analizadas de manera similar para determinar también los niveles de anticuerpos anti-H7 y anti-FliC. Al día 83 post primera dosis, a algunos ratones inmunizados o no con H7 se les realizó una prueba de hipersensibilidad de tipo retardada como se detalla más adelante.

#### **4.5. Infección de ratones BALB y C57 al destete con la cepa STEC O157:H7.**

Para los experimentos de infección, inmediatamente luego del destete y con 4 horas de ayuno, ratones BALB y C57 (sexo indistinto) recibieron por vía oral 100 µL de una suspensión bacteriana de la cepa STEC O157:H7 conteniendo  $0,5 \times 10^{11}$  -  $3,0 \times 10^{11}$  UFC/mL mediante el empleo de una cánula de acero inoxidable (modelo 7.7.1; 0,38 mm x 22G, Harvard Apparatus, USA). Los ratones controles recibieron el mismo volumen de PBS estéril. Este rango de dosis bacteriana induce la muerte del 100% de los ratones C57 a partir del tercer día post infección (p.i.). Los ratones fueron observados diariamente para observar la morbi-mortalidad y al día 3 p.i. fueron sangrados para determinar el recuento total y diferencial de leucocitos en sangre entera y la urea plasmática.

Algunos ratones de ambas cepas fueron eutanasiados al día 3 p.i. para realizar estudios de la colonización bacteriana, la permeabilidad intestinal e histología de riñón e intestinos como se detalla más adelante.

#### **4.6. Infección de ratones depletados de linfocitos B con la cepa STEC O157:H7.**

Ratones BALB a la edad del destete fueron aleatoriamente distribuidos en 3 grupos: 1) grupo control sin administración de anti-B220 y sin infectar, 2) grupo sin administración de anti-B220 e infectados y 3) grupo administrado de anti-B220 e infectados. El esquema de depleción de linfocitos B consistió en la administración e.v. a través del plexo retro-orbital de 2 dosis diarias de anticuerpo monoclonal anti-B220 de ratón (100 µL conteniendo 2.8 mg de anticuerpo/dosis) espaciadas por 8 h durante 3 días, para garantizar en todo momento la depleción constante de linfocitos B. Los grupos 1) y 2) recibieron como control 2 dosis diarias de 100 µL de PBS de manera e.v. durante los 3 días. Los ratones de los grupos 2) y 3) fueron infectados oralmente luego de 4 horas de ayuno haciendo uso de una cánula de acero inoxidable estéril con una dosis bacteriana de la cepa STEC O157:H7 mayor a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ratón y 4 horas después de la primera administración de anticuerpo anti-B220. Los ratones del grupo 1) recibieron PBS oralmente como control. Los

ratones de todos los grupos fueron observados diariamente para determinar la morbi-mortalidad y al día 3 p.i., fueron sangrados para determinar el recuento total y diferencial de leucocitos en sangre entera; y en plasma, la urea y los niveles de IgG anti-STE<sub>C</sub> y anti-Stx<sub>2</sub>. A su vez, a este mismo tiempo, se recolectó materia fecal para su posterior procesamiento y determinación de IgA unida a bacteria. Al día 7 p.i., los ratones sobrevivientes fueron eutanasiados para determinar en el plasma y en la materia fecal los niveles de IgG anti-STE<sub>C</sub> y anti-Stx<sub>2</sub>, e IgA unida a bacteria por citometría de flujo, respectivamente.

#### **4.7. Infección de ratones adultos con la cepa pW.**

Ratones BALB y C57 de 6-8 semanas de edad fueron inoculados por vía oral haciendo uso de una cánula de acero inoxidable con ampicilina (100 mg/kg/ratón) administrada en 2 dosis espaciadas por 24 horas. Seis horas después de la primera inoculación, los ratones de cada cepa fueron distribuidos en distintos grupos al azar e infectados por vía oral con 100 µL de distintas suspensiones bacterianas de la cepa pW/grupo (suspensiones que iban desde 10<sup>6</sup> UFC/mL hasta 10<sup>10</sup> UFC/mL). Haciendo uso de la curva de calibración, se realizaron las diluciones necesarias para obtener dosis bacterianas que estén dentro del rango deseado. El número exacto de UFC/mL fue obtenido mediante recuento de bacterias viables en placas de agar LB. Los ratones infectados fueron observados y pesados diariamente hasta la finalización de los experimentos. Al día 7 p.i., se tomaron muestras de sangre como se detalló anteriormente para la determinación del recuento total y diferencial de leucocitos en sangre entera, y en plasma, la urea como indicador de daño sistémico por Stx<sub>2</sub>.

El mismo protocolo de tratamiento con antibiótico e infección fue llevado a cabo en ratones no inmunizados (controles), inmunizados con FliC o H7 (al día 41 después de la primera dosis), con la salvedad de que el rango de dosis bacteriana utilizado oscilaba entre 4.0-6.0 x10<sup>6</sup> UFC/mL. Este rango de dosis provoca la muerte de los ratones al día 7 u 8 p.i. Los ratones fueron observados diariamente. Se tomaron muestras de sangre a los días 7 y 15 p.i. para análisis de laboratorio, los cuales incluyeron la determinación de IgG anti-H7 y anti-Stx<sub>2</sub>B, recuento total

y diferencial de leucocitos y determinación de urea en plasma. También se tomaron muestras de materia fecal al día 7 y 15 p.i. para determinar IgA e IgG anti-H7. Algunos ratones de cada tratamiento fueron eutanasiados al día 6 p.i., para realizar estudios de colonización bacteriana y de permeabilidad intestinal, como se detalla más adelante en esta sección.

#### **4.8. Esquema de reinfección.**

Ratones BALB a la edad del destete y con 4 horas de ayuno fueron inoculados oralmente mediante la administración de una dosis no letal de STEC O157:H7 ( $1 \times 10^{10}$  UFC/ratón) a través de una cánula de acero inoxidable. Para incrementar el título de anticuerpos anti-STECS, fueron desafiados 2 veces más con STEC O157:H7 ( $5 \times 10^{10}$  UFC/ratón) a intervalos de 10 días entre la primera, segunda y tercera infección. Los ratones fueron sangrados 7 días después de la primera y segunda infección para determinar el título de anticuerpos anti-STECS en plasma. Siete días después de la tercera infección, los ratones fueron eutanasiados para obtener el plasma y la materia fecal y determinar el título de IgG e IgA anti-STECS, respectivamente, finalmente alcanzado y realizar estudios funcionales *in vitro*. En paralelo, se llevó un grupo control de ratones BALB que fueron inoculados oralmente con PBS a los mismos tiempos de infección para la recolección de plasma y materia fecal sin anticuerpos específicos.

#### **4.9. Intercambio de crías.**

Inmediatamente post parto, el veterinario encargado del bioterio procedió a intercambiar las crías de una ratona BALB con las crías de una ratona C57 que nacieron el mismo día. De tal manera que crías BALB cohabitaron durante 17 días con una nodriza C57, y a su vez crías C57 cohabitaron durante 17 días con una nodriza BALB [Marchetti y col., 2014; Pocheron y col., 2021]. Pasados los 17 días, los ratones fueron destetados y luego de 4 horas de ayuno, infectados según lo descrito en el inciso 4.5. de esta sección. A los ratones se les realizó un seguimiento como se explicó en dicho inciso; evaluándose urea plasmática y recuento total y diferencial de leucocitos a 3 días p.i.; y el peso, consumo de alimento y estado de morbi-mortalidad diariamente.

## **5. ENSAYOS REALIZADOS CON RATONES INFECTADOS *IN VIVO* Y *EX VIVO*.**

### **5.1. Colonización intestinal y excreción bacteriana.**

Cinco cm de la porción terminal del intestino delgado (íleon) y del intestino grueso proximal, junto con la totalidad del ciego fueron extraídos. El contenido luminal al igual que las heces fueron removidos. Los segmentos intestinales fueron lavados con PBS y homogeneizados en 0.5 mL de PBS. En el caso de los ratones infectados a la edad del destete, las heces (correspondiente a lo recuperado del intestino grueso) fueron diluidas con PBS a 100 mg/mL para determinar la excreción bacteriana. El recuento de bacterias STEC O157:H7 viables se llevó a cabo realizando diluciones seriadas de los tejidos intestinales homogeneizados ( $10^{-1}$ - $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ) y de las heces ( $10^{-2}$ - $10^{-4}$ - $10^{-6}$ - $10^{-8}$ ). Cada dilución fue sembrada por triplicado mediante el método de la gota en superficie en placas de agar MacConkey Sorbitol (SMAC, Difco, USA) durante 16 horas de incubación en estufa a 37°C. Las colonias no fermentadoras de sorbitol fueron contadas y seleccionadas al azar para la confirmación de la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *rffO157* mediante el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las cepas de referencia *E. coli* EDL 933, O157:H7 (Stx 1 y Stx 2) y ATCC 25922 fueron usadas como control positivo y negativo respectivamente. Este ensayo fue realizado en el Hospital del Niño R. A. Exeni de La Matanza por nuestra colaboradora Gabriela A. Fiorentino [Fiorentino y col., 2023]. La colonización por segmento intestinal se expresó como UFC/cm tejido considerando las UFC por mL y el volumen total de cada tejido homogeneizado. La excreción bacteriana se calculó como UFC por gramo de heces considerando las UFC obtenidas por mL.

### **5.2. Análisis de la permeabilidad intestinal.**

Para medir la función de la barrera intestinal, se utilizó Dextrán conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Dx-FITC) (4 kDa; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, USA). El ensayo se llevó a cabo como se describió anteriormente por Bernal y col., 2021. Se administró por vía oral 100  $\mu$ L de PBS conteniendo 80 g/L de Dx-FITC y la

fluorescencia del mismo se midió en el plasma después de 4 horas de tratamiento. Las muestras de sangre se tomaron como se mencionó anteriormente y el plasma se diluyó en una proporción 1:1 (volumen final de 100  $\mu$ L) con tampón carbonato 15 mM- bicarbonato 25 mM, pH 9.6. La fluorescencia fue determinada con un fluorímetro de microvolúmenes (Thermo Scientific NanoDrop, USA) utilizando una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de detección de 514 nm. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF). El mismo procedimiento fue llevado a cabo con ratones controles sin infectar.

### **5.3. Estudios histológicos de riñón e intestinos.**

Al tercer día p.i., a ratones BALB y C57 se les extrajeron los riñones y 3 cm del íleon terminal y del intestino grueso proximal. Se colocaron inmediatamente para su fijación en 3 mL de formalina al 10% (solución de formol en PBS en una relación 1:25) y se procesaron para la evaluación histológica. Los tejidos fijados se embebieron en parafina y se obtuvieron secciones las cuales fueron coloreadas con hematoxilina-eosina (H&E) para su examinación por microscopía de campo claro (Eclipse E-200, Nikon). Se realizó una semi cuantificación del daño histológico en los intestinos y riñones. El mismo procedimiento fue llevado a cabo con ratones controles sin infectar. Las observaciones de los tejidos y la semi cuantificación del daño tisular fueron realizadas bajo la observación y el criterio de la Dra. Elsa Zotta, especialista en patología.

### **5.4. Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH).**

Al día 83 post primera inmunización, los ratones controles e inmunizados con H7 se inocularon por vía intradérmica con 5  $\mu$ g de H7 purificada en 40  $\mu$ L de PBS en la almohadilla plantar derecha, mientras que el mismo volumen de PBS se inyectó en la izquierda. La reacción de DTH se evaluó midiendo el grosor de cada almohadilla plantar utilizando un calibre a 48 y 72 h post inoculación (Oditest, H. C. Kröplin, Schlüchtern, Alemania) y se expresó como hinchazón calculando la diferencia en mm entre ambas almohadillas plantares ( $\Delta$ mm= mm almohadilla plantar derecha – mm almohadilla plantar izquierda).

### **5.5. Neutralización de Stx2 *in vivo*.**

Para los ensayos de neutralización *in vivo*, los ratones BALB infectados a la edad del destete y los respectivos controles sin infectar, se desafiaron mediante la inoculación e.v. de 1 ng de Stx2 (1DL<sub>100</sub>) a los 7 días p.i. como se describió anteriormente. Los ratones fueron observados diariamente para constatar la morbi-mortalidad y al día 3 post desafío sangrados por el plexo submandibular para la determinación de la urea plasmática.

### **5.6. Protección con nanoanticuerpos anti-Stx2.**

Ratones C57 infectados a la edad del destete en ayunas con una dosis letal de STEC O157:H7 fueron separados al azar en dos grupos. Previamente a la infección, ambos grupos fueron anestesiados con isoflurano y un grupo recibió de manera e.v. por el seno retroorbital una única dosis de 100 µL de nanoanticuerpo neutralizante anti-Stx2, un anticuerpo de dominio simple (VHH 2vb8; 30 pmol/ratón), el cual fue preparado y testeado en el laboratorio [Mejías y col., 2016]. El otro grupo recibió 100 µL de PBS (grupo control). Se evaluó la morbi-mortalidad de los ratones hasta el día 6 p.i., y ciertos parámetros clínicos y bioquímicos (peso diario y urea a 3 días p.i.).

### **5.7. Transferencia de plasma de ratones BALB infectados a ratones C57.**

Los ratones BALB que sobrevivieron a la infección con STEC O157:H7 a la edad del destete fueron sangrados al día 7 p.i. por el plexo submandibular como se detalló anteriormente. La sangre entera fue centrifugada a 4000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, y el plasma aislado y almacenado a -20°C hasta su uso. Paralelamente ratones BALB de la misma edad no infectados fueron sangrados como controles.

Los ratones C57 se separaron aleatoriamente en dos grupos inmediatamente después de la infección a la edad del destete. Un grupo de ratones recibió a las 2 y 24 horas p.i. inyecciones i.p. con 200 µL de plasma de ratón BALB infectado obtenido al séptimo día p.i. (diluido 1/5 con PBS). El otro grupo recibió 2 inyecciones i.p. de 200 µL de plasma de ratón BALB control (no infectado) (diluido

1/5). Los ratones fueron observados diariamente para evaluar la morbi-mortalidad y al día 3 p.i. sangrados por el plexo submandibular para determinar urea plasmática.

## **6. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.**

### **6.1. Bazo.**

Los bazos una vez extraídos, fueron depositados en microtubos de centrífuga de 1.5 mL conteniendo 1 mL de medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, San Diego, CA, USA) suplementado con antibióticos (100 U/mL penicilina/estreptomicina) (EMEVE Microvet SRL Laboratories, Buenos Aires, Argentina) (medio RPMI 1640 incompleto), mantenidos en frío. Para su procesamiento dentro de cabinas de seguridad biológica de tipo IIa, se utilizaron mallas metálicas estériles. Cada malla fue humedecida con medio RPMI 1640 incompleto frío por ambos lados sobre una placa de Petri, y cada bazo se disgregó por separado sobre una cara de la malla con tijera de acero inoxidable. Cuando la cara de la malla en la cual se estaba disgregando el tejido se observó saturada de células, se lavó con medio RPMI 1640 incompleto (5 lavados de 1 mL por bazo) para liberar las células retenidas y la suspensión de esplenocitos fue recolectada luego de cada lavado en un tubo de centrífuga de 15 mL. La suspensión celular fue centrifugada a 0.5 g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante descartado, y el pellet resuspendido en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y EDTA 0.1 mM, pH= 7.4). Luego de 5 minutos de lisis en frío, la misma fue detenida mediante el agregado de 10 mL de PBS. Luego de otra centrifugación a 0.5 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido finalmente resuspendido en 3 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina) inactivado por calor, antibióticos (EMEVE), β-mercaptoetanol al 0.05 mM (Sigma) y L-glutamina 2 mM (EMEVE) (medio RPMI 1640 completo). Se realizó una dilución 1/100 de la suspensión de esplenocitos en medio RPMI incompleto en microtubos de

centrífuga de 1.5 mL para obtener la cantidad de linfocitos por L en el contador hematológico.

## **6.2. Ganglio mesentérico y mediastínico.**

Los ganglios regionales al intestino (mesentéricos) y al pulmón (mediastínicos) fueron extraídos y puestos sobre papel aluminio estéril para quitarles el exceso de grasa y/o de tejido conectivo. Posteriormente, fueron depositados en microtubos de centrífuga de 1.5 mL conteniendo 1 mL de medio RPMI 1640 incompleto, mantenidos en frío. Para su procesamiento, también se utilizaron mallas metálicas estériles, siguiendo el mismo procedimiento que para el bazo. Se realizaron 3 lavados con medio RPMI 1640 incompleto de 1 mL por ganglio y la suspensión de leucocitos fue recolectada luego de cada lavado en un tubo de centrífuga de 15 mL. La suspensión celular fue centrifugada a 0.5 g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante descartado y el pellet resuspendido en 1 mL de medio RPMI 1640 completo. Se realizó una dilución 1/10 de la suspensión de linfocitos en medio RPMI incompleto en microtubos de centrífuga de 1.5 mL para obtener la cantidad de linfocitos por L en el contador hematológico.

## **7. CULTIVOS CELULARES.**

### **7.1. Cultivo de la línea celular reportera Caco-2 CCL20:luc.**

Estas células tienen la particularidad que en respuesta a agonistas de TLR5 activan al factor de transcripción NFκB, el cual es encargado de promover la síntesis de diversas citoquinas proinflamatorias (entre ellas CCL20). Estas células poseen además el gen *CCL20* ligado al gen de la luciferasa, por lo que en respuesta a agonistas de TLR5 ésta última se sintetiza, y parte de ella se acumula dentro de la célula mientras que otra parte se libera al medio extracelular. Al añadir el sustrato de la enzima, se obtiene un producto que puede ser determinado por luminiscencia. Los crioviales conteniendo las células Caco-2 CCL20:luc en nitrógeno líquido a -196°C fueron descongelados y las células viables se cultivaron en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo DMEM (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA) suplementado de 15% de SFB

inactivado por calor (Natocor), antibióticos (penicilina/estreptomicina 100 U/mL) (EMEVE) y 2 mM de L-glutamina (EMEVE) en estufa gaseada a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% saturada de humedad. Las células se utilizaron luego de 8 días de cultivo, cuando la confluencia de estas era cercana al 90%. Las mismas fueron repicadas, contadas y sembradas en placas de cultivo celular de 48 pocillos. Las células fueron estimuladas con H7 (100 ng/mL) o FliC (100 ng/mL). La estimulación se llevó a cabo por 6 horas, momento en el cual las células se lisaron con buffer de lisis (Promega, Madison, WI, USA) y se evaluó la actividad luciferasa utilizando un kit comercial (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, determinando dicha actividad en un luminómetro (Luminoskan TL Plus) para establecer unidades arbitrarias de luminiscencia. Células sin ningún tratamiento se incluyeron como control negativo sin estimulación.

## **7.2. Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC).**

La médula ósea fue extraída de los fémures y tibias de ratones BALB adultos. Después de lisar los glóbulos rojos con tampón de lisis de glóbulos rojos, las células de médula ósea se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Jet Biofil, Guangzhou, China) a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL. Las células fueron cultivadas con GM-CSF de ratón recombinante (10 ng/mL) e IL-4 (5 ng/ml) (Peprotech, Cranbury, Nueva Jersey, USA) en medio RPMI 1640 completo durante 7 días en estufa gaseada a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% saturada de humedad con cambios de medio en los días 2, 4 y 6. El día 7 de cultivo, las células se recolectaron, contaron y se volvieron a sembrar en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a  $5 \times 10^4$  células/pocillo en 100 µL medio RPMI completo. Las células fueron estimuladas con 1 µg/mL de H7 (200 ng/pocillo), o 1 µg/ml de LPS de *E. coli* O111:B4 (200 ng/pocillo) (Sigma) o cultivadas sin estimular como control negativo. Veinticuatro horas después, los sobrenadantes se recogieron para el análisis de citoquinas y las células se recolectaron para su análisis por citometría de flujo.

### **7.3. Cultivo de leucocitos y tinción con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE).**

Los leucocitos se obtuvieron de los ganglios linfáticos que drenan los pulmones (ganglio del mediastino; LN) y bazos de ratones controles e inmunizados con H7 como se describió anteriormente, y fueron teñidos con CFSE (Sigma). La tinción se realizó incubando  $5.0 \times 10^6$  leucocitos/mL de medio RPMI incompleto conteniendo  $5 \mu\text{M}$  de CFSE durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en estufa gaseada. Después de la incubación, los leucocitos se lavaron dos veces con PBS (1200 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ) y se dejaron en reposo durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en estufa gaseada. Luego, las células se lavaron dos veces nuevamente y se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de  $5.0 \times 10^5$  leucocitos/pocillo en medio RPMI completo. Estos leucocitos se cultivaron con BMDC ( $5 \times 10^4$ /pocillo) estimuladas previamente con 200 ng H7 (24 horas antes) o con BMDC sin estimular (control negativo) durante 5 días en una estufa gaseada a  $37^\circ\text{C}$  bajo 5% de  $\text{CO}_2$  en una atmósfera humidificada. Pasado el tiempo de cultivo, los sobrenadantes se recolectaron para la determinación de la concentración de citoquinas y las células se recogieron para su análisis por citometría de flujo.

## **8. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR ELISA.**

### **8.1. Determinación de IgG anti-Stx2B en plasma.**

La IgG específica anti-Stx2B en plasma se determinó mediante ELISA como se describió previamente por Mejias y col., 2013. Placas MaxiSorp de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se sensibilizaron con  $0.25 \mu\text{g}$  de Stx2B conjugada a histidina en  $50 \mu\text{L}$  de tampón carbonato  $15 \text{ mM}$ - bicarbonato  $25 \text{ mM}$  (pH 9.6) (buffer  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ) durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados de  $250 \mu\text{L}$ /pozo con 0,05% de Tween20 en PBS (PBS-T) y los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con  $200 \mu\text{L}$ /pozo de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) al 2% en PBS (PBS-BSA) por 1.5 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados más con PBS-T, las placas se incubaron durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  con plasma de ratón diluido seriadamente en PBS-BSA por

duplicado. Al día siguiente, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-IgG H+L de ratón conjugado a peroxidasa, Invitrogen) en una dilución 1/3000 en PBS-BSA (50 µL/pozo) 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación orbital. Posteriormente a la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se colocó 50 µL/pozo de solución reveladora (buffer citrato-fosfato 0,1M pH 5.0, OPD 2 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v), la cual se dejó incubar 5 minutos en oscuridad permitiendo desarrollar la reacción. Ésta última se detuvo con 25 µL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se leyó su DO a 492 nm en un lector de placas Asys UVM340 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Los niveles de anticuerpos fueron expresados como DO<sub>492</sub> que representa el valor obtenido para cada muestra menos la DO<sub>492</sub> obtenida para su pegado inespecífico. Como controles del ensayo se llevó: un control positivo, que correspondía a una muestra de suero policlonal de un ratón inmunizado con BLS-Stx2B [Mejías y col., 2013], controles negativos que correspondían a plasma de ratones BALB/c no inmunizados ni infectados, controles de pegado inespecífico (cada dilución de plasma testeada se incubó también en un pozo que no estaba sensibilizado con Stx2B) y el llamado control “sin muestra” (control de reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario a la Stx2B, o al bloqueo, o pegado inespecífico a la placa).

## **8.2. Determinación de IgA e IgG anti-flagelina en plasma y sobrenadantes de materia fecal.**

Placas MaxiSorp de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH) se sensibilizaron con 0.25 µg de H7 o FliC en 50 µL de PBS (pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con 250 µL de PBS-T, se bloquearon con 200 µL de leche en polvo al 3% (solución de bloqueo) durante 1.5 horas a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente 3 veces con PBS-T y finalmente se incubaron con 50 µL plasma o sobrenadantes de materia fecal diluidos seriadamente con leche en polvo al 1% a 4°C durante toda la noche (por duplicado en el caso del plasma, y por cuadruplicado en el caso de la materia fecal: 2 pocillos para detectar IgA y los otros 2 para detectar IgG). Al día siguiente, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con 50 µL de suero de cabra policlonal

anti-IgG H+L y anti-IgA H+L de ratón (Invitrogen), según corresponda, acoplados a peroxidasa diluidos 1/3000 en solución de bloqueo durante 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación orbital. Luego, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-T y se colocó en ellos la solución reveladora mencionada anteriormente. Se desarrolló una reacción colorimétrica la cual se llevó a cabo a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos, momento en el cual la misma es detenida mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Se midió la DO<sub>492</sub> de cada pocillo en un lector de placas Asys UVM340. Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO<sub>492</sub>, que representan el valor obtenido para cada muestra menos la DO<sub>492</sub> obtenida en su pegado inespecífico (cuando los pocillos no fueron sensibilizados con ninguna proteína) o como el título (última dilución de la muestra que presenta DO<sub>492</sub> superior a la de las muestras controles estadísticamente significativa).

### **8.3. Determinación de IgA e IgG anti-STE<sub>C</sub> en plasma y materia fecal.**

#### *8.3.1. Preparación de bacterias STE<sub>C</sub> como antígeno.*

Tres colonias aisladas de la cepa STE<sub>C</sub> O157:H7 en agar LB fueron tomadas con ansa estéril y resuspendidas en un tubo de centrifuga conteniendo 5 mL de TSB. Luego de que el cultivo alcanzara la fase exponencial, éste fue centrifugado y el precipitado bacteriano se lavó dos veces con PBS, siendo resuspendido finalmente en 1 mL PBS conteniendo 0.5% de formalina. La suspensión bacteriana resultante fue almacenada a temperatura ambiente por 3 días. Pasado ese lapso, la suspensión bacteriana ya fijada se lavó dos veces para eliminar la Stx2 libre y fue resuspendida en 1 mL de PBS. A esta última suspensión bacteriana se le realizó una dilución al medio en PBS para determinar su DO<sub>600</sub> en un espectrofotómetro.

#### *8.3.2. Determinación de IgA e IgG específica.*

La determinación de IgA e IgG en los sobrenadantes de materia fecal, y de IgG en plasma, fue realizada por el método de ELISA como se describió previamente por Fernández-Brando y col., 2014, con algunas modificaciones. Placas de 96

pocillos fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con 50 µL por pozo con la suspensión fijada de la cepa STEC O157:H7 en una concentración de 0,1 DO<sub>600</sub> por mL de buffer CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Luego de lavar tres veces con PBS-T (250 µL/pozo), se bloquearon los sitios de pegado inespecífico con 200 µL/pozo de PBS-BSA por 1.5 horas a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubaron los sobrenadantes de materia fecal o los plasmas diluidos seriadamente en PBS-BSA por 18 horas a 4°C (50 µL/pozo) por cuadruplicado (2 pocillos para detectar IgA y los otros 2 para detectar IgG específica) o duplicado, respectivamente. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubaron las placas con una dilución 1/3000 del anticuerpo secundario de suero de cabra anti-IgA o anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Invitrogen) en PBS-BSA por 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación orbital. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se colocó 50 µL/pozo de solución reveladora, la cual se dejó incubar por 10 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 25 µL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se leyó su DO<sub>492</sub> en un lector de placas. Los niveles de anticuerpos fueron expresados como DO<sub>492</sub> que representa el valor obtenido para cada muestra menos la DO obtenida para su pegado inespecífico.

#### **8.4. Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos.**

Las concentraciones de IFN-γ murino (15-2000 pg/mL), TNF-α (8-1000 pg/ml), IL-4 (4-500 pg/ml), IL-5 (4-500 pg/ml), IL-6 (4-500 pg/ml), IL-12p70 (15-2000 pg/ml) e IL-17A (4-500 pg/mL) se midieron en los sobrenadantes de cultivos mencionados anteriormente usando un ELISA sándwich estandarizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El rango de detección para cada kit de ELISA proporcionado por el proveedor se indica entre paréntesis. La DO se determinó a 450 nm (DO<sub>450</sub>) en un lector de placas Asys UVM340. La concentración de cada citoquina se calculó extrapolando la DO<sub>450</sub> obtenida en la curva estándar y multiplicando por el factor de dilución realizado.

## **9. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

### **9.1. Determinación de IgA unida a bacterias.**

#### *9.1.1. Preparación de la muestra.*

Para este procedimiento, los sobrenadantes de materia fecal fueron preparados de la manera mencionada anteriormente (al comienzo del inciso 4) pero con una leve modificación. Luego de obtener el homogenato ajustado a 1 g/mL de PBS + 1mM de PMSF, el mismo fue centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante descartando el precipitado que contenía los debris de la materia fecal. El sobrenadante fue centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos para precipitar la totalidad de las bacterias entéricas, además de las bacterias pertenecientes a la cepa STEC O157:H7. Las bacterias precipitadas fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS y se les añadió 0,8  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal anti-IgA de ratón hecho en rata conjugado a FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA). Se realizó la marcación por 40 minutos a 4°C en oscuridad y, pasado ese lapso, se lavaron las bacterias con 1 mL de PBS. El precipitado bacteriano fue resuspendido en 100  $\mu$ L de paraformaldehído (PFA) al 2% y se fijó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, momento en el cual el PFA fue removido y se añadió 200  $\mu$ L de isoflow (BD Biosciences) para su adquisición en tubos de citometría.

#### *9.1.2. Adquisición.*

Las bacterias se adquirieron en un citómetro de flujo FASCalibur (Becton Dickinson, USA) y fueron seleccionadas basándose en los parámetros de tamaño y complejidad (en escala logarítmica para el detector de dispersión frontal FSC y para el detector de dispersión lateral SSC). Se adquirieron 20000 eventos por muestra analizada. Se obtuvo un control de autofluorescencia por cada muestra, que consistía en las bacterias de la materia fecal de cada ratón sin incubar con el anticuerpo secundario, el cual fue útil para establecer la configuración del citómetro. Los resultados se analizaron mediante el software FlowJo 10.0,

determinando el porcentaje de bacterias sensibilizadas *in vivo* con IgA de ratón, estableciendo como negativo el control de autofluorescencia para cada muestra.

### **9.2. Determinación de la opsonización *in vitro*.**

Para la determinación de la opsonización *in vitro*, se llevó a cabo la incubación de los sobrenadantes de materia fecal (diluidos al 1/2) o el plasma (diluido 1/10) obtenidos de ratones controles y re infectados, junto con bacterias STEC O157:H7 ( $1 \times 10^7$  UFC) en 100  $\mu$ L de PBS en microtubos de centrífuga de 1.5 mL. La concentración de bacterias STEC O157:H7 fue ajustada haciendo uso de una curva de calibración estándar  $DO_{600}$  vs UFC/mL. La incubación bacteria-muestra se llevó a cabo por 18 horas a 4°C. Posteriormente, dichas incubaciones fueron lavadas y el pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en 200  $\mu$ L de PBS para llevar a cabo la incubación con 0,8  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal anti-IgA o anti-IgG de ratón acoplado a FITC (BD Biosciences) durante 40 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, cada microtubo fue lavado para descartar el exceso de anticuerpo secundario y el pellet bacteriano se resuspendió finalmente en 200  $\mu$ L de isoflow en tubos de citometría. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FASCalibur (Becton Dickinson). Como control de especificidad, se realizaron los mismos procedimientos con una *E. coli* comensal aislada de la materia fecal de un ratón BALB. Bacterias STEC O157:H7 y *E. coli* comensales solas en isoflow (tubos de autofluorescencia) fueron utilizadas como controles para establecer la configuración del citómetro. Las bacterias fueron delimitadas en base a su tamaño y granularidad (en una escala logarítmica para FSC y SSC), y 20000 eventos fueron adquiridos para su posterior análisis con el software FlowJo 10.0. El porcentaje de bacterias que fueron reconocidas y opsonizadas por anticuerpos específicos presentes en el plasma o en los sobrenadantes de la materia fecal fue calculado estableciendo como negativo para el análisis los controles de autofluorescencia para cada incubación bacteria-muestra.

### **9.3. Determinación de la depleción de linfocitos B.**

Los esplenocitos y leucocitos (500.000 células en 200  $\mu$ L de PBS en microtubos de centrífuga de 1.5 mL) obtenidos post procesamiento del bazo y MLN de ratones

depletados de linfocitos B o no, fueron incubados con un anticuerpo contra el CD que permite identificar linfocitos B (CD19) de ratón acoplado a FITC (0.8  $\mu$ L/tubo) (BD Biosciences) durante 40 minutos a 4°C al abrigo de la luz. Las suspensiones celulares fueron lavadas con 1 mL de PBS y el precipitado celular obtenido fue resuspendido en 200  $\mu$ L de PFA al 0.5% por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de la fijación, las células fueron lavadas y resuspendidas finalmente en 200  $\mu$ L de PBS. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro CyFlow Space (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Alemania). Los esplenocitos y leucocitos incubados sin anticuerpos (tubos de autofluorescencia) fueron usados como controles para establecer la configuración del citómetro. Los linfocitos fueron delimitados en base a su tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y 20000 eventos fueron adquiridos para su posterior análisis con el software FlowJo 10.0. Los singletes fueron seleccionados por exclusión mediante el análisis FSC-W vs FSC-A y SSC-W vs SSC-A. El porcentaje de linfocitos CD19 positivos fue calculado estableciendo como negativo a la autofluorescencia de cada muestra.

#### **9.4. Determinación del porcentaje de BMDC maduras activadas.**

Las BMDC fueron incubadas durante 40 min a 4°C al abrigo de la luz con anticuerpos contra los siguientes CD que permiten identificar células dendríticas (CD11c) y células dendríticas maduras (CD86). Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpos monoclonales anti-CD86 de ratón conjugado con PE y anti-CD11c de ratón conjugado con PE-Cy7 (BD Biosciences). Las muestras se adquirieron en un citómetro CyFlow Space. Se utilizaron BMDC incubadas sin anticuerpos como controles para establecer la configuración del citómetro. BMDC incubadas sólo con anti-CD86 PE o con anti-CD11c PE-Cy7 fueron utilizadas para corregir la superposición espectral (tubos de compensación). Las BMDC se delimitaron por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) en un gráfico de dos parámetros y se adquirieron 20000 eventos para su posterior análisis utilizando el software FlowJo 10.0. Los singletes fueron seleccionados mediante análisis FSC-W vs FSC-A y SSC-W vs SSC-A, y el porcentaje de BMDC maduras se determinó como el porcentaje de eventos positivos para CD86 en el total de BMDC (eventos CD11c+).

### **9.5. Determinación de la proliferación celular.**

Después de los 5 días de cultivo con BMDC estimuladas o no con H7, los leucocitos fueron incubados durante 40 min a 4°C al abrigo de la luz con anticuerpos contra los siguientes CD: CD8 (para identificar linfocitos T citotóxicos), CD4 (para identificar linfocitos T colaboradores) o B220 (para identificar los linfocitos B). Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD8 de ratón conjugado con PE, anti-CD4 de ratón conjugado a PE-Cy5 y anti-B220 de ratón conjugado a PE-Cy7 (BD Biosciences). Las muestras se adquirieron en el citómetro CyFlow Space. Los linfocitos incubados sin anticuerpos fueron utilizados como controles para establecer la configuración del citómetro, y linfocitos teñidos solo con CFSE o con cada uno de los distintos anticuerpos como tubos de compensación. Se utilizaron tubos de fluorescencia menos uno (FMO) para identificar y seleccionar poblaciones positivas en estos experimentos multicolores. Los linfocitos fueron delimitados por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y 20000 eventos se adquirieron para su posterior análisis utilizando el software FlowJo 10.0. Los singletes fueron seleccionados por exclusión haciendo uso de los gráficos de dos parámetros FSC-W vs FSC-A y SSC-W frente a SSC-A. La proliferación de linfocitos fue determinada como la disminución de la intensidad de fluorescencia media (IFM geométrica) del CFSE a 5 días de cultivo en comparación con la IFM del CFSE en el tiempo 0 (sin proliferación). El porcentaje de proliferación de linfocitos CD4, CD8 y B220 se calculó como el porcentaje de cada población dentro de las células con baja tinción de CFSE.

## **10. ESTUDIOS FUNCIONALES CON LOS PLASMAS DE LOS RATONES INFECTADOS.**

### **10.1. Inhibición de la motilidad.**

10<sup>3</sup> UFC de STEC O157:H7 fueron incubadas por 18 horas a 4°C con plasma (diluido 1/10) de ratones controles o re infectados en 100 µL de solución final (de PBS) en microtubos de centrifuga de 1.5 mL. Luego de dicha incubación, se realizó un lavado con el agregado de 1 mL de PBS a cada microtubo y el pellet bacteriano fue resuspendido en 100 µL de PBS. Cuatro µL de cada incubación bacteria-

plasma fueron sembrados en el centro de placas de agar blando (1% peptona ácida de caseína, 0.25% de agar y 0.25% NaCl), y luego de 24 y 48 horas de incubación se midieron los halos de difusión para determinar en mm la motilidad bacteriana.

## **10.2. Inhibición del crecimiento bacteriano.**

Los ensayos de inhibición del crecimiento fueron llevados a cabo realizando la misma incubación bacteria-plasma que para el estudio de la inhibición de la motilidad ( $10^3$  UFC de STEC O157:H7 con una dilución 1/10 de plasma de ratones controles o infectados en un volumen final de incubación de 100  $\mu$ L durante 18 horas a 4°C). Luego del lavado del plasma con 1 mL de PBS, el precipitado de bacterias STEC O157:H7 fue sembrado en 3 mL de TSB, que previamente habían sido colocados en placas de cultivo celular de 6 pocillos. La placa de cultivo fue introducida en el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher, USA) y se configuró para que determine la  $DO_{600}$  de cada pocillo de la placa, cada 20 minutos durante 18 horas. A tiempo cero, a cada incubación se le realizó la cuantificación del número de bacterias viables (UFC/mL) sembrando diluciones de las mismas en placas de agar LB para descartar diferencias en el número inicial de bacterias vivas.

## **11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.**

El tamaño de muestra informado en cada figura para cada grupo fue el mismo número utilizado en el análisis estadístico porque no hubo exclusiones. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) cuando se confirman los supuestos de normalidad (distribución gaussiana; prueba de Shapiro-Wilks) y heteroscedasticidad (prueba de Levene). En caso de cumplir con ambos supuestos, la prueba T de Student o el análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores seguido de un post test de Tukey se llevó a cabo según el número de grupos experimentales (tratamientos). En caso de no cumplir con los supuestos, los datos se expresan como la mediana  $\pm$  el rango intercuartil y se analizan con la prueba T no paramétrica (Mann-Whitney). Las curvas de supervivencia

se analizaron para determinar su significancia mediante la prueba de Mantel-Cox. El análisis estadístico de las correlaciones se llevó a cabo mediante el uso del coeficiente de correlación de Spearman. Las ecuaciones de las rectas fueron obtenidas mediante regresión lineal, aplicando el posterior análisis estadístico correspondiente para comparar las pendientes de las mismas. Todos los datos fueron analizados con el software Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) o el software InfoStat (Córdoba, Argentina), y representados gráficamente por el software Prism 8.0. Los resultados obtenidos se consideraron significativos cuando  $p < 0.05$ .

# Resultados

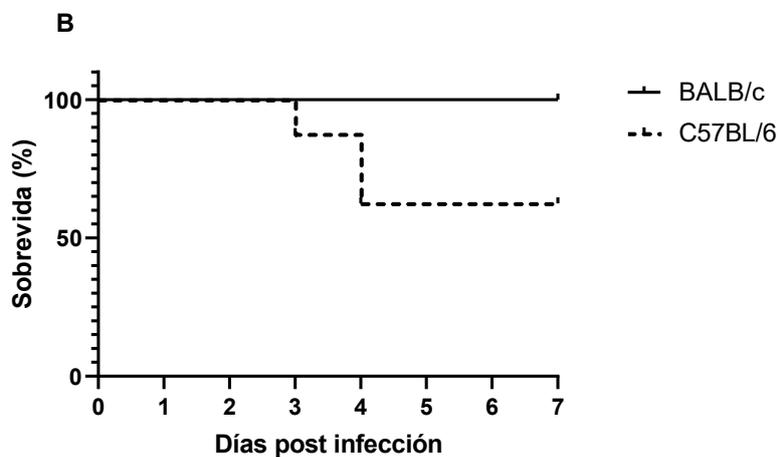
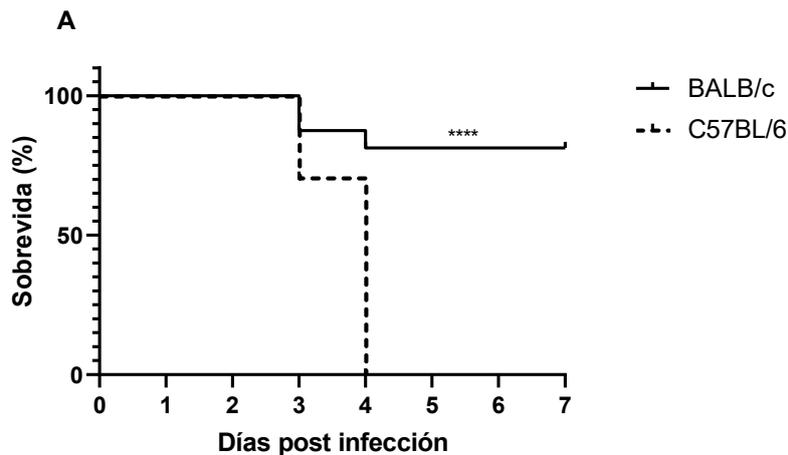


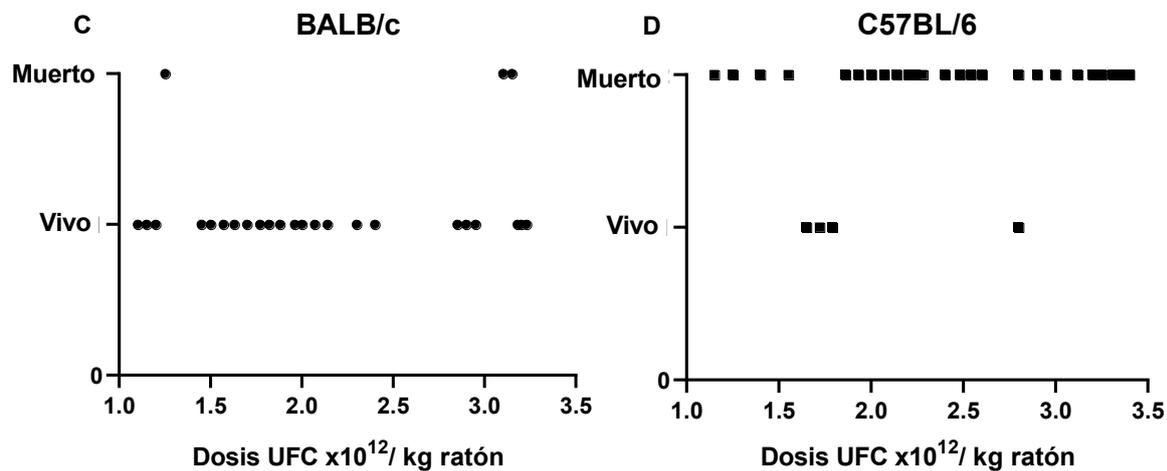
# 1. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS RATONES BALB Y C57 FRENTE A LA INFECCIÓN CON BACTERIAS STEC O157:H7.

Nuestro primer objetivo fue establecer si la susceptibilidad de los ratones BALB y C57 frente a la infección con las bacterias STEC O157:H7 era similar, o, por el contrario, se observaban diferencias significativas que supusieran un componente genético o epigenético involucrado en la evolución hacia formas sistémicas (SUH).

## 1.1. Evaluación de la mortalidad.

Para establecer un modelo murino de infección gastrointestinal con la cepa STEC O157:H7 fue seleccionado el modelo de ratones inmaduros al momento del destete (de entre 16 a 19 días de edad, entre 6 a 10 gramos de peso). Los ratones fueron desafiados por vía oral con distintas dosis infectivas de la cepa STEC O157:H7 para evaluar su susceptibilidad frente a dicha infección.





**Figura 1. Desafío *in vivo* con diferentes dosis infectivas de la cepa STEC O157:H7.** Los ratones BALB y C57 fueron infectados luego del destete con distintas dosis infectivas de la cepa STEC O157:H7. **(A) Dosis letal 100.** 16 ratones BALB y 17 ratones C57 fueron infectados en paralelo con dosis bacterianas superiores a los  $1,20 \times 10^{11}$  UFC/mL (en 3 réplicas biológicas:  $1,40 \times 10^{11}$  UFC/mL,  $2,82 \times 10^{11}$  UFC/mL y  $3,03 \times 10^{11}$  UFC/mL). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Mantel-Cox. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **(B) Dosis letal 50.** 6 ratones BALB y 8 ratones C57 fueron infectados en paralelo con una dosis bacteriana igual a  $1,20 \times 10^{11}$  UFC/mL. Los datos fueron analizados por la prueba Mantel-Cox. **(C) Gráfico dosis – respuesta en ratones BALB.** 27 ratones BALB infectados con distintas dosis de la cepa STEC O157:H7 fueron agrupados en las categorías vivo o muerto, de acuerdo con su evolución final y con la dosis bacteriana recibida (expresada como UFC por kilogramo (kg) de ratón [UFC x10<sup>12</sup>/kg ratón]). **(D) Gráfico dosis – respuesta en ratones C57.** Ídem (C) pero con un  $n=34$ . Los datos de las figuras (C) y (D) fueron analizados por la prueba exacta de Fischer. Diferencia entre cepas \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

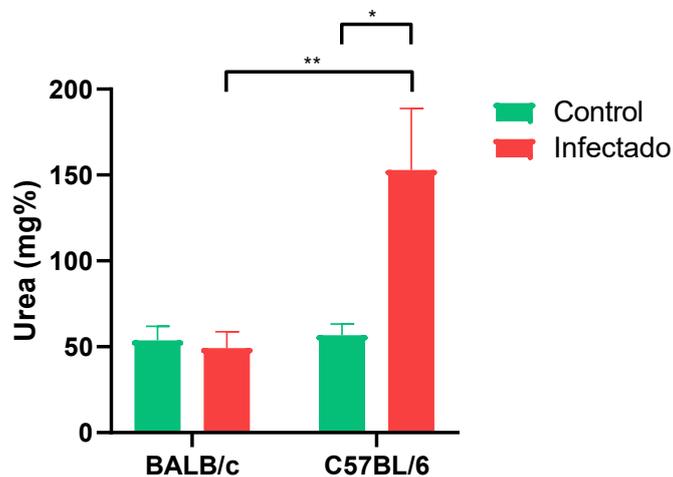
En la Figura 1A y 1B se observa el porcentaje de sobrevivencia luego de la inoculación oral de la STEC O157:H7. En la figura 1A se puede ver que cuando los ratones son infectados con dosis iguales o superiores a  $1,2 \times 10^{11}$  UFC/mL se obtiene una mortalidad del 100% en los ratones C57, y menor al 20% en los BALB, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, cuando son inoculados con dosis menores (Figura 1B) se observa una mortalidad casi del 50% en los ratones C57 y ninguna muerte en la cepa BALB, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se normalizan las dosis al peso en el momento de la infección (Figuras C y D), sin discriminar entre letal 100 y letal 50, se puede observar que dentro del rango de dosis que va desde  $1,0$  a  $3,5 \times 10^{12}$  UFC STEC O157:H7/kg ratón la cepa C57 tiene una mortalidad significativamente mayor a la cepa BALB. Por debajo de este rango, no se observan efectos patológicos en ninguna cepa murina.

## 1.2. Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante la infección con STEC O157:H7.

### 1.2.1. Determinación de la concentración plasmática de urea.

El riñón constituye el principal órgano blanco de la Stx, debido a un efecto directo de la unión de la toxina a su receptor específico Gb3 [Kavaliauskiene y col., 2017], el cual es expresado fundamentalmente por las células endoteliales glomerulares y epiteliales tubulares del riñón en el ratón.

El aumento en la concentración de urea plasmática constituye un indicador bioquímico de disfunción renal. Por lo tanto, los niveles de urea plasmática fueron determinados a los 3 días p.i., momento crítico en el cual se comienza a observar mortalidad en los ratones.

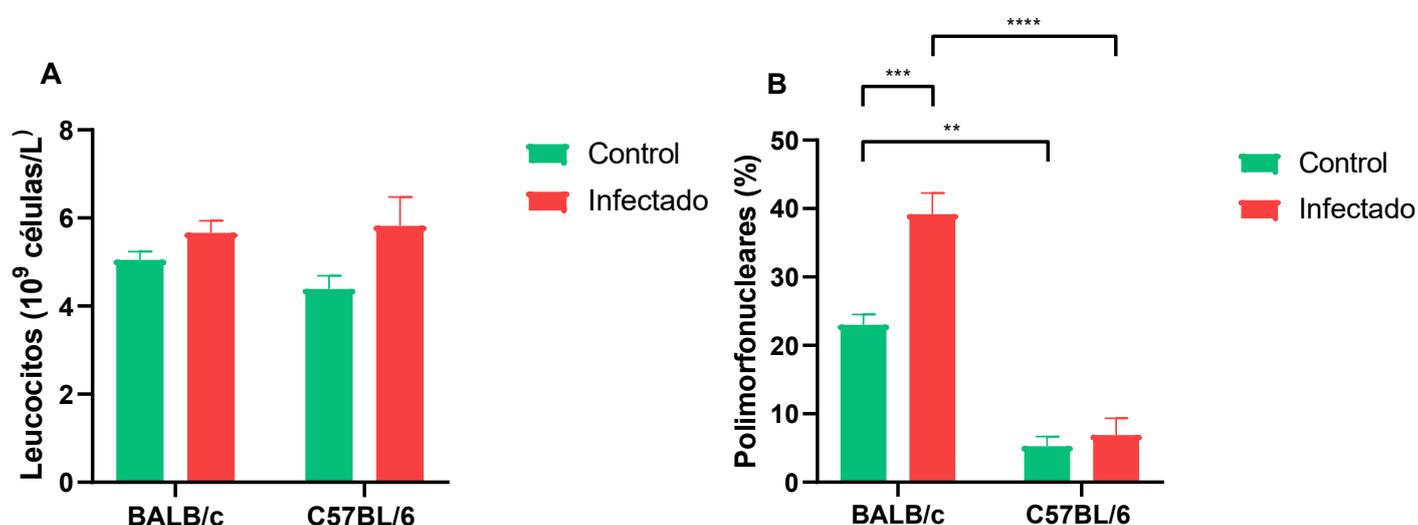


**Figura 2. Concentración plasmática de urea.** Los ratones infectados (en 3 réplicas biológicas) con dosis mayores a  $1,2 \times 10^{11}$  UFC STEC O157:H7/mL fueron sangrados al tercer día p.i. para determinar los niveles de urea en plasma. Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Las barras de error muestran la media  $\pm$  SEM de 5 ratones para el grupo control y 9 ratones para el grupo infectado para cada cepa.

Como puede observarse en la Figura 2, los ratones C57 infectados presentan niveles elevados de urea plasmática al ser comparados tanto con su control como con los ratones BALB infectados. Por su parte, los ratones BALB infectados muestran niveles de urea no significativamente diferentes a los de su control. Los ratones controles de cada cepa no muestran diferencias entre sí en los niveles de urea.

### 1.2.2. Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica.

Los ratones de ambas cepas fueron sangrados al tercer día p.i. para determinar en sangre entera el recuento total de leucocitos y el recuento de PMN.



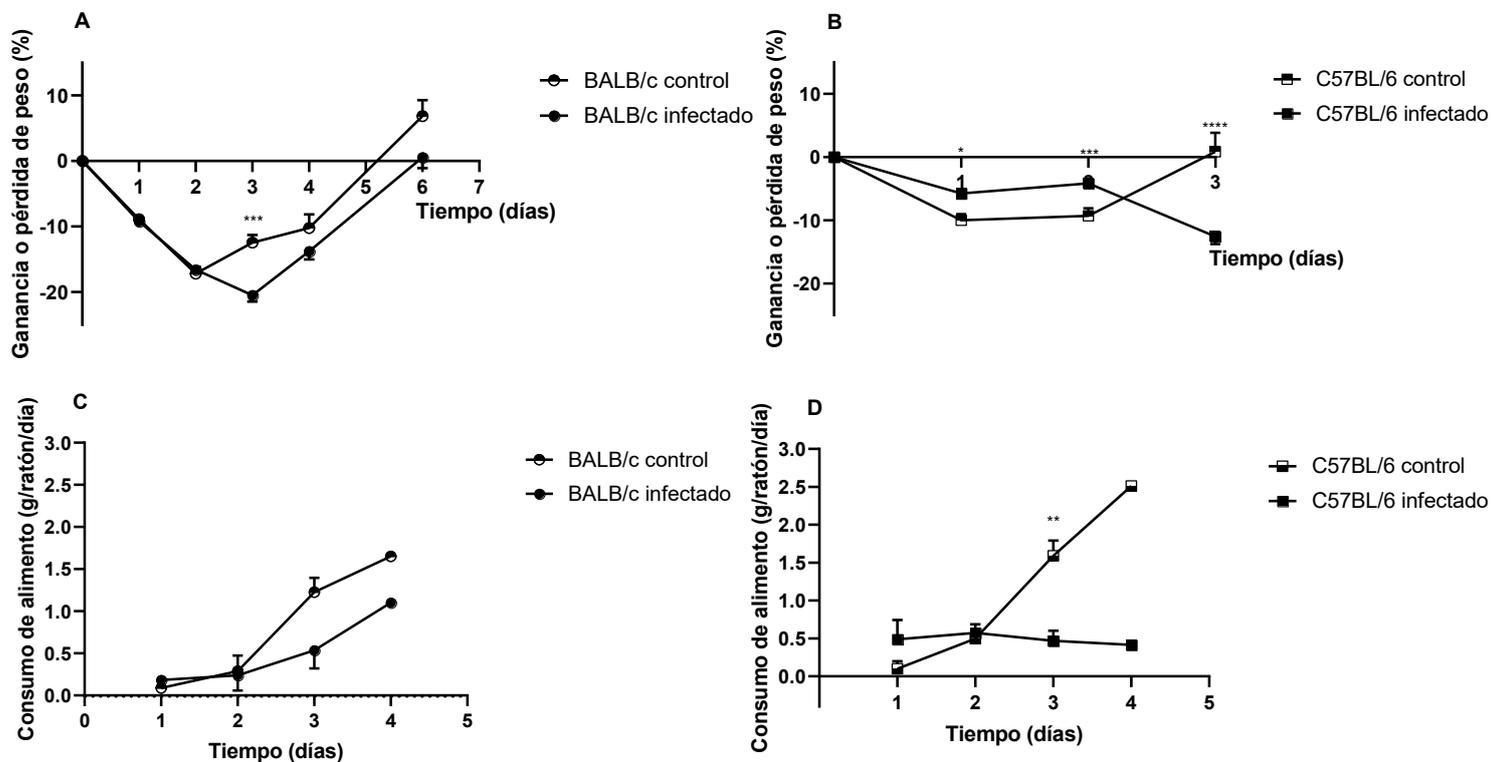
**Figura 3. Recuento de leucocitos.** Los ratones infectados (en 3 réplicas biológicas) con dosis mayores a  $1,2 \times 10^{11}$  UFC STEC O157:H7/mL fueron sangrados al tercer día p.i. para determinar el recuento total de leucocitos y el porcentaje de PMN en sangre entera. **(A) Número absoluto de leucocitos.** **(B) Porcentaje de PMN.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Las barras de error muestran la media  $\pm$  SEM de 4 ratones para el grupo control y 6 ratones para el grupo infectado para cada cepa.

Como puede observarse en la Figura 3, los ratones C57 infectados no presentan leucocitosis ni neutrofilia cuando son comparados con su control (Figura 3A y 3B). En cambio, los ratones BALB infectados no muestran leucocitosis (Figura 3A), pero sí se observa una neutrofilia significativa al ser comparada con el porcentaje de PMN de su control y de los ratones C57 infectados (Figura 3B). Los ratones controles de cada cepa no muestran diferencias entre sí en el recuento total de leucocitos, pero sí se observa un mayor porcentaje basal de PMN en los ratones BALB.

### 1.2.3. Ganancia o pérdida de peso y consumo de alimento p.i.

Como parámetro clínico, se registró el peso de los animales desde el momento del destete y diariamente luego de la infección. A su vez, el peso diario

del alimento antes y después de la infección fue registrado como consumo de alimento.



**Figura 4. Parámetros clínicos y consumo de alimento.** Los ratones infectados (en 3 réplicas biológicas) con dosis mayores a  $1,2 \times 10^{11}$  UFC STEC O157:H7/mL fueron pesados diariamente p.i., al igual que su alimento. El peso fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial de los ratones en todos los tiempos y el consumo de alimento fue registrado teniendo en cuenta la diferencia en el peso del alimento respecto al día anterior y la cantidad de ratones vivos en cada tiempo. **Ganancia o pérdida porcentual de peso respecto al peso inicial de (A) ratones BALB y (B) ratones C57.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Las barras de error muestran la media  $\pm$  SEM de 5 ratones para el grupo control y 15 ratones para el grupo infectado para cada cepa. **Consumo de alimento de (C) ratones BALB y (D) ratones C57.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \*\* $p < 0.01$ . Las barras de error muestran la media  $\pm$  SEM de 4 determinaciones para cada tiempo.

Como puede observarse, los ratones BALB infectados muestran un descenso porcentual de peso (Figura 4A) significativo al día 3 p.i. respecto a su control, que se normaliza a partir del 4 p.i. Respecto del consumo de alimento, no se observan diferencias significativas entre el consumo de los ratones infectados con el de los

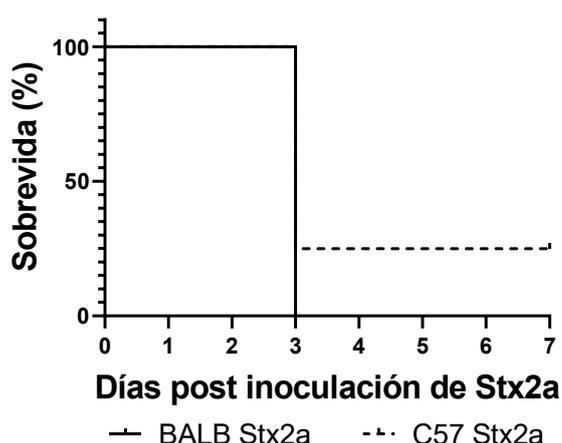
ratones controles (Figura 4C). En los ratones infectados se observa una tendencia de menor consumo al día 3 p.i. ( $p=0.0522$ ).

Por otro lado, en los ratones C57 infectados se observa un aumento porcentual de peso significativo en el día 1 y 2 p.i., pero un descenso al día 3 respecto de su control (Figura 4B). En cuanto al consumo de alimento, se ve una diferencia estadísticamente significativa al día 3 p.i., en la cual se observa que los ratones controles consumen más alimento que los ratones infectados (Figura 4D).

## **2. SUSCEPTIBILIDAD DE LOS RATONES BALB Y C57 FRENTE AL DESAFÍO E.V. CON STX2A.**

### **2.1. Evaluación de la mortalidad.**

Para determinar si las variaciones entre cepas de ratones frente a la evolución de la infección con cepas STEC O157:H7 podía asociarse con diferencias genéticas relacionadas con la susceptibilidad a la Stx (por ejemplo, debido a la mayor expresión del receptor Gb3 en las células endoteliales glomerulares y/o epiteliales tubulares del riñón en la cepa C57), se inocularon ratones BALB y C57 por vía e.v. con una dosis letal de Stx2a (1 ng/ratón) a la edad del destete y en ayunas. Los ratones fueron observados diariamente para constatar su estado de morbi-mortalidad y sobrevida.

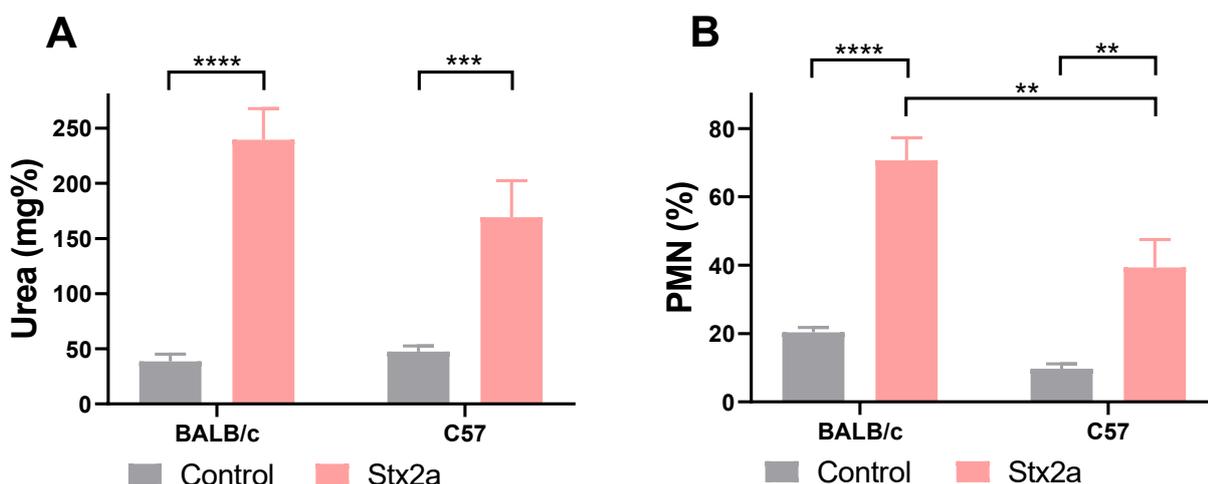


**Figura 5. Desafío *in vivo* con Stx2a.** Ocho ratones de ambas cepas fueron desafiados con Stx2a (1 ng/ratón) o PBS (control) ( $n=5$ /cepa) a la edad del destete y en ayunas. Los ratones fueron observados diariamente para constatar su estado de morbi-mortalidad. **Tasas de supervivencia.** Los datos fueron analizados con la prueba de Mantel-Cox no hallándose diferencias significativas.

En la figura 5 se representa las curvas de sobrevida, expresadas de manera porcentual, observadas luego de la administración e.v. de Stx2a. En dicha figura se puede ver que cuando ratones de ambas cepas son inoculados con 1 ng de Stx2a, el 100% de los ratones BALB muere al cabo de 3 días post inoculación (0% sobrevida), mientras que en la cepa C57 se observa alrededor de un 80% de mortalidad (20% sobrevida), siendo esta diferencia no significativa.

## 2.2. Parámetros bioquímicos y clínicos analizados durante la intoxicación con Stx2a.

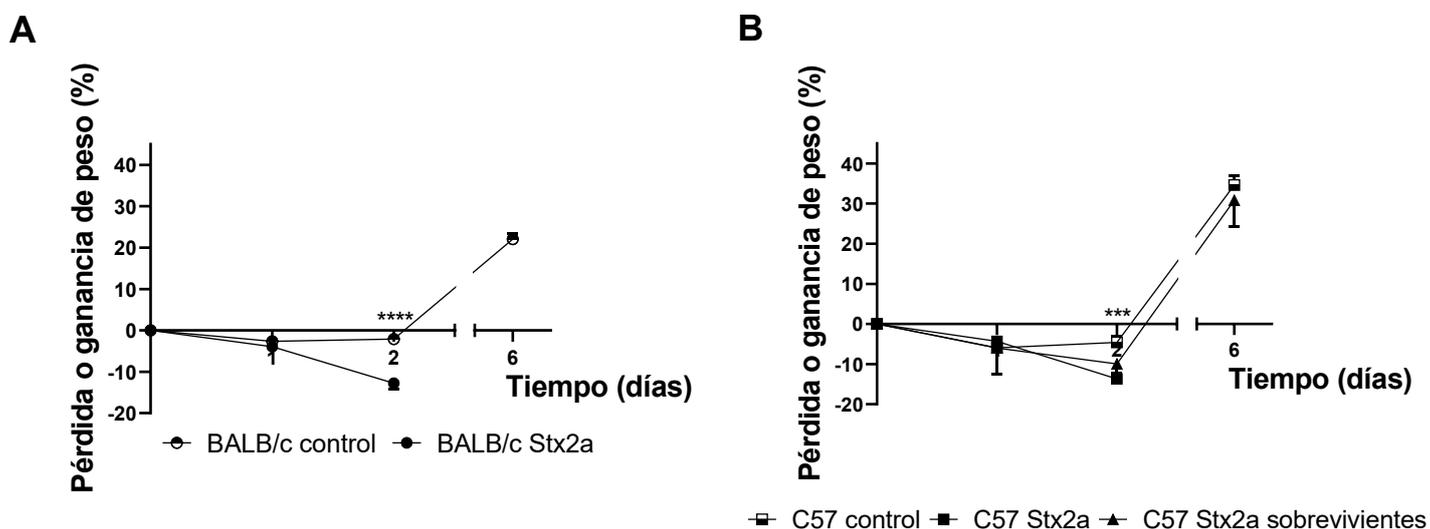
En los modelos murinos de SUH generados por injuria estéril, es decir, por la administración e.v. de Stx2, está bien descrito la correlación de los efectos de la Stx2 con aumento de uremia (una concentración plasmática de urea mayor a 180 mg% es considerada como daño renal irreversible) y la neutrofilia (superior al 20%). Por ello, para verificar que la mortalidad observada fue debida a la intoxicación con Stx2a, los ratones fueron sangrados a los 3 días post inoculación para determinar en sangre entera el porcentaje de polimorfonucleares y en plasma, la concentración de urea.



**Figura 6. Parámetros clínicos y bioquímicos indicadores de daño sistémico a causa de la intoxicación con Stx2a.** Los ratones desafiados con Stx2a fueron sangrados al tercer día post inoculación para determinar (A) la concentración plasmática de urea y (B) el porcentaje de PMN. Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Las barras de error muestran la media ± SEM de 5 ratones para el grupo control y 8 ratones para el grupo Stx2a para cada cepa.

Como puede observarse en la figura 6A, tanto los ratones BALB como los C57 muestran un incremento significativo en la concentración plasmática de urea (mayor a 150 mg%), en comparación a sus respectivos controles. Dicho incremento no es significativo si se compara la concentración de urea entre ratones de ambas cepas desafiados. Con relación al porcentaje de PMN, se puede visualizar que todos los ratones desafiados con Stx2a muestran neutrofilia en comparación con sus respectivos controles, siendo más marcada esta neutrofilia en los ratones BALB que en los ratones C57.

Por otro lado, como un parámetro clínico indicador del estado de morbilidad, se determinó el peso diario de los ratones desde la inoculación hasta su muerte.



**Figura 7. Indicador de morbilidad a causa de la inoculación de Stx2a.** Los ratones desafiados con 1 ng de Stx2a fueron pesados diariamente post desafío. El peso fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial de cada ratón en todos los tiempos. **(A) Ganancia o pérdida porcentual de peso respecto al peso inicial de (A) ratones BALB y (B) ratones C57.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \*\*\* $p < 0.001$  en comparación con ratones C57 no sobrevivientes inyectados con Stx2a, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Las barras de error muestran la media  $\pm$  SEM de 5 ratones para el grupo control y 8 ratones para el grupo Stx2a para cada cepa.

Como se puede ver en las figuras 7A y 7B, los ratones desafiados fueron perdiendo de peso progresivamente hasta su muerte, siendo este descenso de peso significativo en ambas cepas al día 2 post inoculación respecto de sus

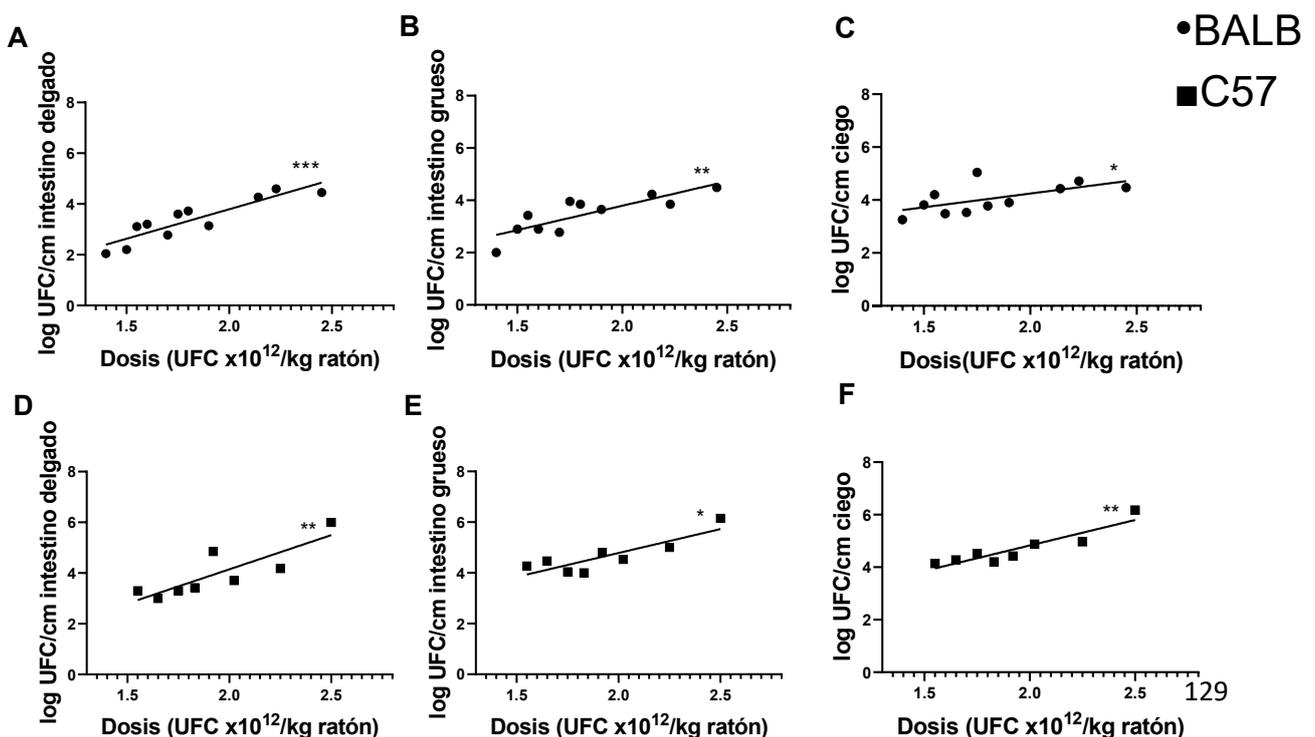
controles. La pérdida de peso entre cepas fue similar (cercana al 20%), a excepción de dos ratones C57 que sobrevivieron y alcanzaron su peso corporal inicial al cabo de unos días post desafío.

En correspondencia con reportes anteriores [Fernández y col., 2006; Pineda y col., 2021], todos los ratones moribundos mostraron descenso significativo de peso, aumento de urea plasmática y neutrofilia al día 3 post inoculación de Stx2a, pudiéndose confirmar que la mortalidad de los ratones desafiados está directamente asociada a los daños sistémicos ocasionados por la administración e.v. de Stx. El hecho de que ambas cepas murinas presentaran una respuesta patológica similar a la administración e.v. de Stx2a, permite descartar que las diferencias en la susceptibilidad a la infección con STEC O157:H7 entre cepas se deba a diferencias en la sensibilidad a la Stx2a.

### 3. CARGA BACTERIANA EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.

#### 3.1. Colonización intestinal.

Para analizar si la mayor mortalidad en la cepa C57 estaba o no asociada a una mayor carga bacteriana intestinal, el primer paso en la cascada patogénica que conduce a la enfermedad sistémica, evaluamos el nivel de colonización en diferentes segmentos intestinales (intestino delgado, intestino grueso y ciego) a distintas dosis infectivas administradas a ambas cepas murinas.

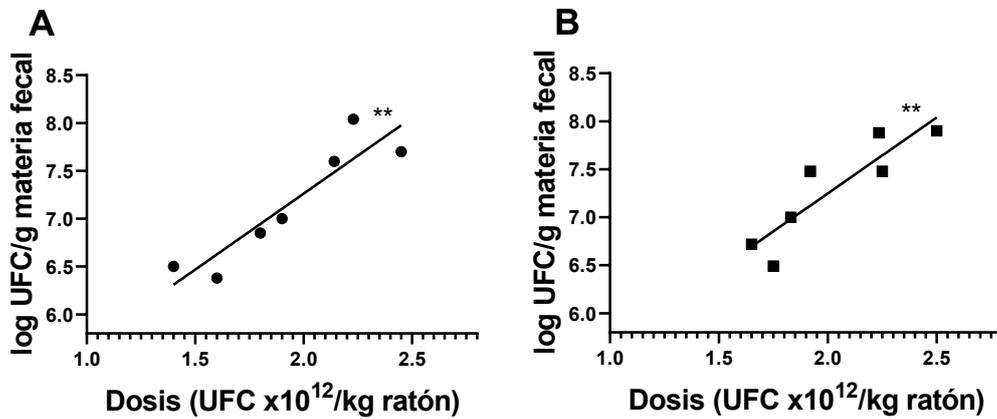


**Figura 8. Colonización intestinal de ratones BALB y C57 infectados con STEC O157:H7.** Once ratones BALB y 8 ratones C57 fueron eutanasiados al día 3 p.i. para determinar la colonización en ciego, el intestino delgado y el intestino grueso. Los gráficos representan las UFC de STEC O157:H7 por cm de tejido intestinal versus la dosis bacteriana administrada como UFC x 10<sup>12</sup>/kg. **(A a C) colonización del intestino delgado (A), intestino grueso (B) y ciego (C) de ratones BALB infectados. (D a F) colonización del intestino delgado (D), intestino grueso (E) y ciego (F) de ratones C57 infectados.** Los datos fueron analizados mediante la prueba de correlación de Spearman, como se detalla en Materiales y métodos. Todas las asociaciones UFC/cm de segmento intestinal versus UFC x 10<sup>12</sup>/kg muestran correlaciones positivas. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Las UFC recuperadas en los 3 segmentos intestinales de ratones BALB al día 3 p.i. mostraron una correlación positiva con la dosis infectiva administrada en los tres segmentos intestinales (Figura 8A, B y C: r=0.65, p<0.05; r=0.90, p<0.001; r=0.84, p<0.01). Es decir, a mayor dosis infectiva mayor colonización intestinal. También se observaron correlaciones positivas en los tres segmentos intestinales en los ratones C57 infectados al día 3 p.i. (Figura 8D, E y F: r=0.88, p<0.01; r=0.89, p<0.01; r=0.76, p<0.05). Además, la pendiente de las rectas obtenidas por regresión lineal para cada segmento intestinal de cada cepa no fue estadísticamente diferente de la recta obtenida para el mismo segmento de la otra cepa, mostrando un nivel similar de colonización entre cepas para la misma dosis infectiva de STEC O157:H7. Por otro lado, no hubo sitio preferencial de colonización dentro de la misma cepa. Por ende, no se observaron diferencias significativas en la colonización intestinal entre ratones BALB y C57 (Figuras 8A-F).

### **3.2. Excreción bacteriana.**

Para confirmar si existe una correlación positiva entre la dosis infectiva recibida y la excreción de STEC O157:H7 en heces, al día 3 p.i. ratones de ambas cepas que fueron infectados con distintas dosis de STEC O157:H7, fueron eutanasiados para recolectar toda la materia fecal contenida en el intestino grueso y determinar la excreción como UFC por gramo de materia fecal.



**Figura 9. Excreción bacteriana de ratones BALB y C57 infectados con STEC O157:H7.** Siete ratones de ambas cepas fueron eutanasiados al día 3 p.i., se obtuvo la materia fecal del intestino grueso y se determinó la excreción bacteriana según lo detallado en Materiales y métodos. Los gráficos muestran las UFC de STEC O157:H7 por gramo de materia fecal versus la dosis infectiva administrada como UFC x10<sup>12</sup>/kg. **Excreción bacteriana de (A) ratones BALB y (B) ratones C57 infectados.** Los datos fueron analizados mediante la prueba de correlación de Spearman. Todas las asociaciones UFC/g de materia fecal versus UFC x 10<sup>12</sup>/kg muestran correlaciones positivas. \*\*p<0.01.

Al analizar el nivel de excreción, hallamos una correlación positiva entre las variables mencionadas anteriormente en ambas cepas murinas (BALB: r=0.93, p<0.01; C57: r=0.90, p<0.01). Además, la pendiente de las rectas obtenidas por regresión lineal no fue significativamente diferentes entre los ratones BALB y C57 infectados, lo que sugiere que excretan niveles similares de bacterias STEC O157:H7 al ser infectados con la misma dosis bacteriana (Figura 9A y B).

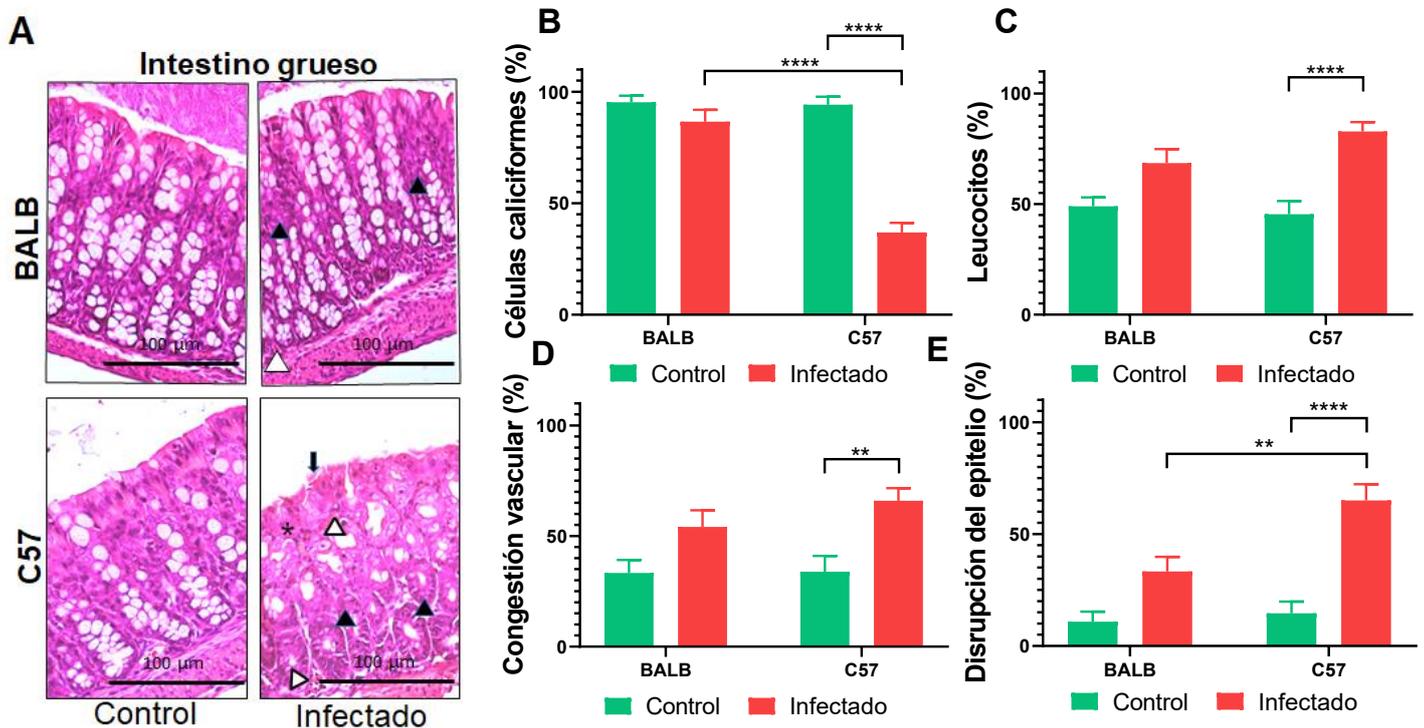
Estos datos indican que los ratones BALB son capaces de permanecer con un mejor estado de salud durante la infección a pesar de tener un nivel de colonización intestinal y excreción similar al de los ratones C57.

#### **4. CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN EL INTESTINO Y RIÑÓN DE RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.**

Para visualizar si frente a un mismo nivel de colonización bacteriana, el daño histológico en el intestino y riñón entre estas cepas murinas era similar al día 3 p.i., se eutanasiaron ratones controles e infectados de ambas cepas y se les extirparon sus intestinos y un riñón. Muestras de estos tejidos fueron fijados en formaldehído al 4%, incluidos en parafina y teñidos con H&E. Para su análisis, se tomaron imágenes usando microscopía de campo claro.

#### 4.1. Análisis histológico del intestino grueso.

Los intestinos gruesos de ratones BALB y C57 se analizaron histológicamente en condiciones no infecciosas (controles) y después de 3 días p.i. con STEC O157:H7. Como puede verse en la figura 10, el intestino grueso de ratones BALB infectados mostró ligera inflamación evidenciada por congestión vascular y depleción de células caliciformes. En contraste, los ratones C57 infectados mostraron una depleción significativa de células caliciformes, aumento de la infiltración leucocitaria en la mucosa intestinal y congestión vascular. Además, los ratones C57 infectados mostraron áreas de ruptura del epitelio superficial y la presencia de células fantasma (espacios dentro de la mucosa que se ven como círculos blancos, donde antes hubo células caliciformes). Los intestinos gruesos de los ratones controles no mostraron alteraciones patológicas.

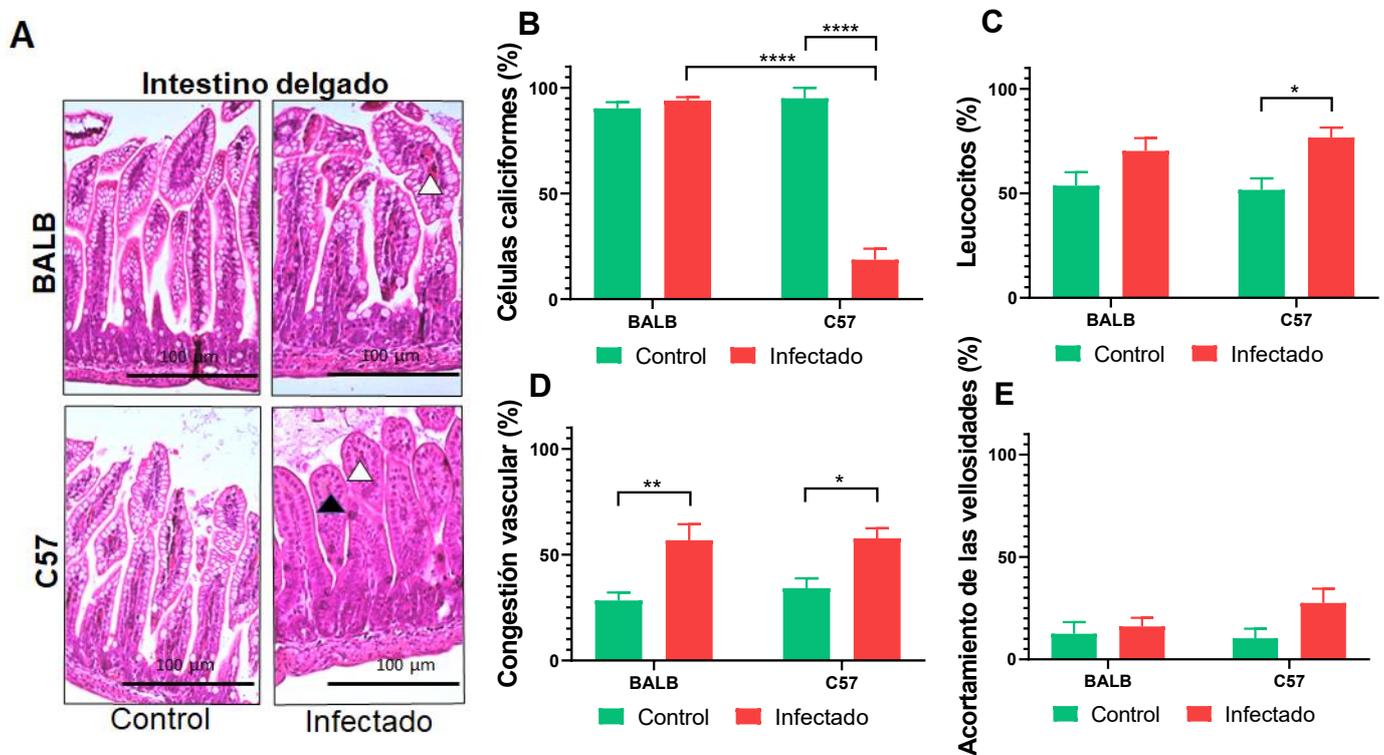


**Figura 10. Histología del intestino grueso de ratones controles e infectados con STEC O157:H7 3 días p.i. (A) Se muestran secciones representativas teñidas con H&E del intestino grueso de ratones BALB (fila superior) y C57 (fila inferior) controles e infectados. Fotos correspondientes al intestino grueso muestran congestión vascular (puntas de flecha blanca), infiltrado leucocitario**

(asterisco), focos de depleción de células caliciformes (puntas de flecha negra) o disrupción del epitelio superficial (flecha negra). Los tejidos intestinales de ratones controles, tanto BALB como C57, muestran una histología conservada. Las fotografías se tomaron con aumento 200x haciendo uso de microscopía de campo claro. **(B-E) Semicuantificación del daño del intestino grueso.** Usando una cuadrícula superpuesta a la imagen, se realizó una semi cuantificación. Los gráficos representan el porcentaje de los campos con al menos **(B) una célula caliciforme, (C) presencia de infiltrado leucocitario, (D) con congestión vascular y (E) disrupción del epitelio.** Se evaluó el daño histológico en 3 ratones controles e infectados de cada cepa, los cuales presentaron alteraciones histológicas similares. Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey.  $**p<0.01$ ,  $****p<0.0001$ . Cada barra representa la media  $\pm$  SEM.

#### **4.2. Análisis histológico del intestino delgado.**

Como puede verse en la figura 11, el intestino delgado de ratones BALB infectados mostró una significativa inflamación evidenciada por una mayor irrigación o congestión vascular. En cambio, los ratones C57 infectados mostraron una total depleción de células caliciformes y congestión vascular. Cabe destacar que algo característico de las infecciones por STEC O157:H7 en humanos es el acortamiento del tercio superior de las microvellosidades del intestino delgado, cambio histológico que no fue observado en la histología de ninguno de los ratones infectados. Además, uno de los cambios histológicos observados en los ratones C57 infectados fue el incremento de células de Paneth (que se visualizan como células basófilas de mayor tamaño que el núcleo de los enterocitos, situadas en las criptas de Lieberkühn en la pared del intestino delgado). Los intestinos delgados de los ratones controles no mostraron cambios patológicos.



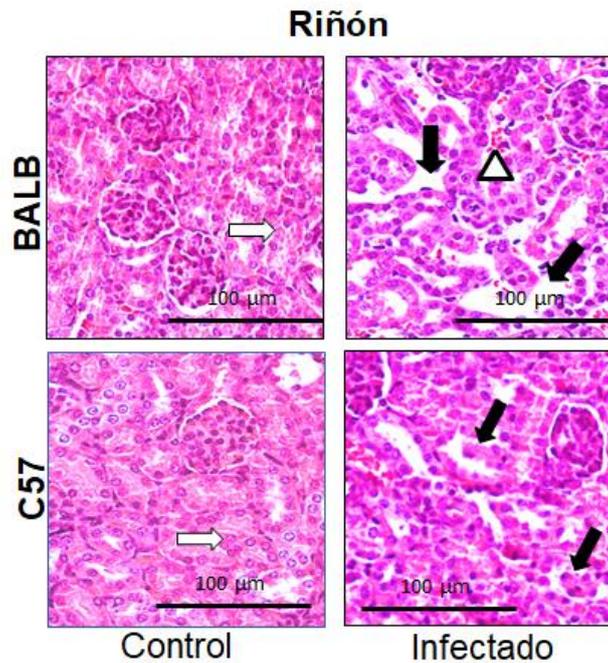
**Figura 11. Histología del intestino delgado de ratones controles e infectados con STEC O157:H7 3 días p.i. (A) Secciones representativas teñidas con H&E del intestino delgado de ratones BALB (fila superior) y C57 (fila inferior) controles e infectados.** Las fotos del intestino delgado muestran mayoritariamente congestión vascular (puntas de flecha blanca) y focos de depleción de células caliciformes (puntas de flecha negra). Los tejidos intestinales de ratones controles muestran una histología conservada. Las fotografías se tomaron con aumento 200x haciendo uso de microscopía de campo claro. **(B-E) Semicuantificación del daño del intestino delgado.** Usando una cuadrícula superpuesta a la imagen, se realizó una semi cuantificación. Los gráficos representan el porcentaje de los campos con al menos **(B) una célula caliciforme, (C) presencia de infiltrado leucocitario, (D) con congestión vascular y (E) acortamiento del tercio superior de las microvellosidades.** Se evaluó el daño histológico en 3 ratones controles e infectados de cada cepa, los cuales presentaron alteraciones histológicas similares. Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra representa la media  $\pm$  SEM.

En conjunto estos resultados indican que los ratones BALB infectados tienen menor daño en el tejido intestinal y menor inflamación en comparación con los ratones C57 infectados, a pesar de tener un nivel similar de colonización intestinal con STEC O157:H7.

### 4.3. Análisis histológico del riñón.

Como se observa en la figura 12, la histología renal al día 3 p.i. confirma que los riñones de los ratones C57 infectados se vieron severamente afectados

por los efectos de la Stx2, mientras que los riñones de los ratones BALB infectados se ven relativamente conservados. De hecho, los riñones de los ratones C57 infectados mostraron un marcado daño tubular con células apoptóticas, lesión típica asociada a la toxicidad de la Stx2, mientras que los ratones BALB infectados mostraron sólo daños leves en sus riñones, principalmente congestión vascular y dilatación de la luz tubular. Los riñones de ratones controles muestran una histología conservada.

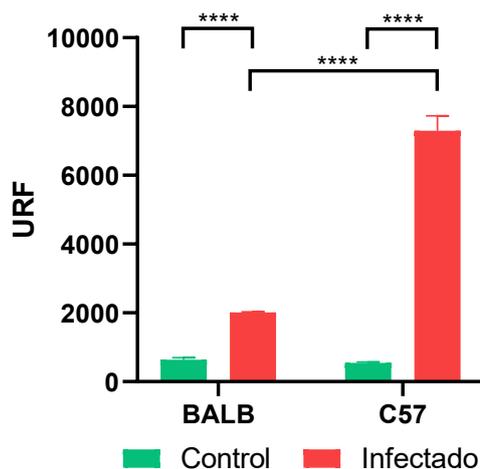


**Figura 12. Histología renal de ratones controles e infectados con STEC O157:H7 3 días p.i.** Se evaluó el daño histológico en 3 ratones controles e infectados de cada cepa, los cuales presentaron alteraciones histológicas similares. Se muestran imágenes representativas de un ratón BALB y C57, tanto control como infectado. Las fotografías se tomaron con aumento 200x haciendo uso de microscopía de campo claro. Los riñones de los ratones BALB infectados presentan congestión vascular en la corteza (punta de flecha blanca) y dilatación tubular (flechas negras) en comparación con el control. Los riñones de los ratones C57 infectados muestran áreas de necrosis tubular, con pérdida del epitelio y células descamadas en la luz tubular (flechas negras). Las flechas blancas muestran túbulos normales de ratones controles BALB y C57.

## **5. CAMBIOS FUNCIONALES EN LA BARRERA INTESTINAL DE RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.**

Para evaluar la permeabilidad intestinal, se llevó a cabo un ensayo administrando Dx-FITC por vía oral, y 4 horas post tratamiento se determinó en

plasma la fluorescencia como una medición del pasaje de esta molécula. Encontramos que los ratones BALB y C57 infectados mostraban un mayor nivel de Dx-FITC en plasma en comparación a sus respectivos controles al día 3 p.i. Sin embargo, los ratones C57 infectados mostraron URF significativamente mayores que los ratones BALB infectados (Figura 13). Estos datos indican que los ratones BALB infectados tuvieron un daño en la función de la barrera intestinal más reducido que los ratones C57 infectados.

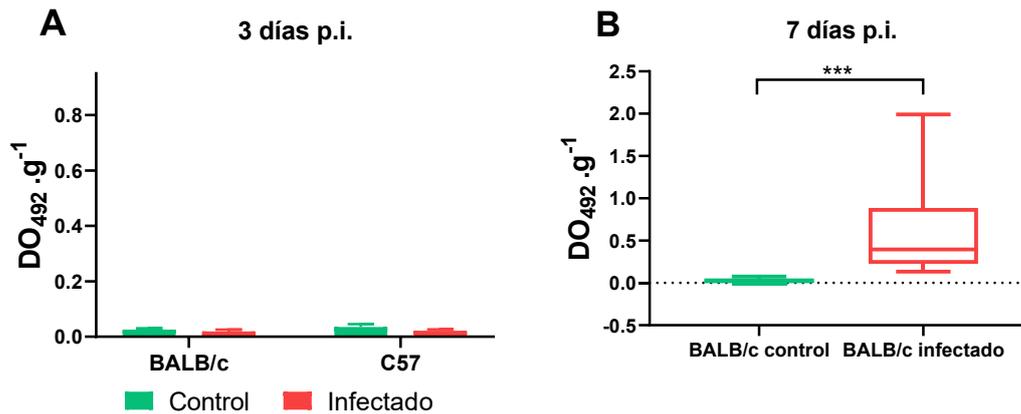


**Figura 13. Permeabilidad intestinal de ratones controles e infectados con STEC O157:H7 a 3 días p.i.** Los ratones BALB y C57 recibieron por vía oral 100  $\mu$ L de PBS que contenía Dx-FITC (80 g/L) al día 3 p.i. Después de 4 horas de tratamiento, se sangraron para determinar en plasma las URF. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos factores seguido del post test de Tukey para determinar comparaciones múltiples. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 ratones controles e infectados de cada cepa.

## **6. RESPUESTA HUMORAL ESPECÍFICA EN MUCOSA INTESTINAL EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.**

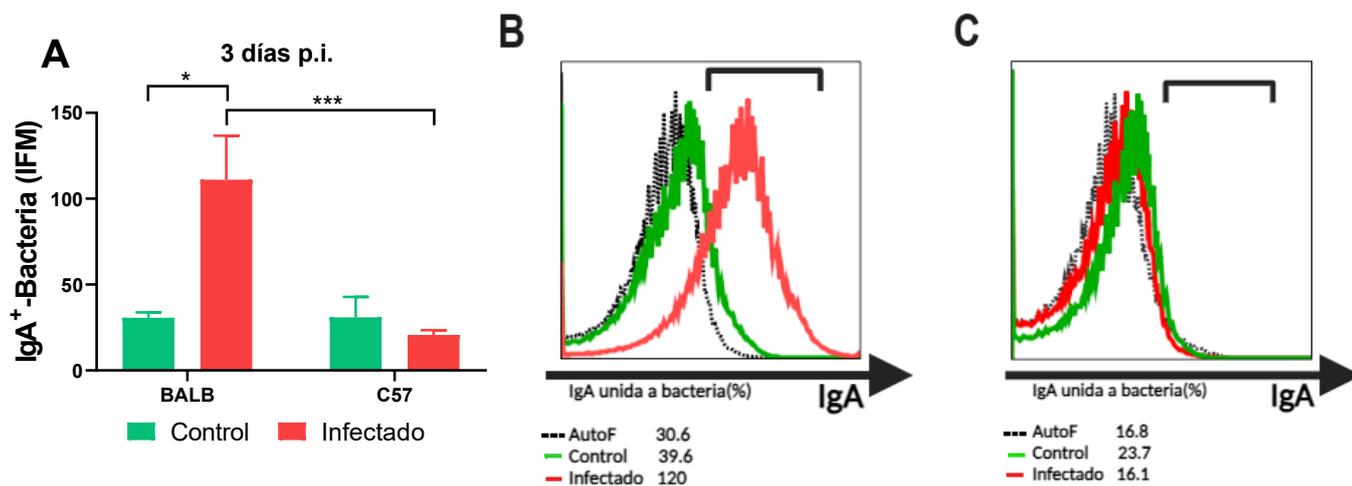
A raíz de los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos evaluar la respuesta de anticuerpos específicos anti-STECH O157:H7 producidos localmente en el intestino durante el curso de la infección. Para ello, se evaluó en los sobrenadantes de materia fecal de ambas cepas luego de 3 y 7 días p.i. la presencia de anticuerpos anti-STECH O157:H7 mediante ELISA. No se detectó IgA anti-STECH O157:H7 libre en los sobrenadantes de materia fecal de ratones infectados de ambas cepas tan pronto como a 3 días p.i. (Figura 14A). Sin embargo, al día 7 p.i. encontramos niveles significativos de IgA anti-STECH O157:H7 en los sobrenadantes de materia fecal de todos los ratones BALB infectados que

sobrevivieron al desafío infeccioso (Figura 14B). Cabe destacar que ningún ratón C57 sobrevivió al desafío, por ende, no fue posible evaluar IgA específica al día 7 p.i. Por otro lado, no es menor destacar que al día 7 p.i. los ratones BALB no excretan más bacteria patógena en materia fecal. Los sobrenadantes de materia fecal de ratones BALB y C57 controles no reconocieron a STEC O157:H7 por ELISA.



**Figura 14. Respuesta humoral local de ratones controles e infectados con STEC O157:H7.** Los sobrenadantes de la materia fecal de ratones controles e infectados, obtenidos y preparados como se describe en Materiales y métodos, fueron diluidos al medio y analizados mediante ELISA para determinar IgA anti-STECH O157:H7. Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO<sub>492</sub>. **(A) IgA anti-STECH O157:H7 libre en sobrenadante de materia fecal a día 3 p.i.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. Cada barra muestra la media ± SEM de 4 ratones controles y 6 infectados para cada cepa. **(B) IgA anti-O157:H7 libre en sobrenadante de materia fecal al día 7 p.i.** Prueba de Mann-Whitney. \*\*\* p<0.001. Se muestran las medianas y los rangos intercuartiles de 6 ratones controles y 9 ratones BALB infectados.

Dado que al día 3 p.i. aún los ratones de ambas cepas están excretando bacteria patógena, hipotetizamos que la IgA específica anti-STECH O157:H7 no se encuentra libre en los sobrenadantes de materia fecal, porque podría estar opsonizando a las bacterias patógenas. Para evaluar esta hipótesis, llevamos a cabo una citometría de flujo sobre la materia fecal de ratones de ambas cepas controles e infectados al día 3 p.i., tal como se detalla en Materiales y métodos.



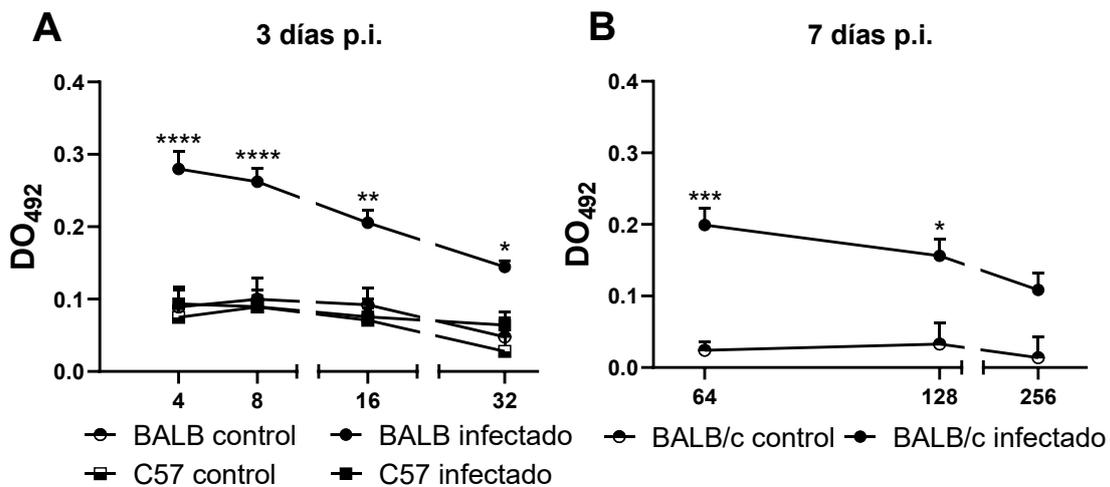
**Figura 15. Respuesta humoral local de ratones controles e infectados con STEC O157:H7.** La materia fecal fue obtenida y procesada como se describe en Materiales y métodos para determinar mediante citometría de flujo IgA unida a bacterias. Se graficó la IFM obtenida a partir de histogramas utilizando un anticuerpo anti-IgA de ratón hecho en rata acoplado a FITC. **(A) Bacterias recubiertas de IgA al día 3 p.i.** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles y 6 infectados para cada cepa. **(B y C) Histogramas representativos** de muestras de materia fecal no incubadas con anti-IgA de ratón (autofluorescencia, línea punteada negra), muestras de materia fecal de ratones controles (línea verde) y de ratones infectados (línea roja) **BALB (B) y C57 (C)** incubadas con anti-IgA de ratón, ensayadas en paralelo.

Encontramos IgA unida a bacterias solamente en la materia fecal de ratones BALB infectados (Figuras 15A-C). Estos resultados sugieren que la infección con STEC O157:H7 estimuló la producción de IgA local, la cual se excretó unida a bacterias en materia fecal de ratones BALB, pero no de ratones C57. Estos resultados sugieren que la mayor sobrevivencia observada durante la infección con STEC O157:H7 estaría asociada a que sólo los ratones BALB fueron capaces de montar una respuesta humoral local específica y temprana.

## **7. RESPUESTA HUMORAL SISTÉMICA EN RATONES BALB Y C57 INFECTADOS CON STEC O157:H7.**

Además de la respuesta humoral local, analizamos si estas dos cepas murinas eran capaces de montar una respuesta humoral sistémica anti-Stx2 después de la infección, ya que se ha demostrado que estos anticuerpos protegen contra el daño renal inducido por la toxina [Mejías y col., 2013; Mejías y col., 2016]. Los ratones fueron sangrados a los días 3 y 7 p.i. y los niveles de IgG anti-

Stx2B se determinaron mediante ELISA en diluciones seriadas del plasma. Como se ve en la figura 16A, los ratones BALB infectados presentaron niveles significativos de IgG anti-Stx2B tan pronto como a los 3 días p.i. en todas las diluciones del plasma realizadas en comparación a los ratones C57 infectados, dado que los valores de absorbancia de las diluciones de los plasmas de estos últimos fueron similares a los obtenidos en los ratones BALB y C57 controles, no hallándose niveles significativos de anticuerpos anti-Stx2B. Como es esperable, los plasmas de ratones BALB infectados mostraron niveles de anticuerpos anti-Stx2B más altos después de 7 días de infección, siendo los valores de DO significativos hasta una dilución 1/128 del plasma en comparación con su respectivo control (Figura 16B). De estos resultados, pudimos determinar que los ratones BALB infectados fueron también capaces de desarrollar una respuesta humoral sistémica anti-Stx2, que podría neutralizar a la toxina que ingresa por circulación durante la infección con STEC O157:H7.



**Figura 16. Respuesta humoral sistémica de ratones controles e infectados con STEC O157:H7.**

Los niveles de IgG anti-Stx2B se determinaron en el plasma de ratones BALB y C57 al día 3 p.i., y en el plasma de ratones BALB sobrevivientes al día 7 p.i. por ELISA. Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO492. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. **(A) IgG específica anti-Stx2B en plasma al día 3 p.i.** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  en comparación con los ratones BALB controles y los ratones C57 infectados a la misma dilución. Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 3 ratones controles y 8 infectados para cada cepa. **(B) IgG específica anti-Stx2B en plasma de ratones BALB al día 7 p.i.** \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 3 ratones para el grupo control y 8 ratones para el grupo infectado.

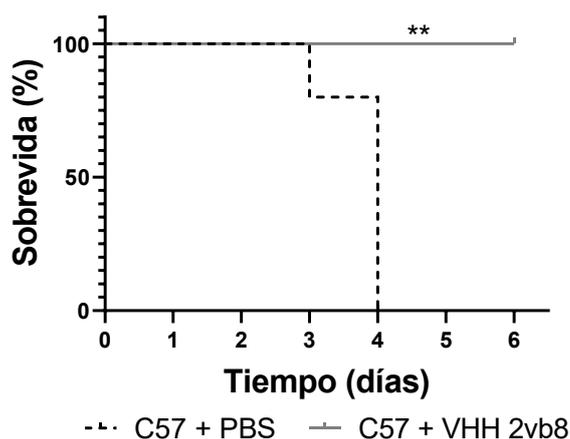
## **8. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE A LAS INFECCIONES CON STEC O157:H7.**

### **8.1. Administración de anticuerpo neutralizante anti-Stx2 a ratones C57 infectados.**

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la distinta evolución observada entre los ratones BALB y C57 después de la infección con STEC O157:H7 probablemente dependa de la cinética en montar una respuesta humoral eficaz y con capacidad protectora. Para abordar experimentalmente este punto, se infectaron ratones C57 a la edad del destete con una dosis letal de STEC O157:H7 e inmediatamente después de la infección a los ratones se les administró por vía e.v. PBS o anticuerpos anti-Stx2B producidos previamente en el laboratorio (VHH 2vb8).

#### *8.1.1. Evaluación de la mortalidad.*

En la figura 17, se puede observar que la totalidad de los ratones C57 tratados con PBS e infectados se encontraron muertos al día 4 p.i. (0% sobrevivida), mientras que los ratones tratados con VHH 2vb8 e infectados permanecieron vivos hasta el día 6 p.i., momento en el cual fueron eutanasiados (100% sobrevivida), siendo esta diferencia significativa.

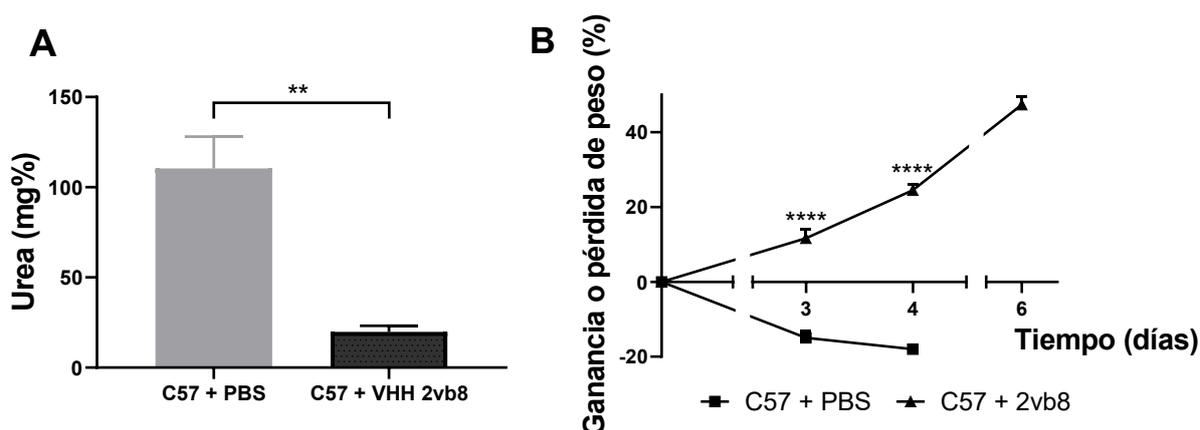


**Figura 17. Desafío con STEC O157:H7 en ratones C57 administrados o no de un anticuerpo neutralizante anti-Stx2.** A la edad del destete e inmediatamente p.i., a los ratones C57 se les administró de manera aleatoria e.v. PBS o un nanoanticuerpo neutralizante anti-Stx2 (VHH 2vb8) (n=4/tratamiento). Los ratones fueron observados diariamente para constatar su estado de morbi-

mortalidad. Los datos fueron analizados con la prueba de Mantel-Cox hallándose diferencias significativas.  $**p < 0.01$ .

### 8.1.2. Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.

Paralelamente, se determinó la concentración plasmática de urea como indicador de falla renal al día 3 p.i. y se registró diariamente el peso como un parámetro clínico indicador de morbi-mortalidad.



**Figura 18. Parámetros clínicos y bioquímicos indicadores de daño sistémico y morbi-mortalidad.** Los ratones C57 infectados y tratados con PBS o VHH 2vb8 fueron pesados diariamente y sangrados al tercer día p.i. para determinar **(A) la concentración plasmática de urea**. Los datos fueron analizados con la prueba T de Student.  $**p < 0.01$ . **(B) Ganancia o pérdida porcentual de peso respecto al pesaje inicial**. El peso fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial en todos los tiempos. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey.  $****p < 0.0001$ . Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones C57 para cada tratamiento.

Como puede observarse en la figura 18A, únicamente los ratones C57 infectados y tratados con PBS muestran niveles elevados urea plasmática, siendo dicho nivel estadísticamente significativo al alcanzado por los ratones C57 infectados y tratados con VHH 2vb8, los cuales presentan niveles normales de urea plasmática, semejantes a un control sin infectar. Con relación al peso (Figura 18B), se puede ver que todos los ratones C57 desafiados con STEC O157:H7 y administrados de PBS muestran un descenso progresivo del peso hasta su muerte al día 4 p.i., siendo este descenso significativo respecto al grupo de ratones C57 infectados y tratados con VHH 2vb8 al día 3 y 4 p.i. Cabe destacar que los ratones

tratados con VHH 2vb8 muestran un aumento de peso progresivo hasta el momento en el cual fueron eutanasiados.

Estos resultados nos permitieron asociar la mejor evolución de los ratones BALB infectados con una respuesta específica contra la Stx2. Por lo tanto, realizamos dos experimentos adicionales y complementarios para evaluar directamente si la respuesta de anticuerpos anti-Stx2 en ratones BALB era la responsable de conferir protección contra la infección con STEC O157:H7.

### **8.2. Desafío de ratones BALB sobrevivientes a la infección con Stx2 e.v.**

En un grupo de experimentos, se evaluó la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-Stx2 generados a los 7 días p.i. en ratones BALB (con un título de anticuerpos anti-Stx2 de 128). Los ratones fueron inoculados e.v. con 1 ng de Stx2a, y las tasas de mortalidad fueron evaluadas diariamente y los niveles de urea plasmática determinados al día 3 post desafío. Como grupo control se utilizaron compañeros de camada que no habían sido previamente infectados. Los resultados se muestran en la Tabla 2, y se discuten en el inciso 8.3.

### **8.3. Transferencia de inmunidad por plasma de ratones BALB infectados a ratones C57.**

En otro grupo de experimentos, los plasmas de los ratones BALB obtenidos al día 7 p.i. fueron administrados de manera i.p. a ratones C57 luego de ser infectados a la edad del destete. Los plasmas fueron administrados en 2 dosis (a 2 y 24 horas p.i.) y en una dilución 1/5 en solución fisiológica. Otro grupo de ratones C57 infectados recibió en lugar de plasma inmune, plasma de ratones BALB controles obtenidos al mismo tiempo (día 7). Las tasas de mortalidad fueron evaluadas diariamente y los niveles de urea plasmática determinados al día 3 p.i.

Grupos	Tratamiento	Mortalidad (muertos/total)	Urea (media $\pm$ SEM; mg%)
BALB control	Stx2a e.v.	5/5	326 $\pm$ 71
BALB infectado	Stx2a e.v.	0/3 <sup>a</sup>	92 $\pm$ 26 <sup>b</sup>
C57 infectado	plasma BALB control	3/3	175 $\pm$ 21
C57 infectado	plasma BALB infectado	0/3 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 11 <sup>b</sup>

**Tabla 2. Neutralización *in vivo* de la toxina y protección de ratones C57 infectados administrados de plasma de ratones controles e infectados BALB.** Ratones BALB controles e infectados recibieron 1 ng de Stx2a mediante administración e.v. al día 7 p.i. Por otro lado, ratones C57 infectados fueron administrados i.p. con plasmas de ratones BALB controles o infectados obtenidos al día 7 p.i., como se detalla en Materiales y métodos. Se representa en la tabla las tasas de mortalidad (muertos/total) y los niveles de urea plasmática (mg%) al día 3 post inyección de Stx2a (para experimentos de neutralización *in vivo* en ratones BALB) o al día 3 p.i. (para los experimentos de protección en ratones C57).

a significativamente diferente a su respectivo control, según la prueba de Mantel-Cox ( $p < 0.05$ ).

b significativamente diferente a su respectivo control, según la prueba T de Student ( $p < 0.05$ ).

Como se puede ver en la Tabla 2, los ratones BALB infectados quedaron completamente protegidos frente a una dosis letal 100 de Stx2a, permaneciendo vivos y mostrando niveles de urea significativamente más bajos que los compañeros de camada no infectados, los cuales murieron al día 3 post desafío (100% mortalidad). A su vez, los plasmas de ratones BALB infectados fueron capaces de conferir protección a los ratones C57 después de ser infectados con STEC O157:H7, observándose al día 3 p.i. niveles significativamente más bajos de urea plasmática y tasas de mortalidad más bajas en comparación a su respectivo control (100% mortalidad). Cabe destacar que los ratones C57 infectados que recibieron plasma de ratones BALB infectados obtenidos al día 7 p.i. murieron el día 5 p.i. observándose respecto de su grupo control (ratones C57 infectados + plasma control de ratones BALB sin infectar) un retraso significativo en la mortalidad.

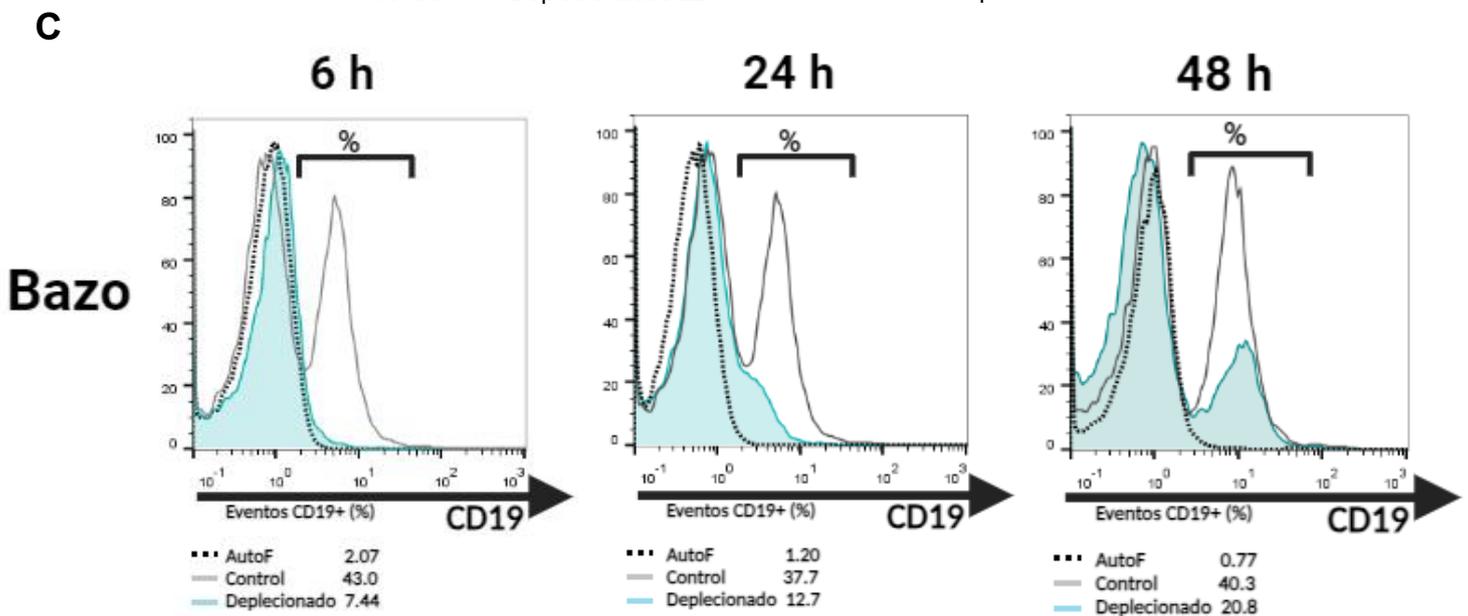
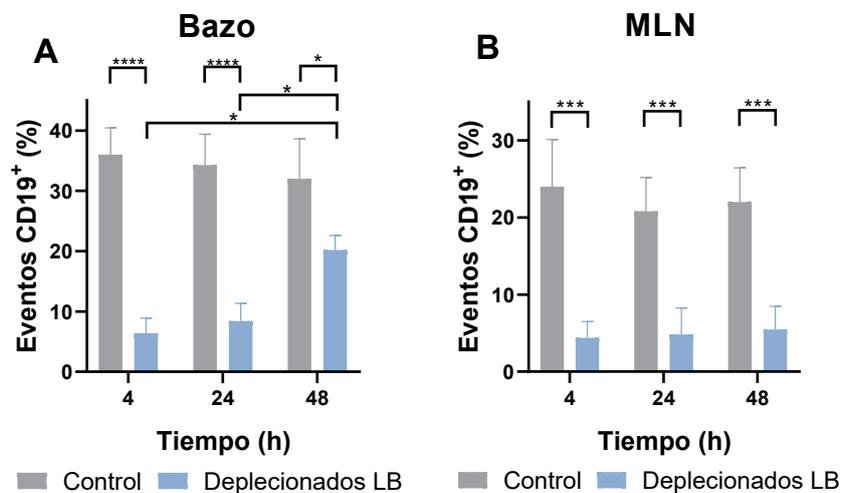
## **9. ROL DE LOS LINFOCITOS B EN LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LAS INFECCIONES CON STEC O157:H7.**

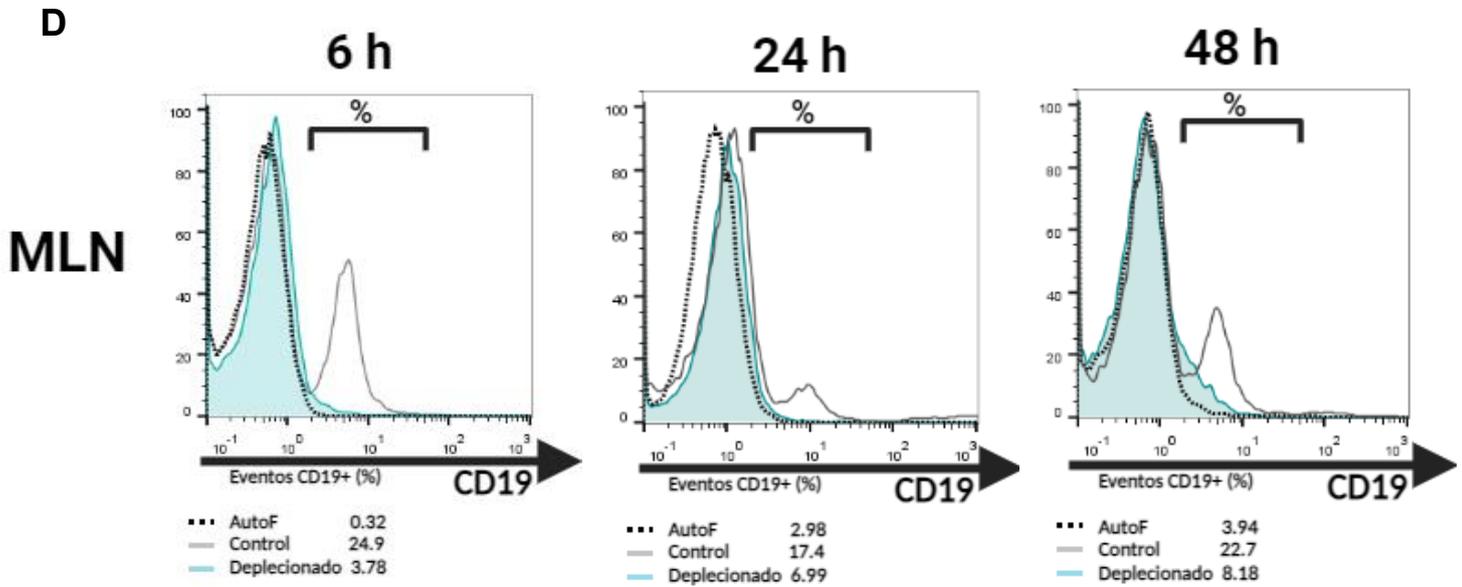
Con el objetivo de determinar la relevancia de la respuesta humoral montada activamente frente al estímulo infeccioso, los ratones BALB fueron depletados de

linfocitos B mediante la administración e.v. de un anticuerpo monoclonal anti-B220 y posteriormente infectados para evaluar sobrevida y parámetros bioquímicos y clínicos claves en la progresión a SUH. Paralelamente, se determinó la presencia de anticuerpos anti-Stx2 en plasma y anti-STEC O157:H7 en materia fecal y plasma.

### 9.1. Evaluación del esquema de depleción de linfocitos B.

Para poner a punto el esquema de depleción de linfocitos B y garantizar una depleción total en los tiempos más críticos de la infección (0-72h), ratones BALB a la edad del destete fueron divididos al azar en 2 grupos. A uno de ellos se le administró de manera e.v. 100  $\mu$ L conteniendo una única dosis de anticuerpo monoclonal anti-B220 (2.8 mg/ratón) mientras que al grupo control, una única dosis de vehículo (PBS). Cuatro, 24 y 48 horas post administración, los ratones fueron eutanasiados y el porcentaje de células CD19 positivas fue determinado mediante citometría de flujo en bazo y en el MLN.





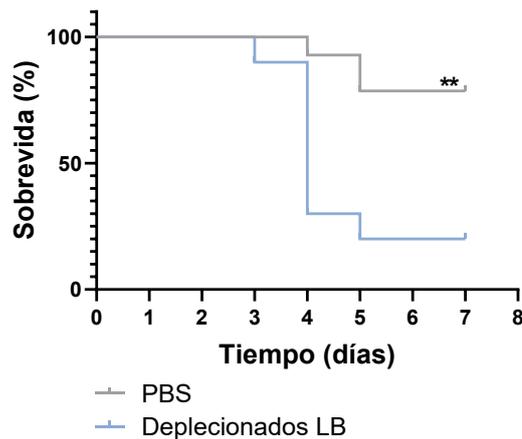
**Figura 19. Depleción de linfocitos B en bazo y MLN.** Ratones BALB al destete fueron tratados con PBS o anticuerpo monoclonal anti-B220 (2.8 mg/ratón e.v.) y al cabo de 4, 24 y 48 h eutanasiados para determinar el porcentaje de linfocitos B (CD19+) en los órganos mencionados. **(A) Porcentaje de linfocitos B en bazo. (B) Porcentaje de linfocitos B en MLN.** Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 ratones BALB para cada tratamiento. **Histogramas representativos de la depleción de linfocitos B en bazo (C) y MLN (D) a 6, 24 y 48 h.** La línea negra punteada representa a linfocitos B sin incubarse con el anticuerpo anti-CD19 FITC (autofluorescencia), la línea gris representa a linfocitos B de ratones controles incubados con anti-CD19 y la línea celeste con relleno representa a linfocitos B de ratones deplecionados con anti-B220 e incubados con anti-CD19.

El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-B220 produjo una depleción significativa de linfocitos B (identificados como CD19 positivos) en el MLN a las 4, 24 y 48 h post administración frente a los controles. El porcentaje de células CD19 positivas en bazo a las 4, 24 y 48 h fue significativamente menor en los ratones deplecionados comparado con el de los controles. Sin embargo, a las 48 h el porcentaje de células CD19 positivas en ratones tratados con anti-B220 comenzó a aumentar si se lo compara con los ratones deplecionados a 4 y 24 h. A raíz de esto, y para evitar el desarrollo de una respuesta humoral sistémica, decidimos administrar un refuerzo de anticuerpo anti-B220 cada 24 h para garantizar una total depleción de linfocitos B en bazo.

## 9.2. Evaluación de la mortalidad de los ratones BALB depletados de linfocitos B frente a una infección con STEC O157:H7.

### 9.2.1. Evaluación de la mortalidad.

El esquema de depleción de linfocitos B en la infección se modificó a un refuerzo diario de anticuerpo monoclonal anti-B220 para asegurar la total depleción en este grupo experimental durante los primeros días de infección. Los ratones BALB al destete fueron tratados con una dosis e.v. de anticuerpo anti-B220 o PBS (como control) y desprovistos de alimento. Cuatro horas más tarde fueron infectados de manera oral con una dosis de STEC O157:H7 de  $2 \times 10^{10}$  UFC por ratón. Inmediatamente p.i., fueron provistos de alimento ad libitum. Veinticuatro y 48 h post inoculación, los ratones recibieron un refuerzo del anticuerpo anti-B220 o PBS. Los ratones infectados fueron observados diariamente para evaluar la morbi-mortalidad.



**Figura 20. Desafío de los ratones depletados o no de linfocitos B con STEC O157:H7.**

Catorce ratones BALB controles u 11 tratados con anticuerpo anti-B220 fueron desafiados con  $2 \times 10^{10}$  UFC de STEC O157:H7/ratón al destete. Posterior a la infección, los ratones fueron observados diariamente para evaluar la morbi-mortalidad. **Tasas de supervivencia.** Los datos fueron analizados con la prueba de Mantel-Cox hallándose diferencias significativas.  $**p < 0.01$ .

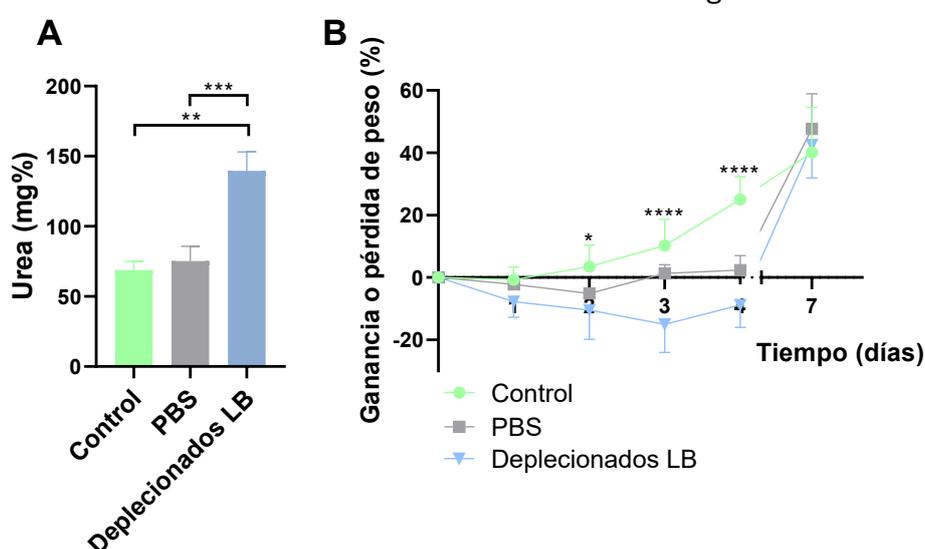
En la figura 20 se representan las curvas de supervivencia, expresadas de manera porcentual, obtenidas luego del tratamiento con anticuerpo anti-B220 o PBS y la infección con STEC. Se puede observar que cuando los ratones son depletados de linfocitos B, el 82% muere al cabo de 3-5 días p.i. (18% supervivencia), mientras que en los ratones controles se observa un 21% de

mortalidad (79% sobrevida), siendo esta diferencia en las curvas de sobrevida significativa.

### 9.2.2. Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.

#### 9.2.2.1. Determinación de urea plasmática y seguimiento del peso diario post infección.

Además de la sobrevida, la concentración de urea plasmática como un indicador de daño renal fue determinada al día 3 p.i. y las curvas de peso como un parámetro clínico indicador de morbi-mortalidad fueron registradas diariamente.



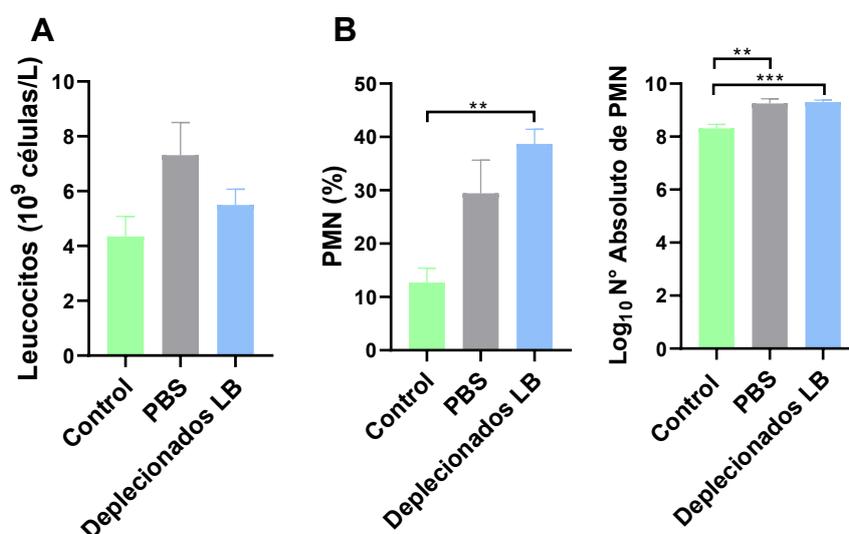
**Figura 21. Parámetros clínicos y bioquímicos indicadores de daño sistémico y morbi-mortalidad.** Los ratones BALB deplecionados o no de linfocitos B e infectados fueron pesados diariamente y sangrados al tercer día p.i. para determinar **(A) la concentración plasmática de urea y (B) la ganancia o pérdida porcentual de peso respecto al peso inicial.** El peso fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial en todos los tiempos. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 5 ratones BALB controles (sin tratar y sin infectar), de 14 ratones tratados con PBS y de 11 ratones deplecionados de linfocitos B. **(A)**  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . **(B)**  $*p < 0.05$  controles respecto de deplecionados de linfocitos B,  $****p < 0.0001$  controles y PBS respecto de deplecionados de linfocitos B,  $****p < 0.0001$  controles respecto de PBS y deplecionados de linfocitos B.

Como puede observarse en la figura 21A, únicamente los ratones BALB deplecionados de linfocitos B e infectados muestran niveles de urea plasmática significativamente elevados respecto de los ratones BALB tratados con PBS e

infectados y ratones BALB controles (sin infectar y sin tratar). Con relación al peso (Figura 21B), se puede ver que los ratones infectados con STEC O157:H7 y tratados con PBS muestran un descenso variable del peso hasta el día 2. En el caso de los tratados con anticuerpo anti-B220 muestran un descenso del peso progresivo hasta el día 4 p.i. Posterior a los tiempos mencionados, los ratones comienzan a recuperar su peso inicial y al día 7 p.i., todos los ratones infectados sobrevivientes tienen una ganancia de peso similar a los ratones controles, posiblemente debido a que ya resolvieron la infección.

#### 9.2.2.2. Determinación del recuento total y diferencial de leucocitos.

Dado que la presencia de leucocitosis y neutrofilia son indicadores de mal pronóstico en la progresión a SUH, en los ratones BALB infectados y deplecionados o no de linfocitos B se determinó en sangre entera el recuento total y diferencial de leucocitos al día 3 p.i.



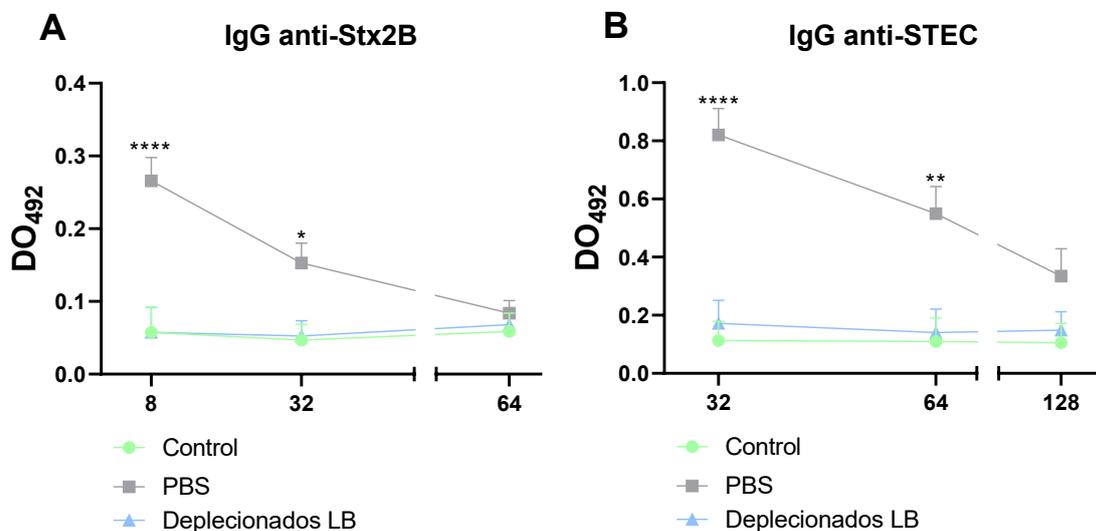
**Figura 22. Determinación de otros parámetros clínicos en los ratones BALB deplecionados o no de linfocitos B e infectados con STEC O157:H7.** Los ratones fueron sangrados al tercer día p.i. para determinar en sangre entera **(A) el recuento total de leucocitos** y **(B) el porcentaje y número absoluto de PMN**. Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Cada barra muestra la media ± SEM de 5 ratones BALB controles, 5 ratones tratados con PBS y 6 ratones deplecionados de LB.

Como puede observarse en la figura 22A, ningún grupo experimental presenta leucocitosis al día 3 p.i. Sin embargo, el grupo tratado con anticuerpo

anti-B220 e infectado muestra neutrofilia, expresado tanto como aumento del porcentaje de PMN (figura 22B) como del número absoluto de PMN (figura 22C). Por otro lado, el grupo tratado con PBS e infectado, sólo es significativo el aumento del número absoluto de PMN respecto del grupo control.

### 9.3. Determinación de la respuesta inmune humoral a 3 días p.i.

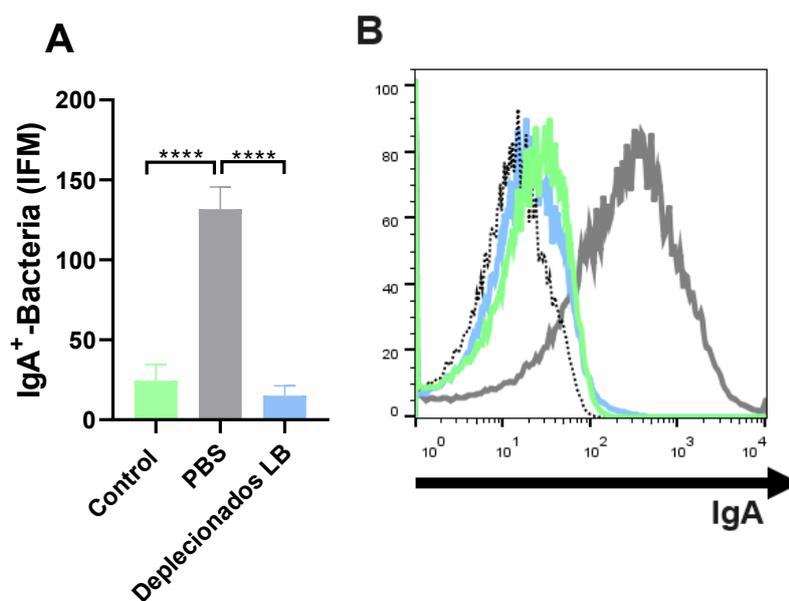
Para analizar la respuesta inmune humoral sistémica y local desencadenada p.i., algunos ratones BALB, tanto los tratados con PBS como los que recibieron anticuerpo anti-B220, fueron sangrados, eutanasiados y se colectó la materia fecal a los 3 días p.i. Se determinó en plasma la presencia de IgG específica anti-Stx2B y anti-STE C O157:H7, y en materia fecal la IgA unida a bacteria, ya que a este tiempo sabemos que no se detecta IgA libre porque la excreción de bacterias patógenas es aún significativa. Para evaluar la IgA producida localmente en el intestino, la materia fecal se incubó con un anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado a FITC y se adquirió en el citómetro.



**Figura 23. Respuesta humoral sistémica de ratones deplecionados o no de linfocitos B e infectados con STEC O157:H7.** Los niveles de (A) IgG anti-Stx2B y (B) IgG anti-STE C O157:H7 se determinaron en el plasma de ratones BALB tratados con PBS o anticuerpo anti-B220 (deplecionados de LB) e infectados y en ratones controles al día 3 p.i. mediante ELISA. Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO<sub>492</sub>. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con los ratones BALB controles y los ratones BALB deplecionados de linfocitos B e infectados a la

misma dilución del plasma. Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones para cada tratamiento.

Como puede observarse en la figura 23A y B, sólo los ratones tratados con PBS e infectados presentaron niveles de anticuerpos anti-Stx2B y anti-STE C O157:H7 significativos respecto de los ratones controles y de los ratones deplecionados de linfocitos B e infectados. Cabe destacar que para el caso de IgG anti-Stx2B, se encontraron niveles de anticuerpos significativos hasta una dilución 1/32 del plasma, mientras que para IgG anti-STE C O157:H7 los niveles de anticuerpos fueron significativos hasta una dilución 1/64. Por otro lado, los ratones deplecionados de linfocitos B no fueron capaces de montar una respuesta humoral sistémica específica contra la toxina ni contra la bacteria patógena.



**Figura 24. Respuesta humoral local de ratones deplecionados o no de linfocitos B e infectados con STEC O157:H7.** La materia fecal fue obtenida y procesada como se describe en Materiales y métodos para determinar mediante citometría de flujo IgA unida a bacterias al día 3 p.i. Se graficó la IFM obtenida a partir de histogramas utilizando un anticuerpo anti-IgA de ratón hecho en rata acoplado a FITC. **(A) IgA unida a bacterias.** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de un factor seguido de un post test de Tukey. \*\*\*\*p<0.0001. Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles, 5 ratones tratados con PBS e infectados y 6 ratones tratados con anticuerpo anti-B220 e infectados. **(B) Histogramas representativos** de muestras de materia fecal no incubadas con anti-IgA de ratón acoplado a FITC (autofluorescencia, línea punteada negra), muestras de materia fecal de ratones BALB controles (línea verde) y de ratones BALB

infectados tratados con PBS (línea gris) o con anticuerpo anti-B220 (deplecionados de linfocitos B; línea celeste) incubadas con anti-IgA de ratón acoplado a FITC, ensayadas en paralelo.

Como puede observarse en el gráfico de barras y en el histograma (figura 24A y B), únicamente hay un incremento significativo de bacterias recubiertas de IgA en la materia fecal de los ratones tratados con PBS e infectados con STEC O157:H7 en comparación con los ratones controles y con los ratones que recibieron anticuerpo anti-B220 y luego fueron infectados. Los ratones deplecionados de linfocitos B no muestran un aumento significativo de IgA unida a bacterias respecto del grupo control, confirmando que éstos no fueron capaces de montar una respuesta humoral local específica contra la bacteria patógena.

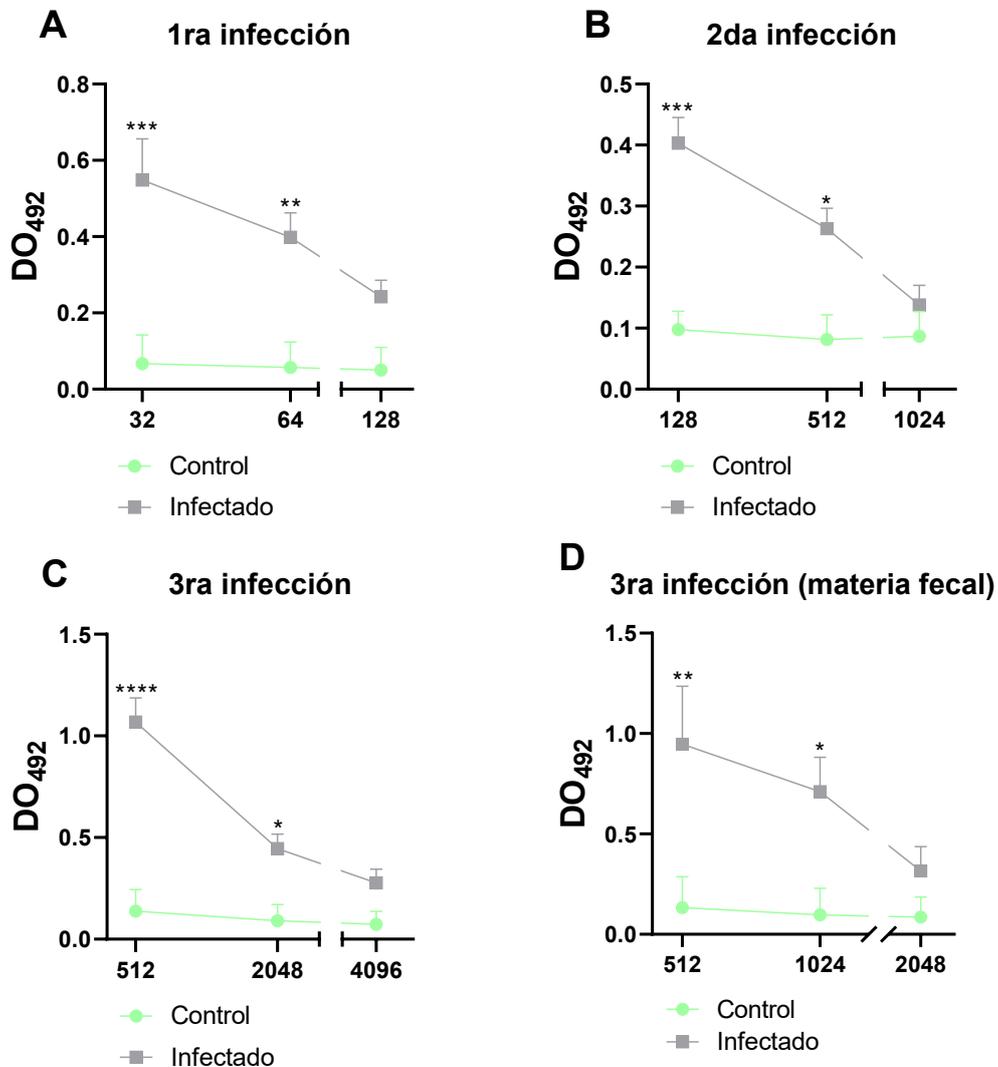
## **10. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-STE C O157:H7.**

La relevancia de la inducción de anticuerpos anti-Stx2 en el contexto de la infección de los ratones con cepas STEC O157:H7 para protegerlos y evitar el desarrollo del SUH ha quedado demostrado en las secciones anteriores. Para elucidar los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos anti-STE C O157:H7 generados durante la infección también podrían participar en la protección durante las infecciones con este patógeno, nos propusimos realizar ensayos *in vitro*.

### **10.1. Esquema de reinfección.**

Para alcanzar títulos altos de los anticuerpos anti-STE C O157:H7 que nos permitan sensibilizar *in vitro* a las STEC en una situación de equivalencia o exceso de anticuerpo, y dado que alguno de los ensayos requiere un alto número de dichas bacterias, nos propusimos llevar a cabo un esquema de reinfección. Para ello, ratones BALB a la edad del destete y en ayunas fueron infectados con una dosis de STEC O157:H7 ( $2 \times 10^{10}$  UFC/ratón) y con 2 dosis mayores ( $5 \times 10^{10}$  UFC/ratón) a intervalos de 10 días. Siete días después de cada desafío infeccioso, los ratones fueron sangrados para determinar mediante ELISA el título de

anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7. A los 7 días luego del último desafío, posterior a ser sangrados, los ratones fueron eutanasiados para extraer todo el contenido del intestino grueso, procesarlo según se detalla en Materiales y métodos, y determinar mediante ELISA anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7 en la materia fecal.

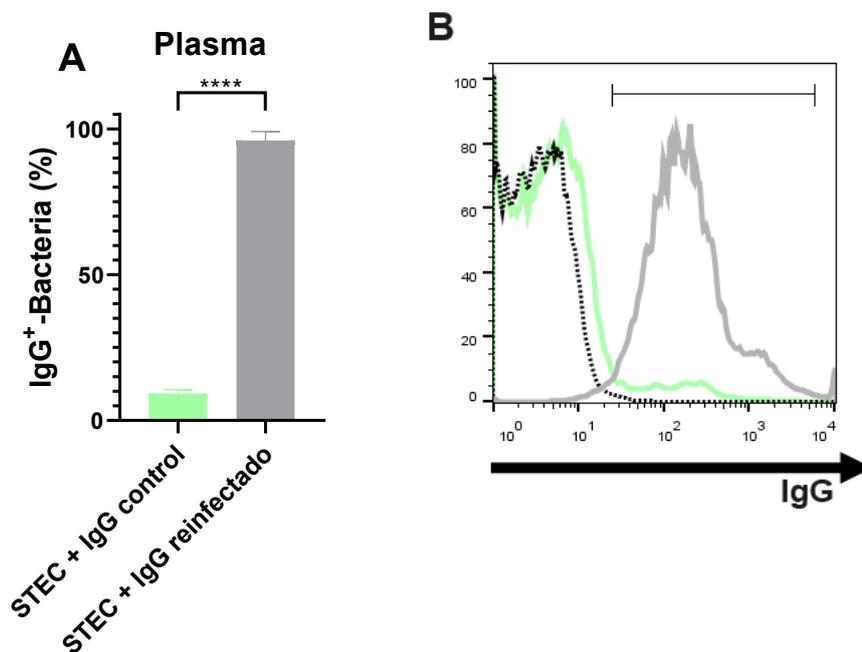


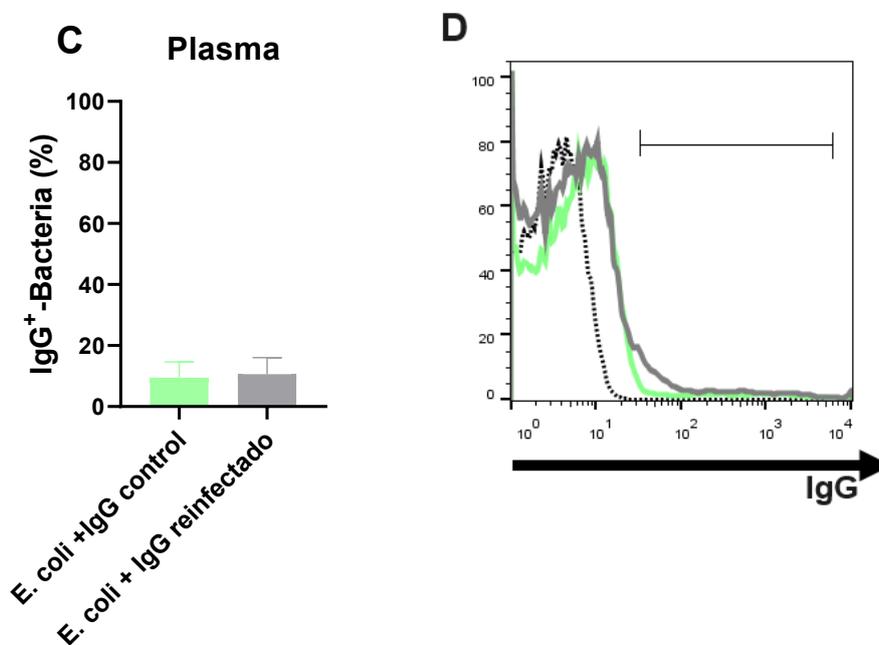
**Figura 25. Respuesta humoral sistémica y local de ratones re infectados con STE $C$  O157:H7.** Ratones BALB a la edad del destete fueron infectados 3 veces a intervalos de 10 días con STE $C$  O157:H7 y sangrados 7 días luego de cada desafío. Se determinó mediante ELISA los niveles de **(A-C) IgG anti-STE $C$  O157:H7 en plasma (en la 1ra, 2da y 3ra infección)** y los niveles de **(D) IgA anti-STE $C$  O157:H7 en materia fecal (3ra infección)**. Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO<sub>492</sub>. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones para cada tratamiento.

Como puede observarse en la figura 25A, 7 días luego de la primoinfección los ratones infectados alcanzan un título de IgG anti-STECH O157:H7 equivalente a 64. Luego de 7 días post 2da y 3ra infección, dicho título se incrementa a 512 y 2048 respectivamente (figuras 25B y C). Puede verse que, entre la 1ra y la 2da infección, el título se octuplica y, entre la 2da y la 3ra infección, se cuadriplica. Los resultados obtenidos en materia fecal (figura 25D) muestran que el título de IgA anti-STECH O157:H7 alcanzado es de 1024 con este modelo de 3 infecciones.

### 10.2. Evaluación de la capacidad opsonizante.

El primer ensayo *in vitro* llevado a cabo fue para determinar la capacidad opsonizante de los anticuerpos anti-STECH O157:H7 hallados en plasma y materia fecal. Para ello, determinamos el nivel de sensibilización de las STECH O157:H7 con la IgG específica presente en plasma y las IgA e IgG presentes en materia fecal por citometría de flujo. Como control de especificidad se utilizó una *E. coli* comensal aislada de la materia fecal de un ratón BALB.

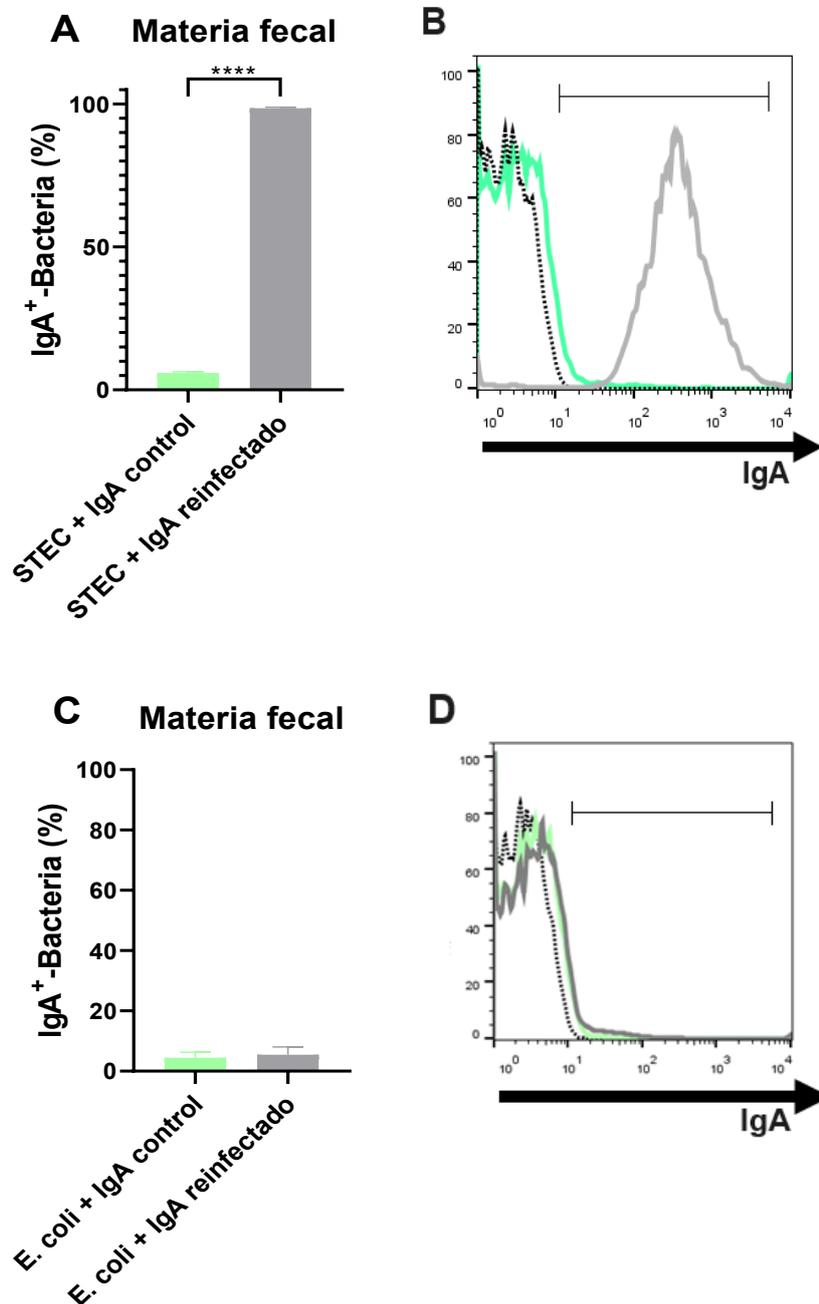




**Figura 26. Opsonización de la IgG plasmática de ratones controles y reinfectados.** Los ensayos de opsonización *in vitro* en muestras de plasma (obtenido a 7 días post 3ra infección) se llevaron a cabo incubando una dilución 1/10 del mismo con STEC O157:H7 ( $10^7$  UFC) durante 18 h, con el posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC. **(A) Opsonización de STEC con IgG plasmática de ratones controles y reinfectados. (C) Opsonización de *E. coli* comensal con IgG plasmática de ratones controles y reinfectados.** Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas. **Histogramas representativos de bacterias STEC O157:H7 (B) y *E. coli* (D)** no incubadas con anti-IgG de ratón acoplado a FITC (autofluorescencia, línea punteada negra), incubadas con plasma control (línea verde) o con plasma de ratones reinfectados (línea gris) y con anti-IgG de ratón acoplado a FITC, ensayadas en paralelo.

Como puede verse en la figura 26A, la IgG plasmática de los ratones reinfectados reconoce a las bacterias STEC O157:H7. De hecho, el 96% de las bacterias se encuentran opsonizadas con la IgG plasmática de los ratones reinfectados. Por el contrario, no se observa IgG del plasma de los animales controles sensibilizando las STEC O157:H7. También, en la figura 26B puede verse un gran desplazamiento de la IFM que va más allá de la primera década únicamente cuando las bacterias son incubadas con plasma de ratones reinfectados, reflejando en parte lo que se gráfica en la figura 26A. Dicho reconocimiento es específico, ya que el plasma de los ratones reinfectados no es capaz de interactuar con una bacteria comensal aislada de la materia fecal de un ratón de su misma cepa (Figuras 26C y D). Cabe destacar que, si bien no se muestra en los histogramas, en todos los casos se realizó un control de pegado

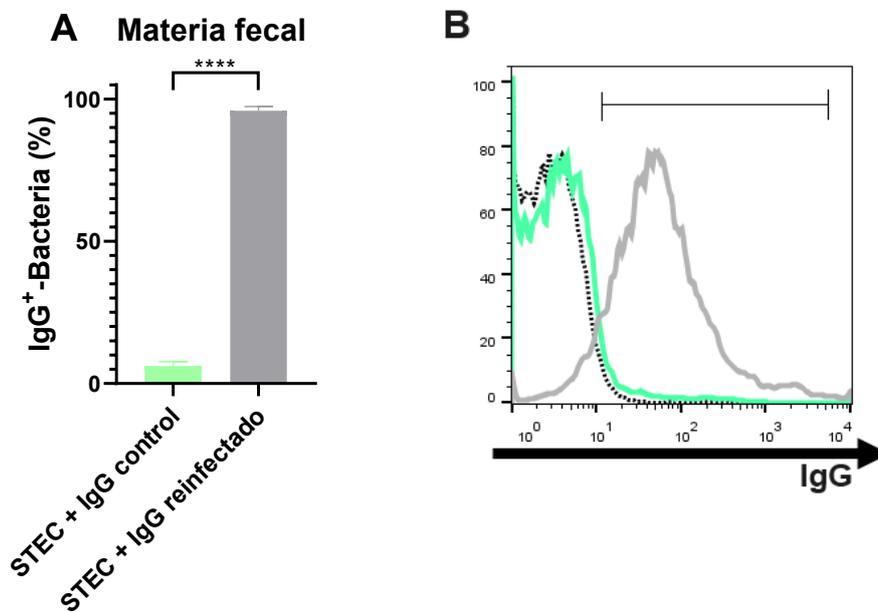
inespecífico en el que bacterias STEC O157:H7 o *E. coli* fueron incubadas únicamente con los anticuerpos secundarios. Estos histogramas no fueron representados ya que fueron semejantes a los obtenidos con la autofluorescencia.

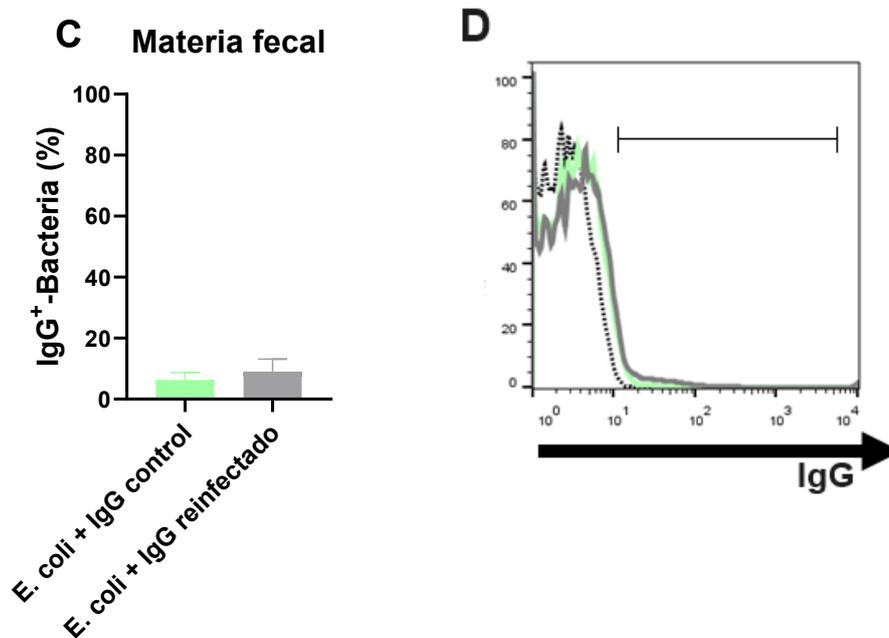


**Figura 27. Opsonización de la IgA libre en materia fecal de ratones controles y reinfectados.** Los ensayos de opsonización *in vitro* se llevaron a cabo incubando sobrenadantes de materia fecal (dilución 1/2) con STEC O157:H7 ( $10^7$  UFC) durante 18 h, con el posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado a FITC. **(A) Opsonización de STEC O157:H7 con IgA libre en materia fecal de ratones controles y reinfectados.** **(C) Opsonización de *E. coli* comensal con IgA libre en materia fecal de ratones controles y**

**reinfectados.** Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas. **Histogramas representativos de bacterias STEC O157:H7 (B) y *E. coli* (D)** no incubadas con anti-IgA de ratón acoplado a FITC (autofluorescencia, línea punteada negra), incubadas con IgA de materia fecal de ratones controles (línea verde) o con IgA de materia fecal de ratones reinfectados (línea gris) y con anti-IgA de ratón acoplado a FITC, ensayadas en paralelo.

En la figura 27A, puede verse que la IgA libre en materia fecal de ratones reinfectados es capaz de opsonizar significativamente a las bacterias STEC O157:H7 en comparación con la IgA en materia fecal de ratones controles. Se ve que el 98.5% de las bacterias se encuentran opsonizadas con la IgA de los sobrenadantes de materia fecal de los ratones reinfectados. A su vez, en la figura 27B se ve un corrimiento de la IFM más allá de la primera década solamente cuando las bacterias son incubadas con sobrenadantes de materia fecal de ratones reinfectados, en concordancia con lo que se observa en la figura 27A. Este reconocimiento es específico, dado que los sobrenadantes de materia fecal de los ratones reinfectados no es capaz de reconocer a una bacteria comensal (Figuras 27C y D).





**Figura 28. Opsonización de la IgG libre en materia fecal de ratones controles y reinfectados.**

Una dilución 1/2 de los sobrenadantes de la materia fecal fueron incubados con STEC O157:H7 ( $10^7$  UFC) durante 18 h. Luego, mediante análisis con citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC se determinó el porcentaje de bacteria opsonizada. **(A) Opsonización de STEC O157:H7 con IgG libre en materia fecal de ratones controles y reinfectados. (C) Opsonización de *E. coli* comensal con IgG libre en materia fecal de ratones controles y reinfectados.** Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas. **Histogramas representativos de bacterias STEC O157:H7 (B) y *E. coli* (D)** no incubadas con anti-IgG de ratón acoplado a FITC (autofluorescencia, línea punteada negra), incubadas con IgG de materia fecal de ratones controles (línea verde) o con IgG de materia fecal de ratones reinfectados (línea gris) y con anti-IgG de ratón acoplado a FITC, ensayadas en paralelo.

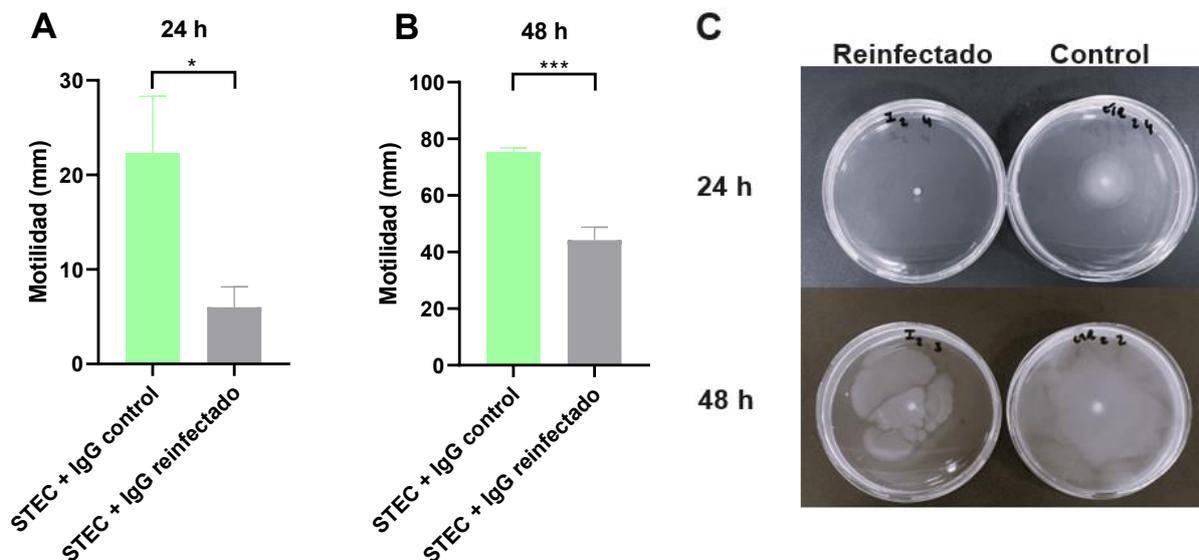
Al igual que con la IgA libre en materia fecal, la IgG de ratones reinfectados puede opsonizar significativamente a las bacterias STEC O157:H7 en comparación con la IgG en materia fecal de ratones controles. Como se ve en el gráfico de barras, el 95.8% de las bacterias se encuentran opsonizadas con la IgG de los sobrenadantes de materia fecal de los ratones reinfectados (Figura 28A). Además, en la figura 28B se ve un desplazamiento de la IFM únicamente cuando las bacterias son incubadas con sobrenadantes de materia fecal de ratones reinfectados, en concordancia con lo que se muestra en la figura 28A. A su vez, dicho reconocimiento es también específico, ya que los sobrenadantes de materia fecal de los ratones reinfectados tampoco es capaz de reconocer a una *E. coli* comensal (Figuras 28C y D). En conjunto, todos estos datos nos permiten

afirmar que tanto la IgG plasmática como la detectada libre en materia fecal, así como también la IgA libre, provenientes de ratones re infectados son capaces de reconocer específicamente a las bacterias STEC O157:H7.

### 10.3. Evaluación de la capacidad neutralizante.

#### 10.3.1. Inhibición de la motilidad bacteriana.

Con el conocimiento de que la motilidad bacteriana es relevante en el establecimiento de la colonización, sobre todo para atravesar la capa de mucus que recubre a los enterocitos, decidimos estudiar si los anticuerpos producidos por los ratones re infectados eran capaces de inhibir la motilidad bacteriana. Debido a la necesidad de que la fuente de anticuerpos estuviera estéril, estos estudios se realizaron únicamente con el plasma de ratones controles y re infectados.



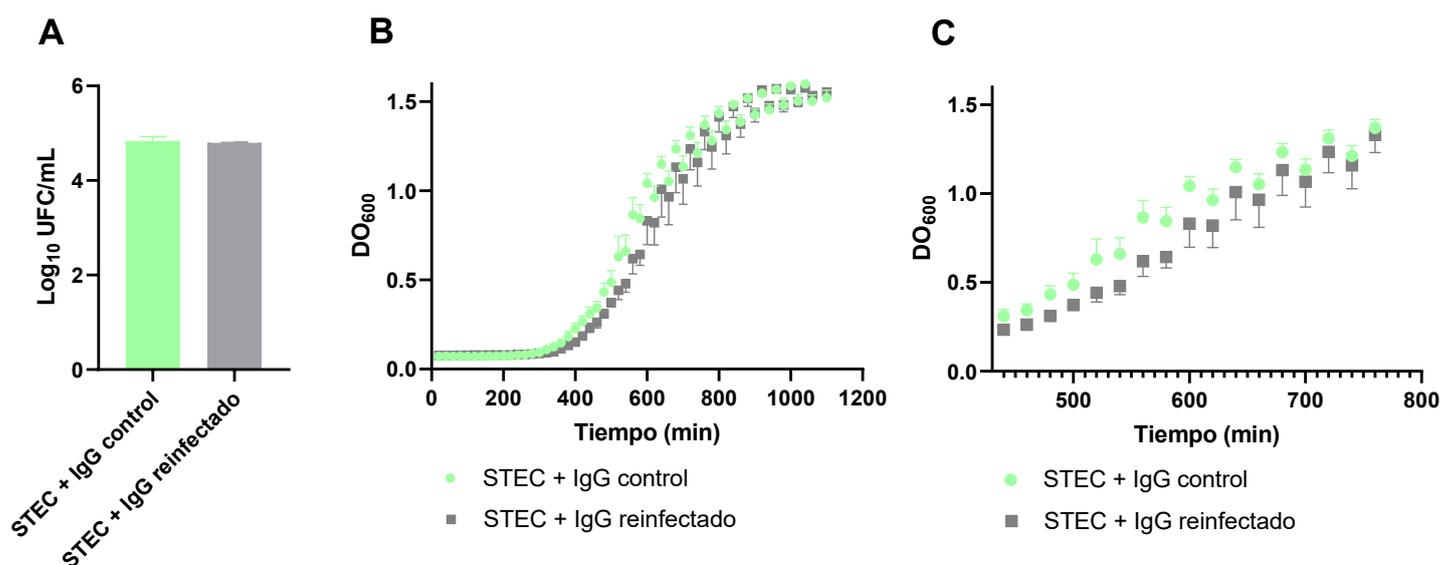
**Figura 29. Inhibición de la motilidad bacteriana de la IgG plasmática de ratones controles y re infectados.** Los plasmas de ratones controles y re infectados, diluidos 1/10, fueron incubados con STEC O157:H7 ( $10^3$  UFC) durante 18 h. Luego, las UFC fueron sembradas en el centro de placas de agar blando, cultivadas a 37°C y a 24 y 48 h se determinó la motilidad midiendo en mm los halos de difusión. **(A) Motilidad bacteriana a 24 h post incubación con IgG plasmática de ratones controles y re infectados.** **(B) Motilidad bacteriana a 48 h post incubación con IgG plasmática de ratones controles y re infectados.** Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 5 réplicas biológicas. **(C) Imágenes representativas** de placas de agar blando **mostrando los halos de**

**difusión a 24 y 48 h de bacterias STEC O157:H7 incubadas con IgG plasmática de ratones controles y re infectados.**

La figura 29A y B muestra que a ambos tiempos analizados la motilidad bacteriana se vio reducida significativamente cuando las bacterias fueron incubadas con plasma de ratones re infectados en comparación a cuando se las incubó con plasma de ratones controles. Como se aprecia en el gráfico a 24 h (Figura 29A), la motilidad con el plasma de controles fue de aproximadamente 22 mm, mientras que la alcanzada con el plasma de ratones re infectados fue de 6 mm. A 48 h (Figura 29B), la motilidad con el plasma control fue de 75 mm, cubriendo en muchos casos la totalidad de la placa de agar blando, mientras que cuando fueron incubadas con plasma de ratones re infectados la motilidad fue de 44 mm. Un ejemplo representativo se muestra en la Figura 29C.

### 10.3.2. Inhibición del crecimiento bacteriano.

Por otro lado, tomando en cuenta publicaciones previas en las que los anticuerpos neutralizantes pueden interferir con el crecimiento bacteriano afectando la fase lag o exponencial [Okai y col., 2016; Sasaki y col., 2021], decidimos llevar a cabo ensayos de inhibición del crecimiento.



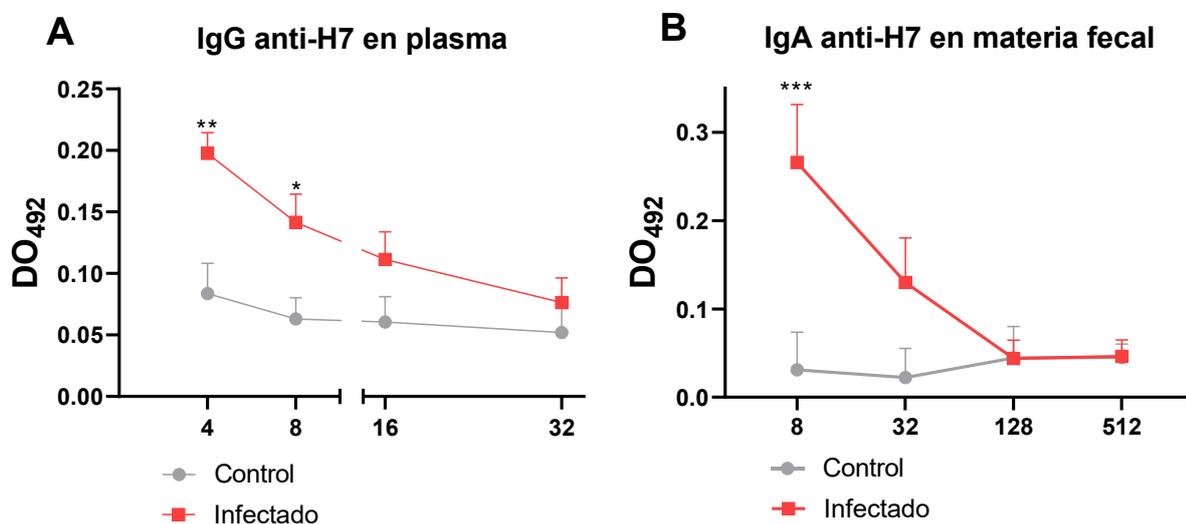
**Figura 30. Inhibición del crecimiento bacteriano con plasmas de ratones controles y re infectados.** Los plasmas de ratones controles y re infectados, diluidos 1/10, fueron incubados con STEC O157:H7 ( $10^4$  UFC) durante 18 h. Luego, las incubaciones bacterias-muestras fueron depositadas en 3 mL de TSB y cultivadas a 37°C durante 18 h en un lector de placas multimodo.

Cada 20 min, se realizó una lectura de la  $DO_{600}$  como una medición del crecimiento bacteriano. **(A) Recuento bacteriano inicial (tiempo 0).** Los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 réplicas biológicas. **(B) Crecimiento bacteriano post incubación durante 18 h con IgG plasmática de ratones controles y re infectados.** **(C) Crecimiento bacteriano post incubación con IgG plasmática de ratones controles y re infectados (lapso de fase exponencial).** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey para las comparaciones múltiples. Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4 réplicas biológicas.

Para que sea válida la comparación del número de UFC alcanzado a los distintos tiempos es importante garantizar que se parte del mismo número de UFC a tiempo cero en ambos tratamientos. Por eso, después de las 18 h de incubación de STEC O157:H7 con IgG plasmática de ratones controles y re infectados llevamos a cabo el recuento de colonias viables en ambos tratamientos. Como se ve en la figura 30A, no se observan diferencias significativas en el recuento de viables a tiempo cero, asumiendo de esta manera que en ambos tratamientos teníamos cantidades similares de UFC de STEC O157:H7 al inicio de los cultivos bacterianos. (Figura 30B). Si bien en la figura 30C, en la cual se gráfica solamente el lapso en el que los cultivos se encontraban en fase exponencial para una mejor visualización, se observa que a todos los tiempos evaluados la  $DO_{600}$  de STEC O157:H7 con el tratamiento IgG plasmática de ratones re infectados es menor respecto de la  $DO_{600}$  con el tratamiento IgG plasmática de ratones controles, esta diferencia no llega a ser significativa.

#### **10.4. Presencia de anticuerpos anti-H7 en ratones infectados sobrevivientes.**

Para continuar caracterizando los anticuerpos anti-STE C O157:H7 presentes en plasma y materia fecal de los ratones BALB infectados y sobrevivientes, decidimos evaluar qué antígeno expresado por las STE C O157:H7 podría estar siendo reconocido por dichos anticuerpos. Considerando que la H7 es una proteína altamente inmunogénica y relevante para la patogenicidad bacteriana, realizamos un ELISA para detectar anticuerpos anti-H7.



**Figura 31. Respuesta humoral sistémica y local anti-H7 de ratones infectados con STEC O157:H7.** Ratones BALB a la edad del destete fueron infectados con STEC O157:H7 ( $5.2 \times 10^9$  UFC/ratón). Siete días p.i. fueron sangrados para coleccionar plasma y se recogió materia fecal, la cual fue procesada tal se describe en Materiales y métodos, para determinar mediante ELISA los niveles de anticuerpos anti-H7. **(A) IgG anti-H7 en plasma. (B) IgA anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal.** Los niveles de anticuerpos se expresaron como DO<sub>492</sub>. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Cada punto muestra la media  $\pm$  SEM de 3 ratones BALB controles y 5 ratones BALB infectados.

Los ratones BALB infectados presentaron niveles significativos de anticuerpos anti-H7 en plasma (de isotipo G; figura 32A) y en sobrenadantes de materia fecal (de isotipo A; figura 32B). En ambos casos, el título alcanzado luego de una primoinfección fue de 8. No descartamos que con las dosis usualmente utilizadas ( $>10^{10}$  UFC/ratón) el título alcanzado tanto en plasma como en materia fecal sea mayor. Como es esperable, los ratones controles no infectados, no presentan anticuerpos anti-H7 en ninguna muestra biológica ensayada.

## **11. ROL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-STE C O157:H7 EN LA MUCOSA INTESTINAL EN LA PREVENCIÓN DEL SUH.**

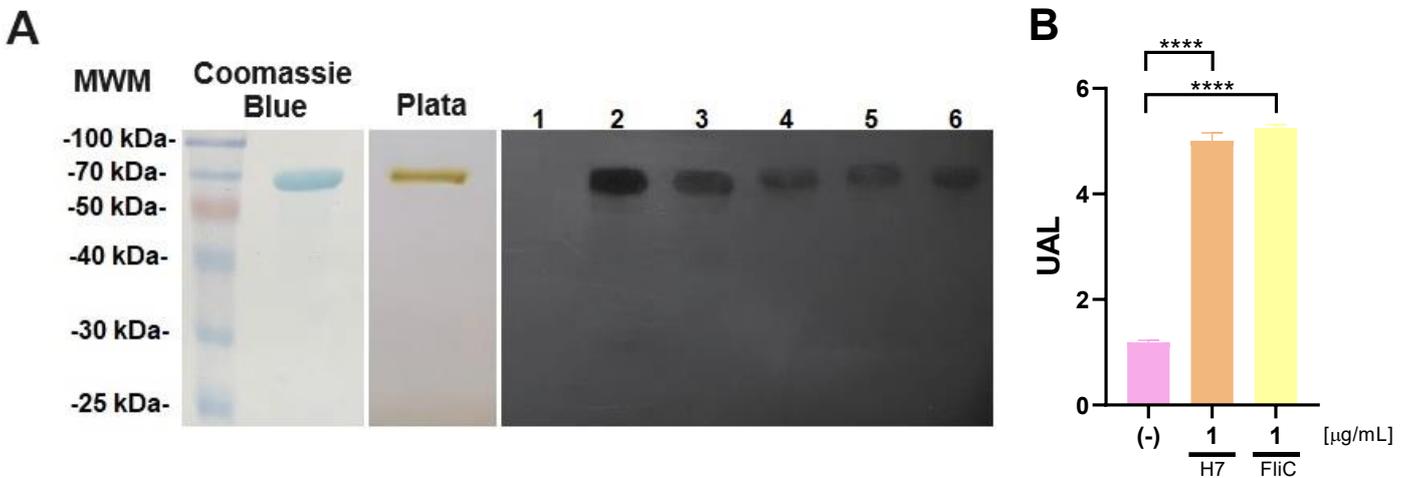
Nuestro próximo objetivo fue definir si los anticuerpos anti-STE C O157:H7 con capacidad neutralizante presentes en la mucosa intestinal de los ratones BALB infectados eran suficientes para la prevención del SUH. Es decir, si interfiriendo con la colonización bacteriana, la cual es el primer paso en la cascada patogénica del SUH, se logra evitar el desarrollo del SUH.

### 11.1. Elección de la H7 como antígeno para planes de inmunización.

Habiendo demostrado la presencia de anticuerpos anti-H7 en las muestras de plasma y materia fecal de los animales infectados sobrevivientes, y considerando que H7 es una proteína relevante tanto en la motilidad como en el establecimiento de la colonización y adherencia a células epiteliales intestinales [Mahajan y col., 2009; Cullender y col., 2013], decidimos evaluarla como inmunógeno para desarrollar protección frente a las infecciones con STEC.

#### 11.1.1. Obtención, purificación y caracterización de H7.

Los flagelos fueron obtenidos a partir de la superficie bacteriana de la cepa  $\Delta$ Stx por estrés mecánico, y los monómeros de H7 por despolimerización por calor, como se detalla en Materiales y métodos. La pureza e identidad de cada lote de H7 se corroboró mediante SDS-PAGE (con tinción con plata y Coomassie Blue R250), Western-Blot, y por ensayos funcionales mediante la determinación de su actividad biológica sobre el sistema reportero Caco-2-CCL20:luc.



**Figura 32. Pureza e identificación de la H7.** (A) Panel izquierdo: SDS-PAGE de la H7 purificada teñido con Coomassie Blue R250. Panel central: SDS-PAGE de H7 purificada teñido con plata. Panel derecho: Western Blot de la H7 purificada incubada con plasma de ratones controles (calle 1), anticuerpo comercial policlonal anti-flagelina (calle 2) o plasma de ratones inmunizados con H7 (calles 3-6). Cada una de estas calles corresponde al plasma de un ratón seleccionado al azar de cada esquema de inmunización realizado. (B) Las células reporteras Caco-2-CCL20:luc se estimularon con H7 purificada (1 µg/mL), FliC (1 µg/mL) o se dejaron sin estimular (-) según se detalla en Materiales y métodos. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de

luminiscencia (UAL) y cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de triplicados independientes. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

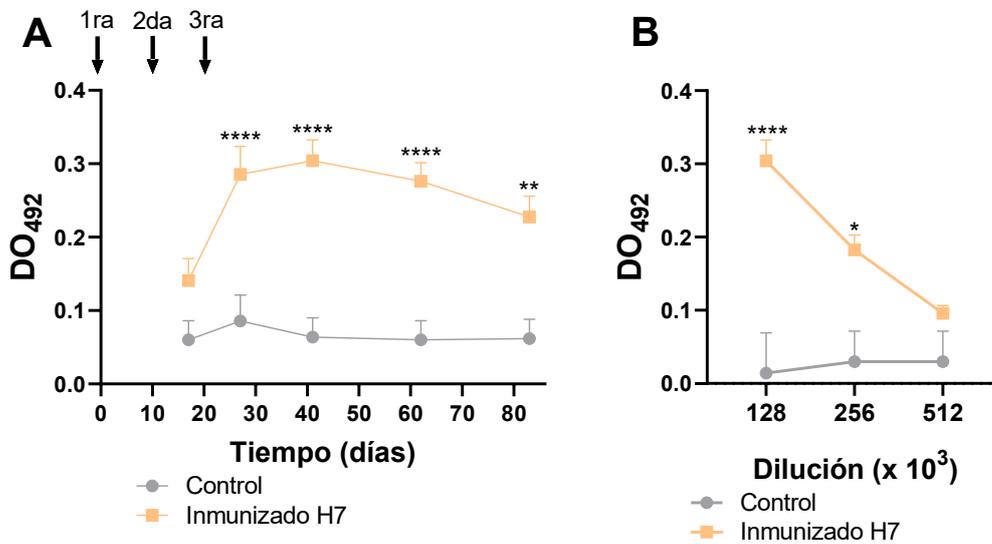
En la figura 31A, se muestra una corrida representativa de SDS-PAGE seguida de la tinción con Coomassie Blue o con plata, donde se observa una única banda proteica de aproximadamente 70 kDa, la cual reaccionó fuertemente con el anticuerpo comercial anti-flagelina cuando se llevó a cabo el Western Blot (calle 2). En el Western Blot también se usaron muestras de plasmas de ratones controles (no inmunizados) seleccionadas al azar, y de un ratón inmunizado por cada uno de los 4 planes de inmunización realizados, confirmando que la inmunorreactividad está dirigida principalmente contra H7. Cabe mencionar que el plasma de los ratones controles no reaccionó inespecíficamente contra la proteína purificada, y que no se visualizaron otras bandas proteicas que no sean H7, descartando la presencia concomitante de contaminantes en los lotes de H7 purificada. También, los lotes de H7 se caracterizaron en un bioensayo TLR5-dependiente utilizando la línea celular reportera Caco-2-CCL20:luc tal como se reportó anteriormente [Hiriart y col., 2012; Iraporda y col., 2016]. Dicha línea celular activa la expresión y síntesis de la luciferasa únicamente con agonistas del TLR5. Como se ve en la figura 31B, con 1  $\mu\text{g/mL}$  de H7 se obtuvieron UAL semejantes a la respuesta desencadenada por FliC, utilizada como control positivo. Lo interesante de este ensayo, es que demuestra que durante el proceso de obtención y purificación de H7 no se afecta su estructura ni su capacidad para interactuar con el TLR5 y, subsecuentemente, desencadenar una respuesta inflamatoria.

## **11.2. Esquema de inmunización con H7.**

### *11.2.1. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-H7 en plasma.*

El esquema de inmunización constó de la administración intranasal de 10  $\mu\text{g}$  de H7 en 3 dosis a intervalos de 10 días, sin adyuvante, a ratones BALB de 6-8 semanas de edad, sexo indistinto. A distintos tiempos post inmunización, se

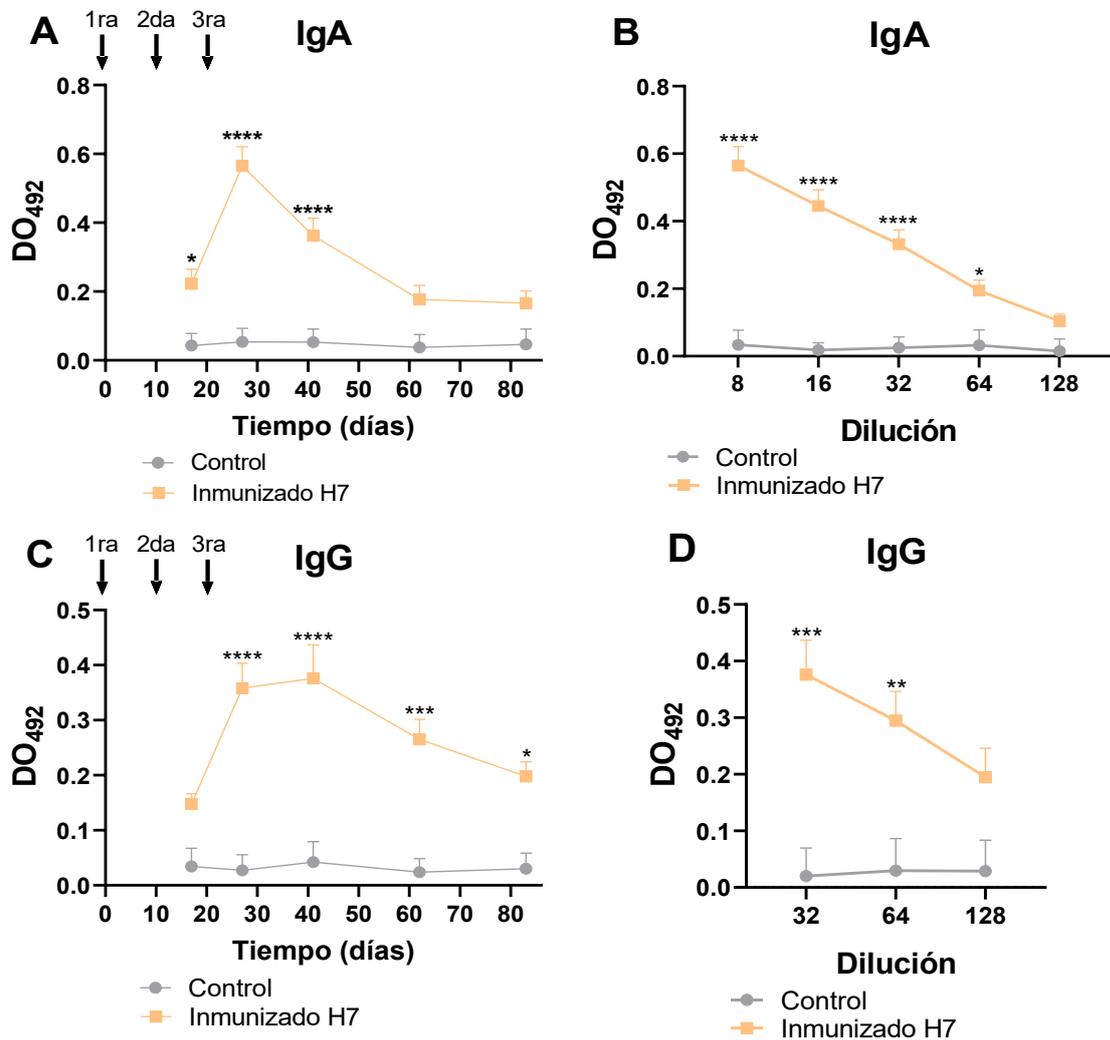
tomaron muestras de plasma y materia fecal para determinar los niveles de anticuerpos anti-H7, según se indica en las respectivas figuras.



**Figura 33. Niveles de IgG específica anti-H7 en plasma de ratones controles e inmunizados. (A) Cinética de la producción de anticuerpos específicos.** Las flechas indican el tiempo en que se llevó a cabo cada inmunización con H7. Cada punto muestra el nivel de anticuerpos anti-H7 en plasma a una dilución 1/128000 expresado como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. **(B) Título de anticuerpos en el pico de máxima respuesta post inmunización (día 41).** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001. Cada punto representa la media ± SEM de 5 ratones para cada tratamiento. Este experimento es representativo de 4 réplicas biológicas.

Determinamos los niveles de IgG específica anti-H7 en plasma fijando una dilución 1/128000. Los niveles de IgG anti-H7 en el plasma de los ratones inmunizados, fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar un pico de máxima respuesta a los 41 días después de la primera inmunización (Figura 33A). A este tiempo, los ratones alcanzaron un título promedio de 256000 (Figura 33B). Como era de esperarse, no se detectó IgG anti-H7 en el plasma de los ratones controles.

11.2.2. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal de ratones inmunizados.



**Figura 34. Niveles de IgA e IgG específica anti-H7 en materia fecal de ratones controles e inmunizados.** La materia fecal recolectada fue procesada tal se describe en Materiales y métodos para determinar los niveles de anticuerpos anti-H7 mediante ELISA. **(A) y (C). Cinética de la producción de anticuerpos específicos.** Las flechas indican el tiempo en que se llevó a cabo cada inmunización con H7. Cada punto muestra los niveles de IgA e IgG anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal a una dilución 1/8 y 1/32, respectivamente, expresados como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. **(B) Título de IgA y (D) de IgG anti-H7 en el pico de máxima respuesta post inmunización.** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Cada punto representa la media ± SEM de 5 ratones para cada tratamiento. Este experimento es representativo de 4 réplicas biológicas.

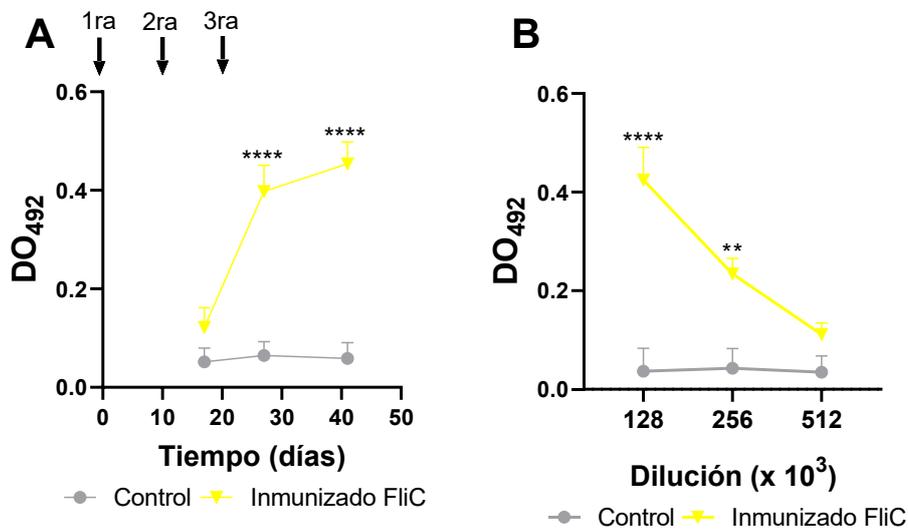
Determinamos los niveles de IgA específica anti-H7 en los sobrenadantes de materia fecal fijando una dilución en 1/8. Se observó niveles crecientes de anticuerpos IgA específicos y un pico máximo a 27 días post primera inmunización. A este tiempo, los ratones alcanzaron un título promedio de IgA anti-H7 de 64 (Figura 34B). Luego, se observó un descenso progresivo de los niveles de IgA hasta alcanzar los niveles basales de los controles (Figura 34A). En estas muestras se observó un patrón de IgG específica anti-H7 similar al obtenido en plasma. Al fijar una dilución 1/32, se detectaron niveles significativos de IgG anti-H7 en los ratones inmunizados, los cuales fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar un pico de máxima respuesta a los 41 días post 1ra inmunización (Figura 34C). A este tiempo, los ratones alcanzaron un título promedio de 64 (Figura 34D). Cabe mencionar que el grupo control no mostró anticuerpos anti-H7 específicos.

Por lo tanto, bajo este esquema de inmunización, pudimos confirmar que la H7 es capaz de desencadenar una fuerte respuesta humoral a nivel sistémico y en mucosa intestinal, en ausencia de adyuvante, que se mantiene hasta al menos 83 días post primera inmunización en el caso de IgG en plasma y materia fecal, y hasta 41 días para el caso de la IgA en materia fecal.

### **11.3. Esquema de inmunización con FliC.**

Simultáneamente, un grupo adicional de ratones fue inmunizado con otro flagelo no relacionado como FliC, proveniente de la cepa *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028, como control de especificidad. El esquema de inmunización constó de la administración intranasal de 10 µg de FliC en 3 dosis a intervalos de 10 días, sin adyuvante, a ratones BALB de 6-8 semanas de edad, de sexo indistinto. A distintos tiempos post inmunización, se tomaron muestras de plasma y materia fecal para determinar los niveles de anticuerpos anti-FliC

11.3.1. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-FliC en plasma de ratones inmunizados.

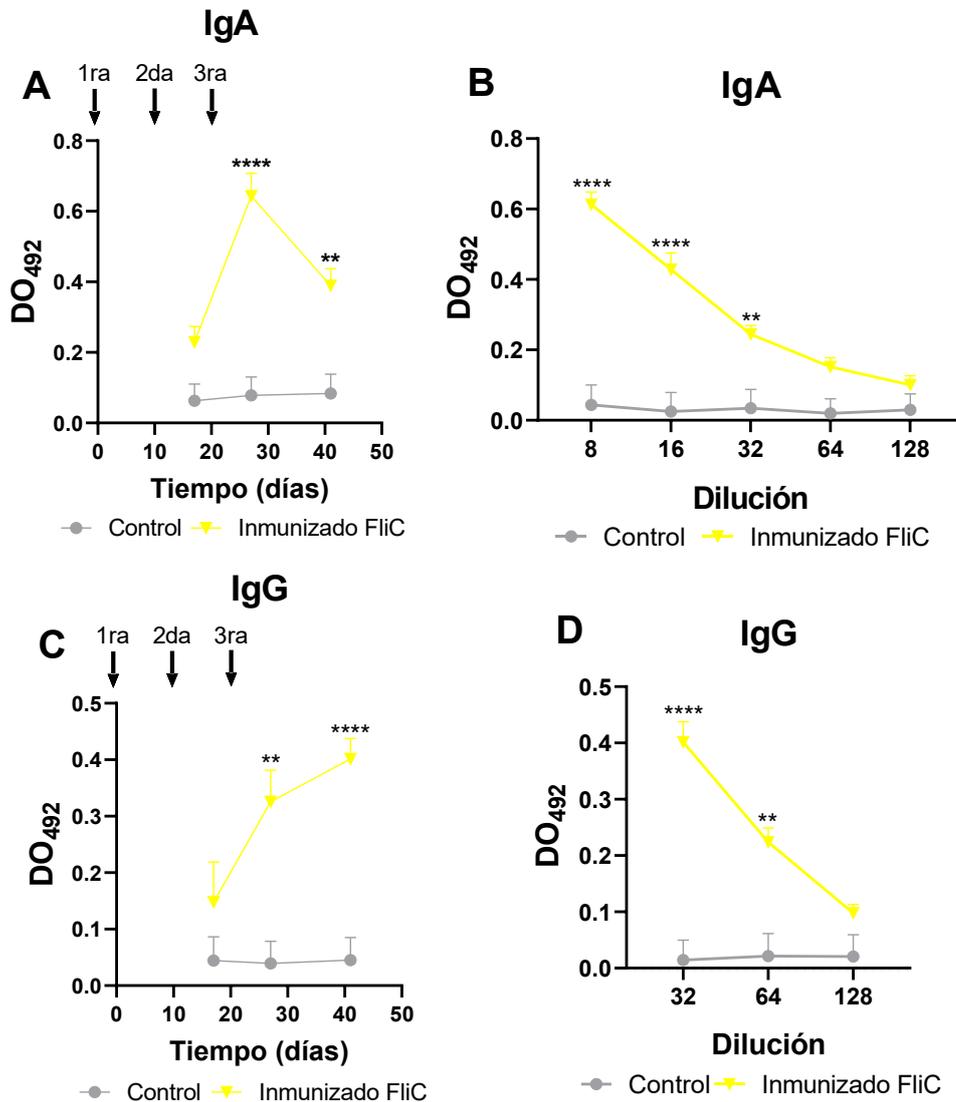


**Figura 35. Niveles de IgG específica anti-FliC en plasma de ratones controles e inmunizados.**

**(A) Cinética de la producción de anticuerpos específicos.** Las flechas indican el tiempo en que se llevó a cabo cada inmunización con FliC. Cada punto muestra el nivel de anticuerpos anti-FliC en plasma a una dilución 1/128000 expresado como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. **(B) Título de anticuerpos en el pico de máxima respuesta post inmunización.** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001. Cada punto representa la media ± SEM de 4 ratones para cada tratamiento.

A distintos tiempos post inmunización, se determinaron los niveles de IgG anti-FliC en plasma fijando una dilución 1/128000. Observamos una cinética similar a la obtenida con la inmunización con H7, con el pico de máxima producción de IgG anti-FliC a 41 días post primera inmunización (Figura 35A). En este tiempo, los ratones alcanzaron un título promedio de 256000 (Figura 35B). Como se esperaba, no se detectó IgG anti-FliC en el plasma de los ratones controles.

11.3.2. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-FliC en sobrenadantes de materia fecal de ratones inmunizados.

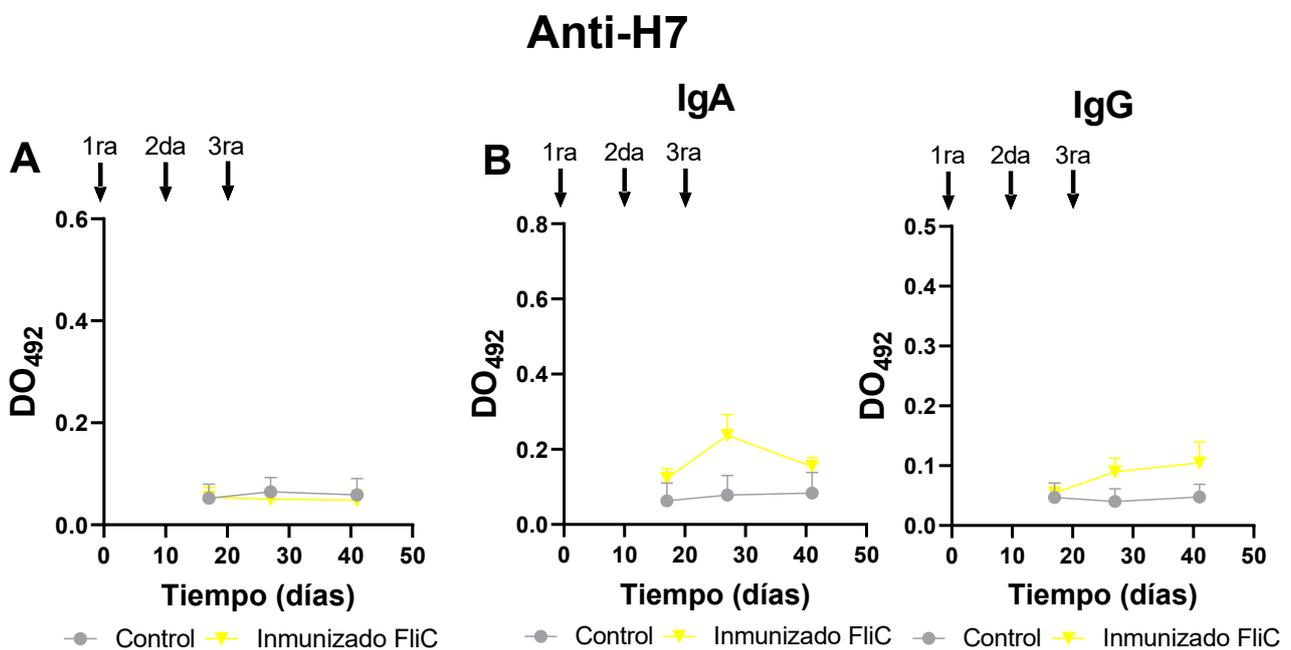


**Figura 36. Niveles de IgA e IgG específica anti-FliC en materia fecal de ratones controles e inmunizados.** La materia fecal recolectada fue procesada como se describe en Materiales y métodos para determinar los niveles de anticuerpos anti-FliC mediante ELISA. **(A) y (C). Cinética de la producción de anticuerpos específicos.** Las flechas indican el tiempo en que se llevó a cabo cada inmunización con FliC. Cada punto muestra los niveles de IgA e IgG anti-FliC en sobrenadantes de materia fecal a una dilución 1/8 y 1/32, respectivamente, expresados como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. **(B) Título de IgA y (D) de IgG anti-FliC en el pico de máxima respuesta post inmunización.** Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001. Cada punto representa la media ± SEM de 4 ratones para cada tratamiento.

En materia fecal, fijando una dilución 1/8 se observó el pico de máxima producción de IgA específica anti-FliC a los 27 días post 1ra inmunización (Figura 36A) y un título promedio de 32 (Figura 36B). Para el caso de la IgG anti-FliC, también se vio una cinética similar a la obtenida en plasma. Al fijar una dilución 1/32, se observó el pico de máxima producción de IgG específica a los 41 días post 1ra inmunización (Figura 36C) y un título promedio de 64 (Figura 36D). En el grupo control no se encontraron anticuerpos anti-FliC específicos.

Con este esquema de inmunización similar al realizado con H7, pudimos confirmar que la FliC es capaz de desencadenar una respuesta humoral significativa, en ausencia de adyuvante, con una cinética de producción de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en mucosa intestinal similar a la obtenida con H7.

#### 11.4. Estudio de la existencia de reacción cruzada entre anticuerpos anti-FliC y anti-H7.



**Figura 37. Evaluación de la reacción cruzada de los anticuerpos anti-FliC presentes en plasma y sobrenadantes de materia fecal.** El plasma y los sobrenadantes de materia fecal de los ratones BALB inmunizados con FliC fueron evaluados para descartar, o no, la detección de H7. Las flechas indican el tiempo en que se llevó a cabo cada inmunización con FliC. **(A) Niveles de IgG anti-H7 en plasma de ratones inmunizados con FliC y controles.** Fijando una dilución 1/128000 del

plasma, cada punto muestra los niveles de anticuerpos anti-H7 obtenidos expresados como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. **(B) IgA e IgG anti-H7 en materia fecal de ratones inmunizados con FliC y controles.** Fijando una dilución de los sobrenadantes de materia fecal 1/8 en el caso de IgA y de 1/32 para IgG, cada punto muestra los niveles de IgA e IgG anti-H7 obtenidos expresados como DO<sub>492</sub> a cada tiempo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey, no hallándose diferencias estadísticamente significativas. Cada punto representa la media ± SEM de 4 ratones para cada tratamiento.

Como puede observarse en la Figura 37, los ratones inmunizados con FliC presentan en los plasmas IgG específica y en los sobrenadantes de materia fecal IgA e IgG capaces de interactuar con FliC, pero no con H7 (Figura 37A y B). Estos resultados confirman la especificidad de la respuesta inmune humoral montada para cada flagelina. No se realizó el estudio inverso, es decir, de si las muestras provenientes de ratones inmunizados con H7 reconocían a la FliC, ya que los ensayos de infección no se llevarán a cabo con *Salmonella typhimurium* y es un objetivo que excede el alcance de esta tesis.

## **12. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR ANTI-H7.**

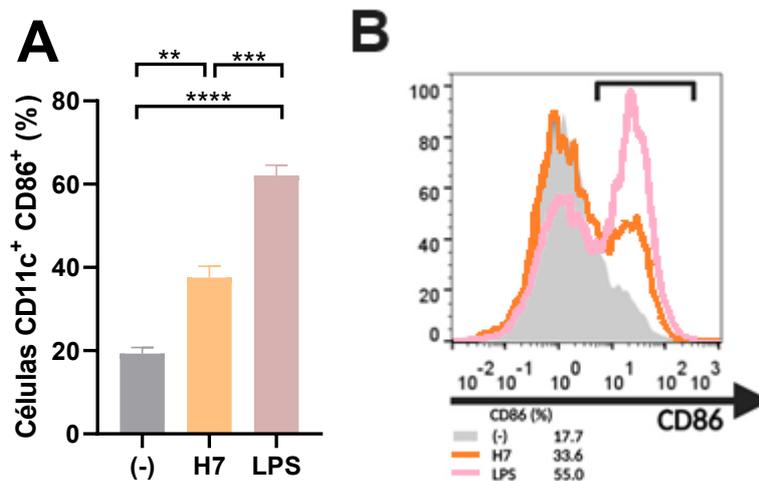
### **12.1. Activación de BMDC por H7.**

Dada la relevancia de estas células en la vigilancia, captación y procesamiento de antígenos en la LP del intestino, y por ser una célula caracterizada por su capacidad migratoria y especializada en la presentación de antígenos a linfocitos T y B en sitios inductores de la respuesta inmune (principalmente ganglios y bazo), sumado a que expresan en su superficie el TLR5, decidimos estudiar si la H7 era capaz de activarlas.

#### *12.1.1. Expresión de CD86 en la superficie de BMDC.*

BMDC fueron obtenidas y activadas con H7 tal como se detalla en Materiales y métodos. Veinticuatro horas post estimulación, determinamos parámetros de activación en su superficie y mediadores solubles en los sobrenadantes de cultivo.

Las células fueron recogidas, centrifugadas e incubadas con anti-CD11c PE-Cy7 y con anti-CD86 PE de ratón para luego determinar el porcentaje de células CD86 positivas (marcador de activación) dentro de las células CD11c positivas (marcador de células dendríticas maduras) por citometría de flujo.

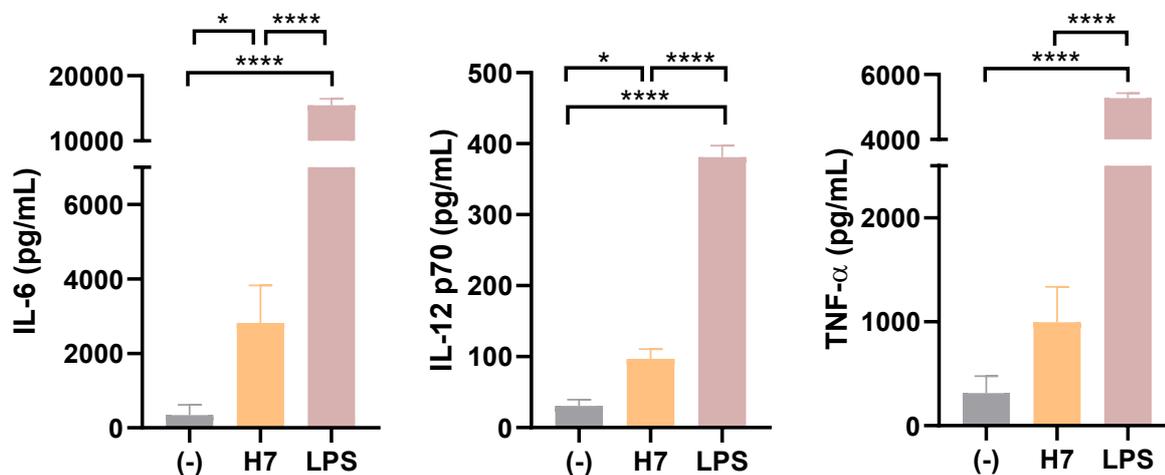


**Figura 38. Activación de BMDC por la H7.** Las BMDC se recolectaron al día 7 de cultivo con GM-CSF e IL-4 y se estimularon durante 24 h con H7 (1 µg/mL), LPS como control positivo (1 µg/mL) o medio solo (-) como control negativo sin estimulación. **(A) El porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>** se determinó mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor seguido de un post test de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Cada barra muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. **(B) Histograma representativo** que muestra el patrón de expresión de CD86 en BMDC estimuladas con H7 (línea naranja), LPS (línea rosa) o medio sólo (histograma relleno de color gris).

Como se puede ver en la figura 38A y B, la H7 es capaz de aumentar la expresión de CD86 en la superficie de las BMDC maduras (CD11c positivas). Sin embargo, esta expresión es significativamente menor comparada con la que presentan las BMDC estimuladas con LPS, estímulo clásico llevado como control positivo de activación.

### 12.1.2. Perfil de citoquinas secretadas por BMDC.

En los sobrenadantes de cultivo de las BMDC estimuladas se determinó la concentración de IL-6, IL-12p70 y TNF-α, sabiendo que el TLR5 utiliza a la molécula adaptadora Myd88 para activar al factor de transcripción NF-κB e inducir la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias.



**Figura 39. Citoquinas producidas por las BMDC estimuladas con H7, LPS o medio sólo.** Las BMDC diferenciadas después de 7 días de cultivo se estimularon durante 24 h con H7 (1 µg/mL), LPS (1 µg/mL) o medio solo (-). Pasado el lapso de estimulación, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para determinar mediante ELISA la concentración de **IL-6, IL-12 p70 y TNF-α**. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

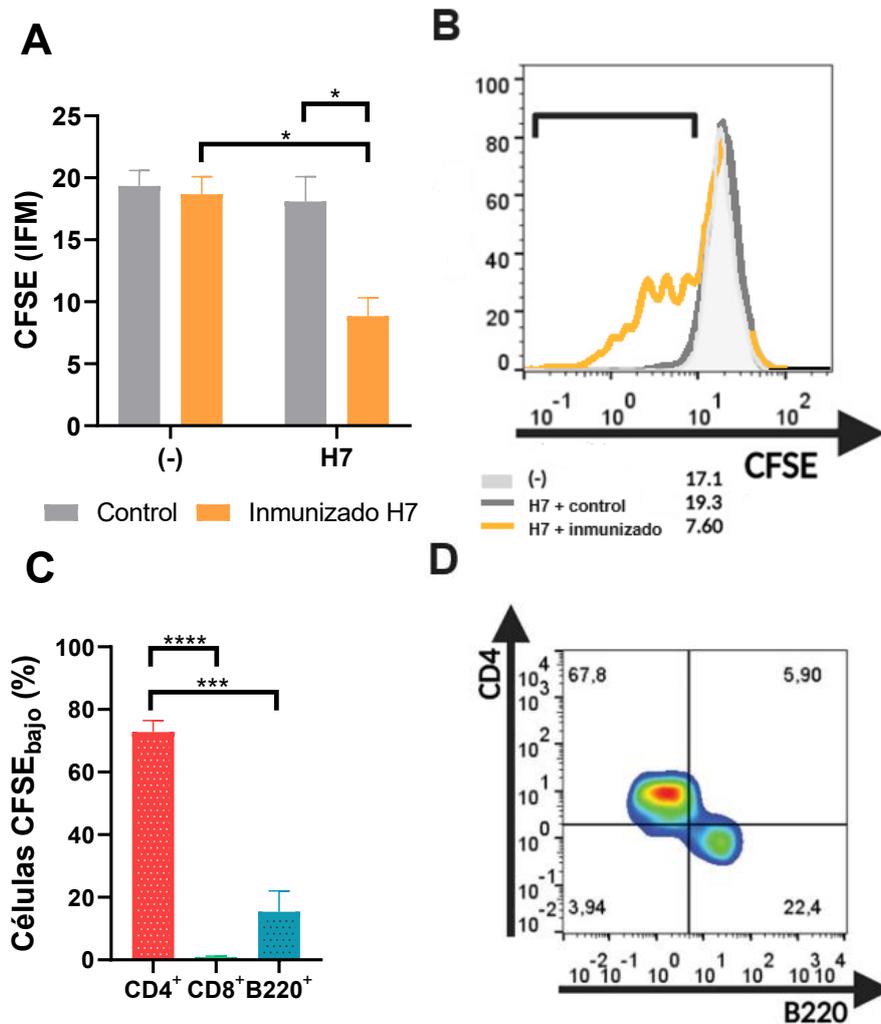
En los sobrenadantes de BMDC estimuladas con H7 se observó la secreción de IL-6 e IL-12 p70, pero no de TNF- $\alpha$ , en comparación con las BMDC sin estimular (-). Sin embargo, las concentraciones alcanzadas luego de la estimulación con H7 fueron significativamente menores en comparación con las obtenidas luego de la estimulación con LPS para todas las citoquinas evaluadas. Estos resultados son consistentes con la activación de BMDC murinas con flagelina a través del TLR5, según reportes previos [Hayashi y col., 2001; Bates y col., 2009].

## 12.2. Evaluación de la memoria inmunológica en ratones inmunizados con H7.

Un mes después de completado el esquema de inmunización, evaluamos la memoria inmunológica específica generada por la H7. Se realizaron ensayos de proliferación *ex vivo* con los leucocitos obtenidos de los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglio mediastínico) de los animales inmunizados. Las BMDC fueron estimuladas o no con H7 por 24 h, y se enfrentaron con leucocitos provenientes del bazo y del ganglio mediastínico tal como se detalló en Materiales y métodos.

### 12.2.1. Proliferación específica de esplenocitos de ratones inmunizados con H7.

Luego de los 5 días de cultivo mixto, las células fueron recogidas, centrifugadas e incubadas con anticuerpos que permiten identificar a linfocitos T y B, para determinar que subpoblación de linfocitos proliferó específicamente. A su vez, la proliferación se determinó como la disminución de la IFM para el CFSE (IFM-CFSE).



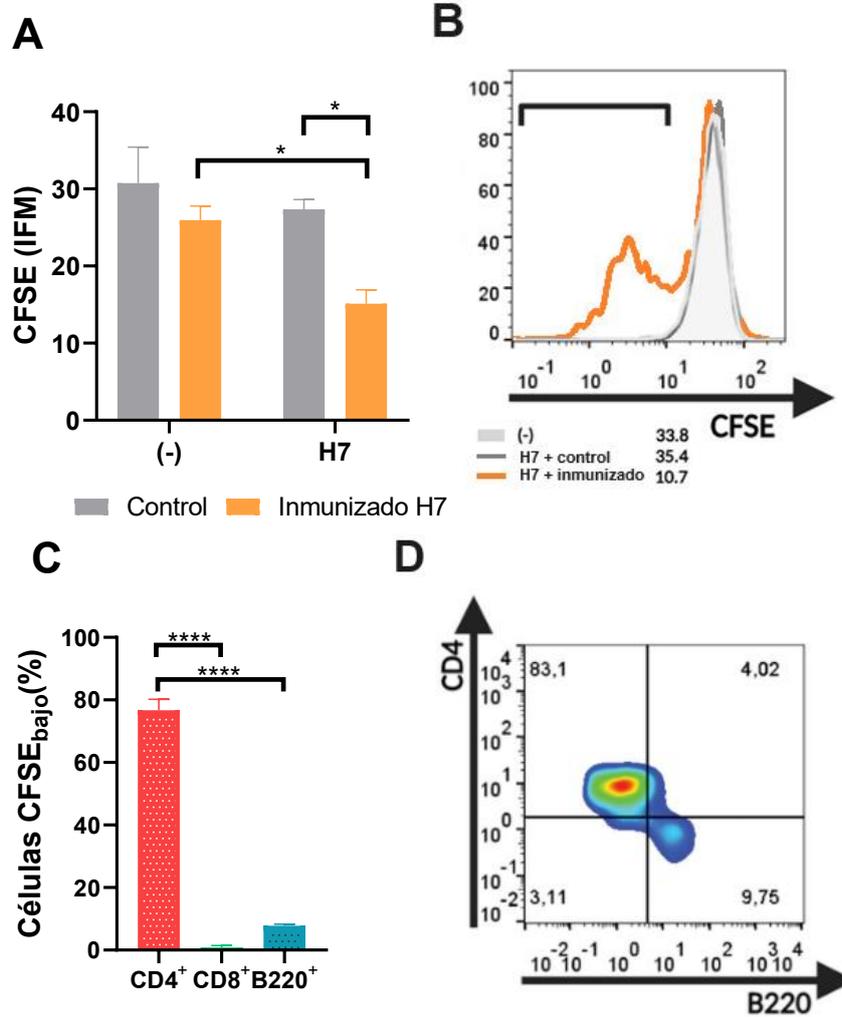
**Figura 40. Proliferación específica de linfocitos de bazo.** (A) Esplenocitos provenientes de ratones controles o inmunizados fueron teñidos con CFSE e incubados durante 5 días con BMDC estimuladas con H7 o sin estimular (como controles negativos). La proliferación específica se determinó como un descenso en la IFM-CFSE. (B) Histograma representativo de leucocitos de un ratón inmunizado (línea naranja) o de un ratón control (línea gris) incubados con BMDC estimuladas con H7; también se representa con el histograma relleno color gris claro leucocitos incubados con BMDC sin estimular. (C) Los esplenocitos fueron incubados con anti-CD4 PE-Cy5, anti-CD8 PE y anti-B220 PE-Cy7 y se cuantificó el % de cada subpoblación dentro de los leucocitos con baja expresión de IFM-CFSE en los ratones inmunizados. (D) Dot-plot representativo de la

expresión de los marcadores CD4 vs B220 en la superficie de los linfocitos en proliferación. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor (**C**) o de dos factores (**A**) seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles e inmunizados. Este experimento es representativo de 3 réplicas biológicas.

Las figuras 40A y B muestran que los esplenocitos de ratones inmunizados incubados con BMDC estimuladas con H7 (BMDC-H7) presentaron una IFM-CFSE significativamente menor que la IFM-CFSE correspondiente a esplenocitos de ratones controles. En la misma línea de evidencia, un mayor porcentaje de esplenocitos de ratones inmunizados incubados con BMDC-H7 mostraron una baja IFM-CFSE en comparación con los esplenocitos de ratones controles o luego de la incubación con BMDC control, sin H7 (-) [inmunizado + H7:  $40.4 \pm 5.4\% \#$ ; inmunizado + (-):  $8.6 \pm 2.9\% \#$ ; control + H7 :  $10.9 \pm 3.6\% \#$ ; control + (-):  $6.1 \pm 2.1\%$ ;  $n=3$ ;  $\#p < 0.001$ ]. En paralelo, los esplenocitos fueron incubados con anti-CD8, -CD4 y B-220 para determinar qué subpoblación de linfocitos prolifera luego de la incubación con BMDC-H7. Encontramos que los linfocitos T CD4+ fue la mayor subpoblación proliferando dentro de los esplenocitos de los ratones inmunizados, al menos al día 48 post primera dosis, momento en el cual se llevaron a cabo estos ensayos (Figuras 40C y D). Cabe destacar que no se observó una proliferación significativa después de la incubación de esplenocitos de ratones controles e inmunizados con BMDC no estimuladas, apoyando la especificidad de la respuesta proliferativa llevada a cabo por los linfocitos de memoria generados durante la inmunización.

#### *12.2.2. Proliferación específica de leucocitos provenientes del ganglio mediastínico de ratones inmunizados.*

Los mismos ensayos fueron realizados con los leucocitos obtenidos del ganglio mediastínico de ratones controles e inmunizados.

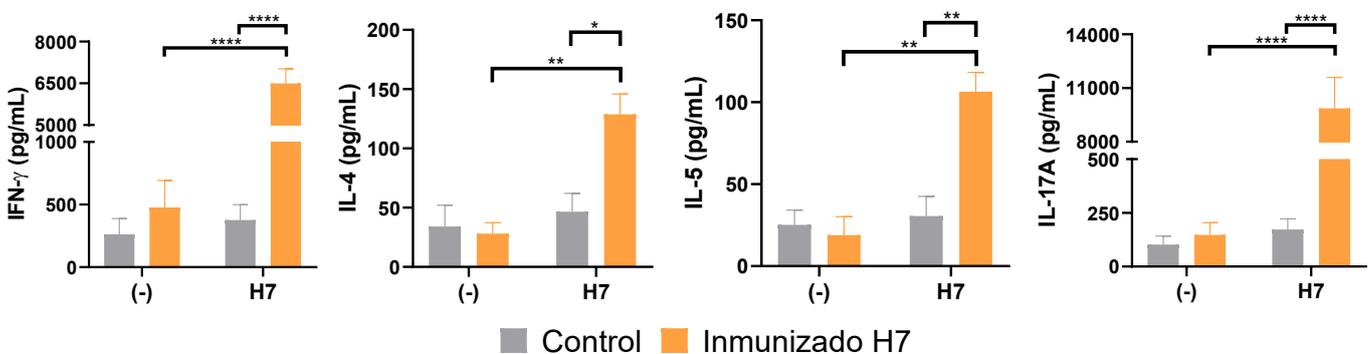


**Figura 41. Proliferación específica de linfocitos de ganglio.** (A) Los leucocitos de ganglios mediastínicos provenientes ratones controles o inmunizados y teñidos con CFSE fueron incubados con BMDC estimuladas o no con H7. La proliferación específica se determinó como un descenso en la IFM-CFSE. (B) Histograma representativo de leucocitos de un ratón inmunizado (línea naranja) o de un ratón control (línea gris) incubados con BMDC-H7; el histograma relleno color gris claro muestra leucocitos incubados con BMDC sin estimular. (C) Los leucocitos fueron incubados con anti-CD4 PE-Cy5, anti-CD8 PE y anti-B220 PE-Cy7 y se cuantificó el % de cada subpoblación dentro de los leucocitos con baja expresión de IFM-CFSE en los ratones inmunizados después de la incubación con BMDC-H7. (D) Dot-plot representativo de la expresión de los marcadores CD4 vs B220 en la superficie de los linfocitos en proliferación. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor (C) o de dos factores (A) seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles e inmunizados. Este experimento es representativo de 3 réplicas biológicas.

Encontramos que los leucocitos del ganglio mediastínico de ratones inmunizados incubados con BMDC-H7 muestran un descenso significativo en la IFM-CFSE en comparación a la IFM-CFSE correspondiente a leucocitos de ratones controles (Figuras 41A y B). A su vez, un mayor porcentaje de leucocitos de

ratones inmunizados incubados con BMDC-H7 mostraron una baja IFM-CFSE en comparación con los leucocitos de ratones controles o luego de la incubación con BMDC control, sin estimular con H7 (-) [inmunizado + H7:  $30.1 \pm 11.0\%^*$ ; inmunizado + (-):  $9.0 \pm 5.1\%^*$ ; control + H7:  $8.9 \pm 6.2\%^*$ ; control + (-):  $4.7 \pm 4.6\%$ ;  $n=3$ ;  $*p<0.05$ ]. Dentro de los leucocitos con baja IFM-CFSE, encontramos que los linfocitos T CD4+ era la mayor subpoblación proliferando en los ganglios de los ratones inmunizados (Figuras 41C y D). Estos resultados indican que, al igual que en bazo, los linfocitos T CD4+ de ratones inmunizados mostraron mayor proliferación después de la incubación con BMDC-H7 en comparación a los linfocitos obtenidos del ganglio mediastínico de ratones controles. Tampoco se observó una proliferación significativa después de la incubación de leucocitos de ratones controles e inmunizados con BMDC no estimuladas.

### 12.2.3. Perfil de citoquinas liberadas en los cultivos mixtos por linfocitos T activados de bazo.

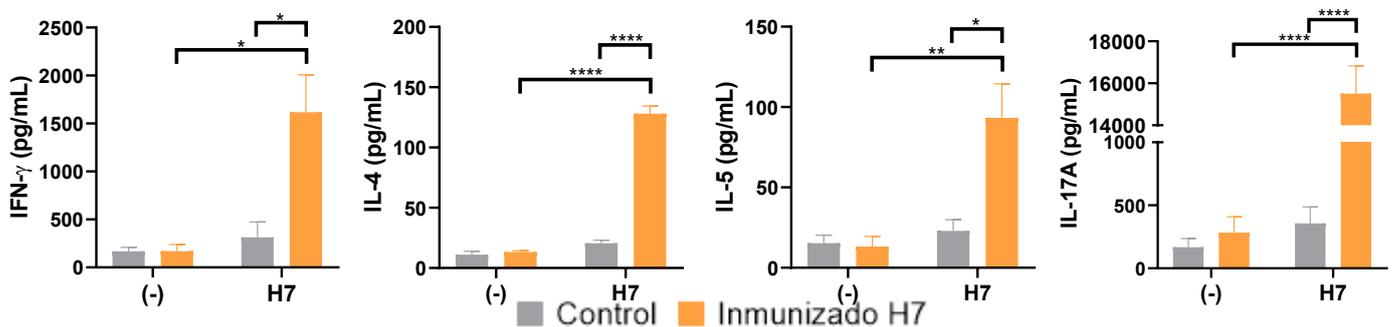


**Figura 42. Citoquinas producidas por los linfocitos de bazo en proliferación.** Se recogieron los sobrenadantes del cultivo mixto de esplenocitos y BMDC descritos en los párrafos anteriores para determinar la concentración de **IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-17A** mediante ELISAs comerciales. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey.  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $****p<0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles e inmunizados. Este experimento es representativo de 3 réplicas biológicas.

El perfil de la inmunidad mediada por células se determinó midiendo la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-17A, citoquinas efectoras de linfocitos Th1, Th2 y T17, respectivamente, en los sobrenadantes de los cultivos mixtos arriba

detallados (Figura 42). Los sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo mixto de los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con las BMDC-H7 tuvieron concentraciones significativamente más altas de IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- $\gamma$  que los sobrenadantes de cultivos de estos esplenocitos incubados con BMDC no estimuladas y que los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de ratones controles incubados con BMDC estimuladas. Estos resultados confirman la existencia de una respuesta celular específica hacia la H7 en los animales inmunizados y sugieren la presencia de un perfil de respuesta T mixto Th1/Th2/Th17. Los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de ratones controles incubados con BMDC estimuladas o no con H7 mostraron concentraciones similarmente bajas.

#### 12.2.4. Perfil de citoquinas liberadas en los cultivos mixtos por linfocitos T activados de ganglio mediastínico.



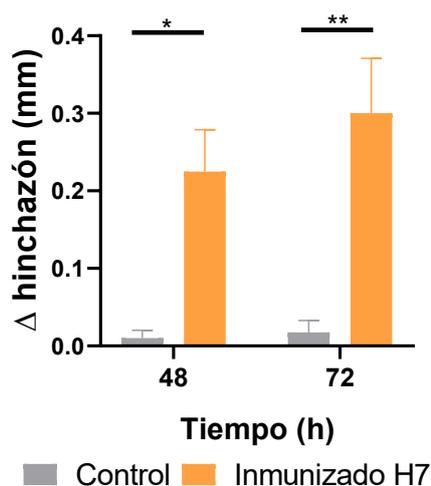
**Figura 43. Citoquinas producidas por los linfocitos de ganglio en proliferación.** Se recogieron los sobrenadantes del cultivo mixto de leucocitos de ganglio mediastínico y BMDC, referidos en los párrafos anteriores para medir la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-17A mediante ELISAs comerciales. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones controles e inmunizados. Este experimento es representativo de 3 réplicas biológicas.

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de los leucocitos del ganglio de ratones inmunizados incubados con BMDC-H7 tuvieron concentraciones significativamente más altas de todas las citoquinas evaluadas respecto de su propio control de cultivo con BMDC sin estimular y respecto a los sobrenadantes obtenidos a partir de leucocitos de ratones controles incubadas con BMDC-H7.

Los sobrenadantes de cultivo de leucocitos de ratones controles incubados con BMDC estimuladas o no con H7 mostraron concentraciones similares de todas las citoquinas evaluadas. Los resultados obtenidos sugieren, al igual que los alcanzados en bazo, especificidad de la respuesta celular hallada frente a la H7 y la presencia de un perfil T helper mixto Th1/Th2/Th17 en los ratones inmunizados con esta proteína.

#### 12.2.5. Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH).

La respuesta celular específica también fue evaluada *in vivo* mediante DTH a los 2 meses de completado el esquema de inmunización. Se inoculó en la almohadilla plantar derecha H7, mientras que en la almohadilla plantar izquierda solo vehículo. La reacción inflamatoria se determinó a 48 y 72 h post inoculación como la diferencia en la hinchazón entre ambas almohadillas plantares.



**Figura 44. Ensayo de DTH en ratones controles e inmunizados.** A 2 meses de finalizado el esquema de inmunización, se inoculó en la almohadilla plantar derecha de ratones controles o inmunizados 5  $\mu$ g de H7, mientras que en la almohadilla plantar izquierda solo vehículo. A las 48 y 72 h se midió la diferencia en la hinchazón entre la almohadilla plantar derecha e izquierda ( $\Delta$  hinchazón) en ratones controles e inmunizados tal como se describe en Materiales y métodos. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 5 ratones controles e inmunizados.

Como se muestra en la figura 44, se observa un  $\Delta$  hinchazón significativo en los ratones inmunizados respecto de los ratones controles a ambos tiempos. Este

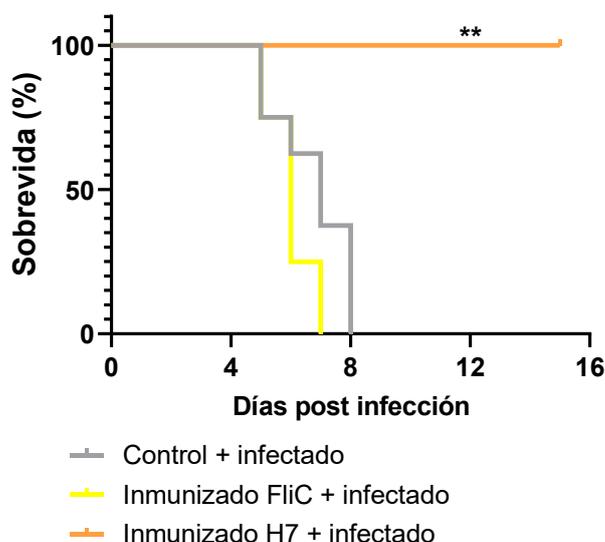
resultado indica que una respuesta T de memoria sistémica eficiente se ha generado a partir de la inmunización intranasal con H7.

### **13. DESAFÍO CON STEC O157:H7 EN RATONES INMUNIZADOS CON H7, FLIC Y CONTROLES.**

Una vez caracterizada la respuesta inmune humoral y celular, decidimos llevar a cabo el desafío infeccioso para evaluar la protección contra la enfermedad sistémica secundaria a las infecciones con STEC O157:H7.

#### **13.1. Evaluación de la mortalidad.**

El grupo inmunizado con H7 y los controles (FliC y ratones sin inmunizar) fueron desafiados por vía oral con una dosis letal de la cepa pW ( $5 \times 10^5$  UFC/ratón) después de 3 semanas de finalizado el esquema de inmunización.



**Figura 45. Desafío con pW en ratones controles o inmunizados con FliC o H7.** Ocho ratones controles, 8 ratones inmunizados con FliC y 9 ratones inmunizados con H7 fueron desafiados con  $5 \times 10^5$  UFC de pW/ratón 3 semanas después de completado el esquema de inmunización, previa sensibilización con ampicilina tal como se detalla en Materiales y métodos. Los ratones fueron observados diariamente para evaluar su morbi-mortalidad. **Curvas de supervivencia.** Los datos fueron analizados con la prueba de Mantel-Cox hallándose diferencias significativas.  $**p < 0.01$ .

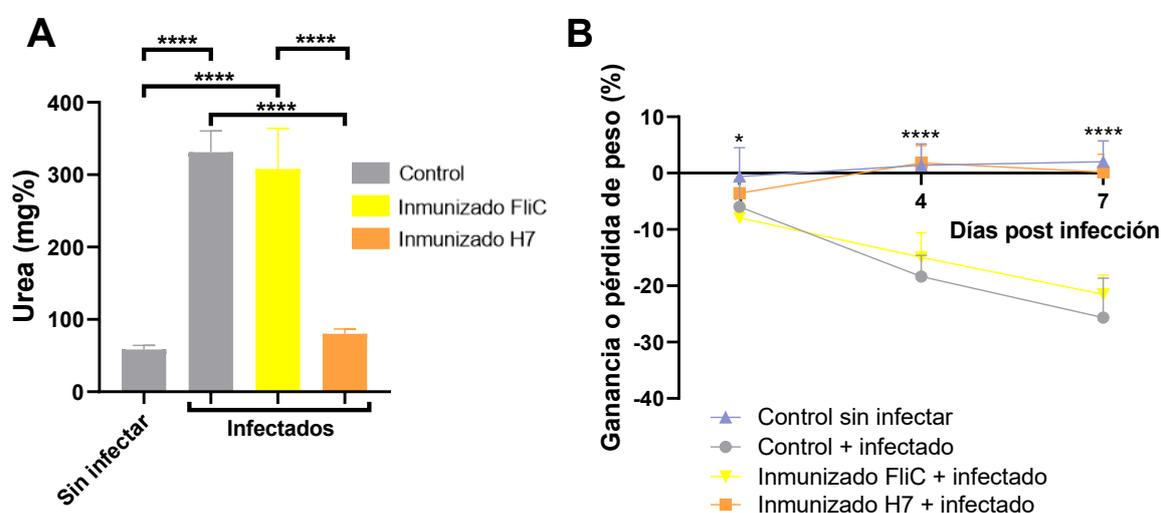
En la figura 45 se representan las curvas de supervivencia, expresadas de manera porcentual, en todos los grupos. Se puede observar que el 100% de los animales no inmunizados (controles) o inmunizados con un flagelo no relacionado

como FliC muere al cabo de 5-8 días p.i. (0% sobrevivida), mientras que el 100% de los ratones inmunizados con H7 se encuentran vivos hacia el día 15 p.i., siendo esta diferencia en las curvas de sobrevivida significativa.

## 13.2. Evaluación de parámetros bioquímicos y clínicos.

### 13.2.1. Determinación de urea plasmática y seguimiento del peso diario p.i.

Además de la sobrevivida, se determinó diariamente el peso de los ratones como un parámetro clínico indicador de morbi-mortalidad y al día 7 p.i. la concentración de urea plasmática como un indicador de daño renal.



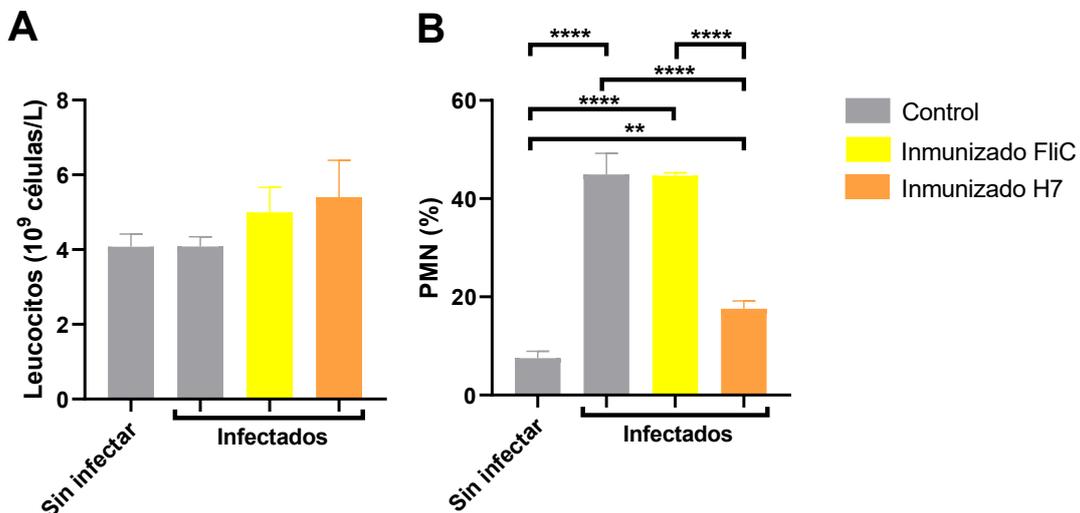
**Figura 46. Parámetros bioquímicos y clínicos en ratones inmunizados o no p.i.** Los ratones BALB inmunizados con FliC, H7 o sin inmunizar e infectados con pW fueron pesados diariamente y sangrados al 7mo día p.i. para determinar **(A) la concentración de urea plasmática y (B) la ganancia o pérdida porcentual de peso respecto al peso inicial.** El peso fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial en todos los tiempos. Los datos fueron analizados por un ANOVA de un factor **(A)** o de dos factores **(B)** con un post test de Tukey. Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones BALB controles (sin inmunizar y sin infectar), de 4 ratones controles e infectados, de 3 ratones inmunizados con FliC e infectados y de 9 ratones inmunizados con H7 e infectados. **(A)** \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; **(B)** \* $p < 0.05$  control sin infectar vs Inmunizado FliC + infectado, \*\*\*\* $p < 0.0001$  controles sin infectar e inmunizado H7 + infectado vs Inmunizado FliC + infectado y control + infectado al día 4 y 7 p.i.

Como puede observarse en la figura 46A, los ratones inmunizados con H7 e infectados con pW muestran niveles de uremia significativamente menores

respecto de los grupos controles (ratones sin inmunizar o inmunizados con FliC) infectados con pW, siendo la concentración plasmática de urea similar a la de los ratones controles sin infectar. En cuanto al peso (Figura 46B), se puede ver que todos los ratones infectados independientemente del tratamiento muestran un leve descenso del peso en el día 1 p.i. Los ratones inmunizados con H7 e infectados no muestran grandes variaciones de su peso, el cual se mantiene bastante estable durante la duración de los experimentos y semejante al control sin infectar. Sin embargo, los grupos controles infectados muestran una pérdida progresiva del peso hasta su muerte, siendo dicha pérdida significativa a los días 4 y 7 p.i. respecto de los ratones controles sin infectar y de los ratones inmunizados con H7 infectados.

### 13.2.2. Determinación del recuento total y diferencial de leucocitos.

Al día 7 p.i. se determinó en sangre entera el recuento total y diferencial de leucocitos para evaluar la presencia de leucocitosis y neutrofilia en los ratones BALB infectados, tanto en los inmunizados como en los controles, como indicadores de mal pronóstico asociados a progresión a SUH.



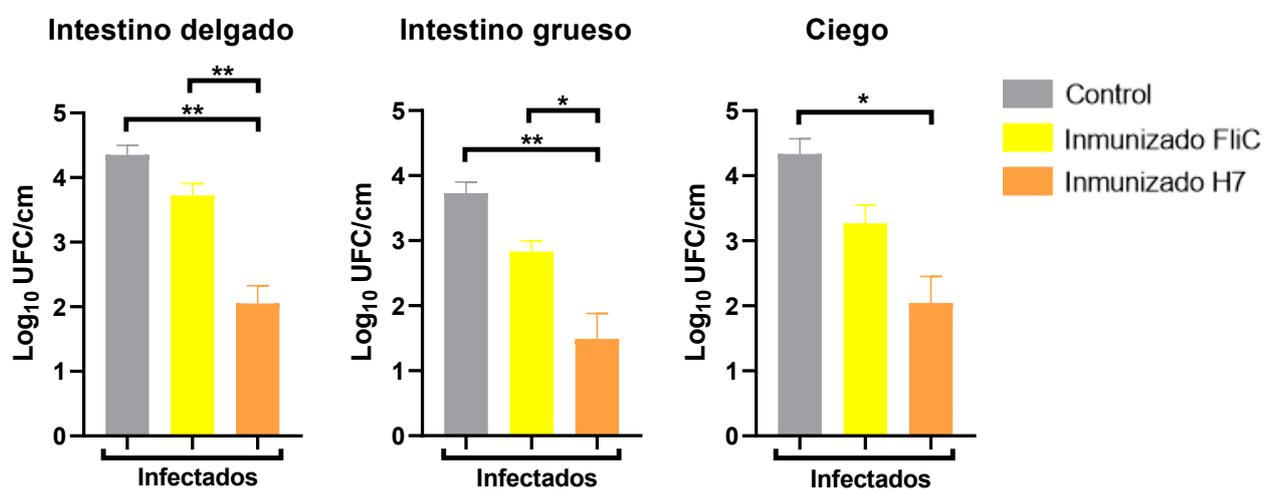
**Figura 47. Recuento total y diferencial de leucocitos en ratones BALB controles o inmunizados e infectados con pW.** Los ratones fueron sangrados al 7mo día p.i. para determinar en sangre entera (A) el recuento total de leucocitos y (B) el porcentaje de PMN. Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 4 ratones BALB controles (sin infectar y sin inmunizar), 4 ratones

controles e infectados, 3 ratones inmunizados con FliC e infectados y 9 ratones inmunizados con H7 e infectados.

Como puede observarse en la figura 47A, ningún grupo experimental presenta leucocitosis al día 7 p.i., sin embargo, los grupos infectados controles (ratones sin inmunizar o inmunizados con FliC) presentan un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos (figura 47B) respecto de los ratones infectados inmunizados con H7 y de los controles sin infectar. También, puede observarse una leve neutrofilia en los ratones infectados inmunizados con H7 respecto de los controles sin infectar.

### 13.3. Colonización intestinal de pW.

Como la colonización de STEC O157:H7 es el primer paso en la cascada patogénica del SUH y los flagelos participan en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales intestinales, analizamos el nivel de colonización intestinal en ratones no inmunizados o inmunizados con H7 o FliC, luego de la infección. Se cuantificó el número de UFC de pW recuperado por cm de tejido intestinal al día 6 p.i.

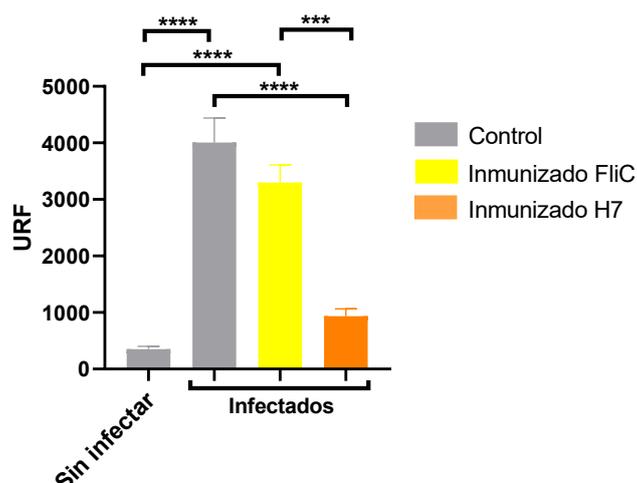


**Figura 48. Colonización intestinal después de la infección con pW.** Los ratones BALB inmunizados con H7 (n=5), con FliC (n=4) o no inmunizados (n=3) fueron eutanasiados a los 6 días p.i. para determinar la colonización en el intestino delgado, intestino grueso y ciego. Los gráficos representan las UFC de pW/cm de cada segmento intestinal. Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01. Cada barra muestra la media ± SEM de 3-5 ratones para cada tratamiento.

Los ratones inmunizados con H7 mostraron un número significativamente menor de UFC/cm recuperadas de los tres segmentos intestinales en comparación con los ratones no inmunizados y con los ratones inmunizados con FliC (Figura 48). Por el contrario, los ratones inmunizados con FliC no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de colonización en cualquiera de los 3 segmentos intestinales analizados en comparación con los ratones no inmunizados.

#### 13.4. Evaluación funcional de la barrera intestinal luego de la infección con pW.

Además de la colonización intestinal, evaluamos la permeabilidad de la barrera intestinal haciendo uso del ensayo de Dx-FITC en todos los grupos experimentales al día 6 p.i.



**Figura 49. Permeabilidad intestinal al día 6 p.i.** Todos los ratones BALB inmunizados con H7 (n=5), con FliC (n=4) o no inmunizados (n=3) e infectados, así como también el control sin inmunizar y sin infectar (n=3), recibieron por vía oral 100 µL de PBS conteniendo Dx-FITC (80 g/L). Después de 4 h de tratamiento, los ratones fueron sangrados para determinar las URF en plasma. Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Cada barra muestra la media ± SEM de 3-5 ratones para cada tratamiento.

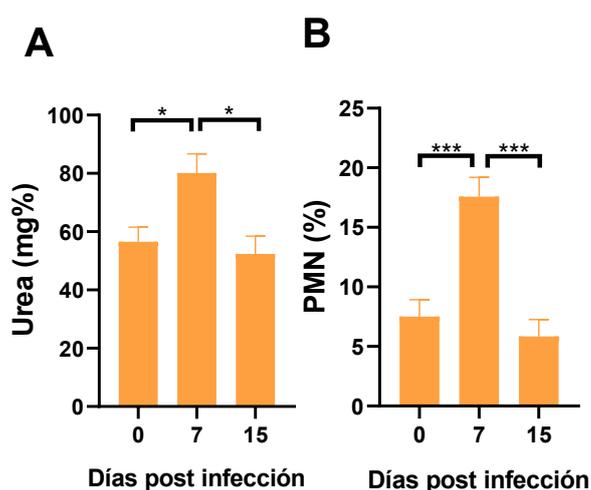
Tanto los ratones controles sin inmunizar como los inmunizados con FliC, mostraron en plasma una mayor concentración de Dx-FITC en comparación con los ratones inmunizados con H7 y con los ratones controles sin infectar al día 6

p.i. (Figura 49). Además, cabe mencionar que los ratones inmunizados con H7 e infectados mostraron niveles de Dx-FITC en plasma similares a los ratones controles sin infectar. Estos resultados nos permiten proponer que una menor colonización en este grupo experimental se traduce en un menor daño epitelial.

### 13.5. Evaluación de los ratones inmunizados con H7 sobrevivientes al desafío infeccioso.

#### 13.5.1. Parámetros bioquímicos y clínicos.

A los ratones inmunizados con H7 e infectados se les tomó una última muestra de sangre para determinar la concentración de urea en plasma y el porcentaje de neutrófilos, al día 15 p.i. con pW, momento en el cual fueron eutanasiados.



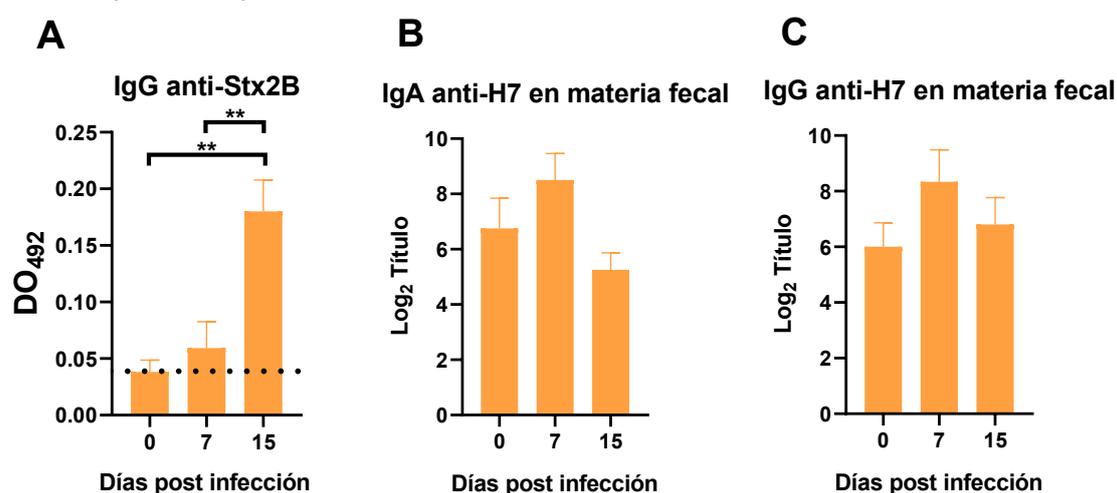
**Figura 50. Evolución de los ratones inmunizados con H7 después de la infección con STEC O157:H7 pW.** Los ratones sobrevivientes fueron sangrados el día 7 y 15 p.i. Los datos de los parámetros bioquímicos y clínicos se compararon con valores previos a la infección (día 0). (A) **Niveles de nitrógeno ureico en sangre.** (B) **Porcentaje de PMN.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. Cada barra muestra la media ± SEM de 9 ratones a cada tiempo indicado.

Como se puede ver en la figura 50, los ratones inmunizados con H7 e infectados presentan valores aumentados tanto en la concentración de urea plasmática (aunque no patológico) como en el porcentaje de PMN, al día 7 p.i, que es estadísticamente significativo respecto de los valores basales obtenidos al día 0. Ambos parámetros se normalizan hacia el día 15 p.i., momento en el cual no se

hallan diferencias significativas en comparación con la condición basal. Estos resultados podrían indicar que al día 7 los ratones se encuentran atravesando un proceso agudo de la infección que resuelve hacia el día 15 p.i.

### 13.5.2. Análisis de la respuesta inmune humoral.

Finalmente, se evaluó en los ratones inmunizados con H7 e infectados la capacidad de montar una respuesta inmune específica contra otros factores de virulencia relevantes en la patogénesis de STEC O157:H7, tal como la presencia de anticuerpos anti-Stx2B a 7 y 15 días p.i. También, a los mismos tiempos se determinó el título de IgG e IgA anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal para ver si la infección actúa como un refuerzo o, por el contrario, se ve un consumo de anticuerpos, reflejado en el descenso de los títulos.



**Figura 51. Respuesta inmune humoral de los ratones inmunizados con H7 después de la infección con pW.** Los ratones sobrevivientes fueron sangrados al día 7 y 15 p.i. Los niveles de anticuerpos anti-Stx2B y los títulos de anticuerpos anti-H7 en materia fecal se compararon con valores previos a la infección (día 0). **(A) Niveles de IgG específica anti-Stx2B** medidos en plasma (dilución 1/10) mediante ELISA, expresados como DO<sub>492</sub>. La línea punteada indica el nivel de IgG anti-Stx2B en ratones sin inmunizar y sin infectar. **Título de IgA (B) e IgG anti-H7 (C) en sobrenadantes de materia fecal medidos por ELISA.** Los datos fueron analizados con un ANOVA de un factor con un post test de Tukey. \*\*p<0.01. Cada barra muestra la media del título de anticuerpos ± SEM de 9 ratones a cada tiempo indicado, expresado como el logaritmo en base 2 (Log<sub>2</sub>).

Los ratones inmunizados con H7 sobrevivientes al desafío con pW presentan un aumento significativo de los niveles de anticuerpos anti-Stx2B a los 15 días p.i. en plasma en comparación con el día 0 y el día 7 p.i. (Figura 51A), lo que indica que la infección permite generar una respuesta inmune específica contra otros factores de virulencia relevantes, pero la inmunización con H7 previno la progresión a SUH. Esto es importante para tener una mejor respuesta protectora en caso de existir una segunda infección. Además, los niveles de IgA e IgG anti-H7 en materia fecal en ratones inmunizados p.i. fueron similares a los observados previos a la infección (día 0), lo que sugiere que estos anticuerpos no fueron agotados por la opsonización bacteriana durante el curso de la infección con pW.

#### **14. INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INFECCIONES POR STEC.**

Los factores genéticos juegan un rol fundamental en la susceptibilidad a diversas infecciones, aunque no son los únicos. También participan factores epigenéticos, entre los que se incluye la composición de la microbiota, que tiene un papel relevante en la protección frente a patógenos

Para determinar si alteraciones en la microbiota intestinal podían afectar la progresión a SUH a partir de la infección experimental con cepas STEC O157:H7, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: en el primero se realizó un intercambio de crías para favorecer que crías C57 recién nacidas se colonizaran con la microbiota de una nodriza BALB, y crías BALB recién nacidas se colonizaran con la microbiota de una nodriza C57. En el segundo experimento, evaluamos el efecto directo de una disbiosis en la evolución a SUH en ratones BALB y C57 mediante la administración de un antibiótico de amplio espectro.

##### **14.1. Intercambio de crías.**

Con el propósito de evaluar si la diferencia en la mortalidad entre las cepas murinas BALB y C57 frente a un desafío infeccioso con STEC O157:H7 estaba asociada a la composición de la microbiota de cada cepa, se llevó a cabo el

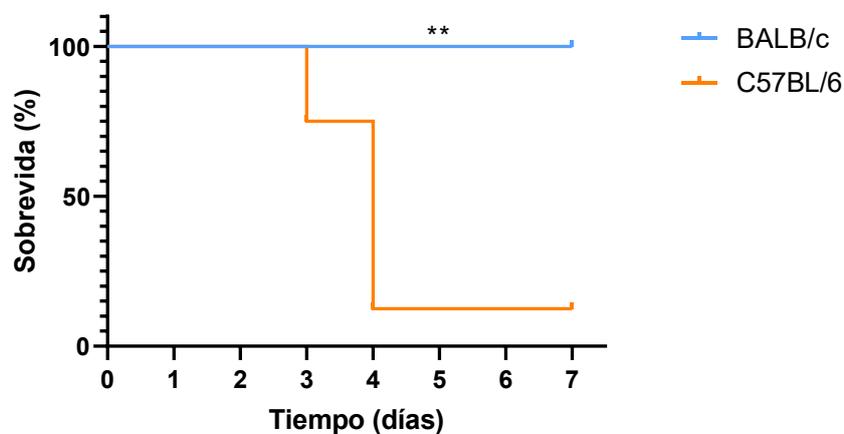
intercambio de crías en el momento del nacimiento. De esta manera, la cría BALB se colonizará con la microbiota de la nodriza C57 y viceversa.



**Imagen 13. Fotografías de nodriza BALB con crías C57 y nodriza C57 con crías BALB.** Tomadas por la bioterista del Instituto al día 10 post nacimiento por fuera de la cabina de seguridad biológica de tipo IIA, se puede observar a las crías conviviendo con sus nodrizas.

#### 14.1.1. Evaluación de la mortalidad de ratones BALB y C57 frente al desafío con la STEC O157:H7 en el modelo de intercambio de crías.

Ratones BALB y C57 a la edad del destete fueron desafiados con una única dosis bacteriana de la cepa STEC O157:H7 para evaluar la susceptibilidad frente a la infección.



**Figura 52. Curvas de supervivencia de ratones BALB y C57 infectados con la STEC O157:H7 en el modelo de intercambio de crías.** 6 ratones BALB y 8 ratones C57 fueron infectados seguidamente

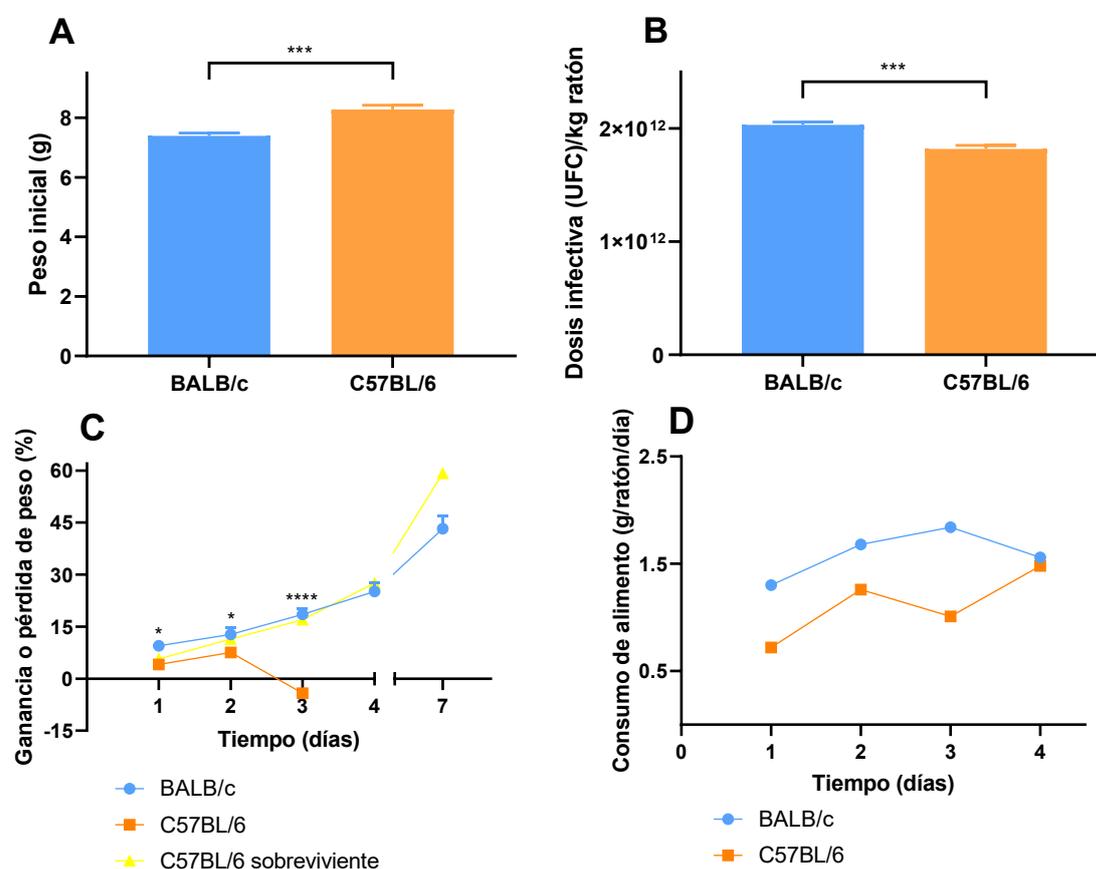
del destete con una dosis infectiva igual a  $1,5 \times 10^{11}$  UFC/mL. Los datos fueron analizados por la prueba de Mantel-Cox.  $**p < 0.01$ .

En la figura 52 se puede ver que el 87,5% de los ratones C57 murió en un lapso de 4 días, mientras que ninguna cría BALB murió dentro de los 7 días que duró el ensayo (0% mortalidad). Las curvas de supervivencia mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre sí.

#### 14.1.2. Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con STEC O157:H7.

##### 14.1.2.1. Ganancia o pérdida de peso y consumo de alimento p.i.

Desde el momento del destete y diariamente p.i. se registró el peso de los animales. A su vez, el peso diario del alimento antes y después de la infección también fue registrado como consumo de alimento. Para evaluar si el peso inicial de los ratones al momento de la infección pudiera llegar a influenciar la evolución de estos, se incorporó al análisis dos nuevos gráficos que muestran si hay diferencias en el peso inicial de los animales previo a la infección y/o en la dosis infectiva administrada/kg ratón.



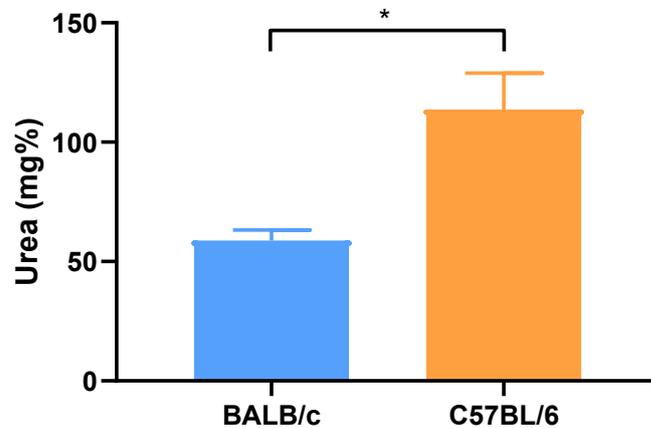
**Figura 53. Parámetros clínicos analizados: peso y consumo de alimento.** Los ratones infectados fueron pesados diariamente p.i., al igual que su alimento. El peso a cada tiempo fue expresado de manera porcentual teniendo en cuenta el peso inicial y el consumo de alimento fue registrado teniendo en cuenta el peso del alimento del día anterior y la cantidad de ratones vivos en cada tiempo. Los datos en **A y B** fueron analizados por una prueba T paramétrica de Student. **(A) Peso inicial previo a la infección.** \*\*\* $p < 0.001$ . **(B) Dosis infectiva acorde al peso inicial de los ratones (UFC/kg ratón).** \*\*\* $p < 0.001$ . **(C) Ganancia o pérdida porcentual de peso.** Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos factores con un post test de Tukey. Los porcentajes del ratón C57 sobreviviente son representados esquemáticamente, pero no son tomados en cuenta para el análisis estadístico. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 6 ratones BALB y 8 ratones C57. **(D) Consumo de alimento.**

Como puede observarse en la figura 53A, los ratones BALB presentaban un peso inicial significativamente menor al de los ratones C57. Por lo tanto y como puede observarse en la figura 53B, los ratones BALB recibieron una dosis bacteriana estadísticamente mayor que los ratones C57. A pesar de esto, los ratones BALB mostraron un aumento porcentual de peso en los días 1, 2 y 3 p.i. significativamente mayor respecto a los ratones C57 infectados (Figura 53C). Todos los ratones C57 que se encontraban moribundos, mostraron un abrupto descenso de peso al día 3, a diferencia del único ratón C57 que sobrevivió.

En cuanto al consumo de alimento, no se pudo aplicar la estadística en ningún tiempo para evaluar si existían diferencias entre los distintos grupos debido a que por la complejidad del diseño experimental y lo claro del resultado, sólo se realizó una vez. Sin embargo, puede verse que en los días 1 y 2 p.i. hay un aumento en consumo, que desciende al día 3 en los ratones C57 infectados a comparación de los ratones BALB; debido probablemente a que los ratones C57 que se encuentran padeciendo el curso de la enfermedad sistémica han dejado de comer. Al día 4 p.i., el consumo de los ratones BALB infectados, así como del ratón C57 infectado que logra sobrevivir se equipara (Figura 53D).

#### 14.1.2.2. Determinación de la concentración de urea plasmática.

Los ratones infectados fueron sangrados al día 3 p.i. para conocer la concentración de urea plasmática y, a través de ella, la función renal de los ratones infectados.

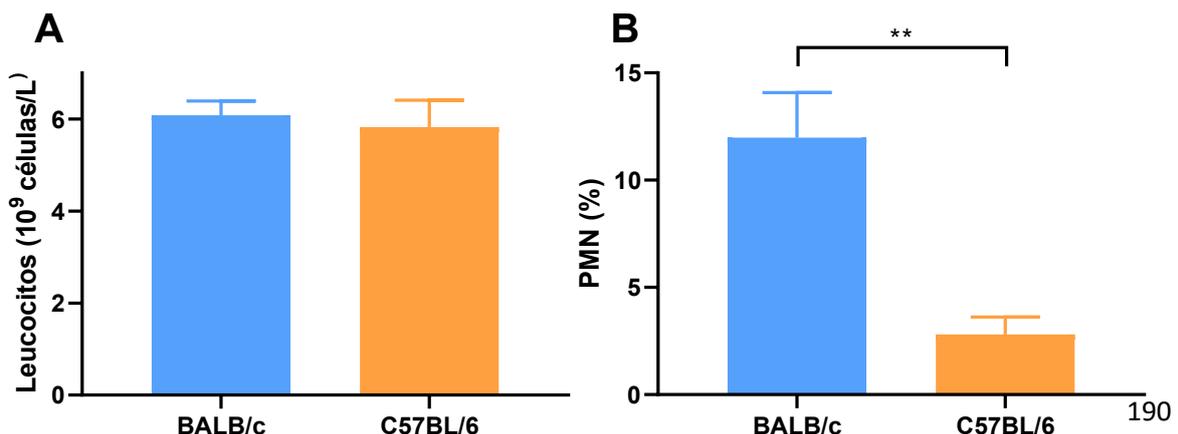


**Figura 54. Concentración plasmática de urea.** Los ratones infectados con una dosis bacteriana de STEC O157:H7 igual a  $1,5 \times 10^{11}$  UFC/mL fueron sangrados al día 3 p.i. Los datos fueron analizados por una prueba T de Student. \* $p < 0.05$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 6 ratones BALB y 8 ratones C57.

Como se ve en la Figura 54, los ratones C57 infectados exhiben una concentración de urea plasmática más elevada, patológica y estadísticamente significativa al ser comparada con la obtenida en los ratones BALB infectados. Por su parte, los ratones BALB infectados muestran niveles de urea similares a los controles en experimentos detallados anteriormente.

#### 14.1.2.3. Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre periférica.

Los ratones BALB y C57 fueron sangrados al día 3 p.i. para determinar en sangre entera el recuento total de leucocitos y el porcentaje de PMN.



**Figura 55. Recuento total y diferencial de leucocitos.** Los ratones infectados fueron sangrados al 3er día p.i. para determinar el recuento total de leucocitos y el porcentaje de PMN en sangre entera. **(A) Número absoluto de leucocitos. (B) Porcentaje de PMN.** Los datos en **A y B** fueron analizados por una prueba T de Student. \*\* $p < 0.01$ . Cada barra muestra la media  $\pm$  SEM de 6 ratones BALB y 8 ratones C57.

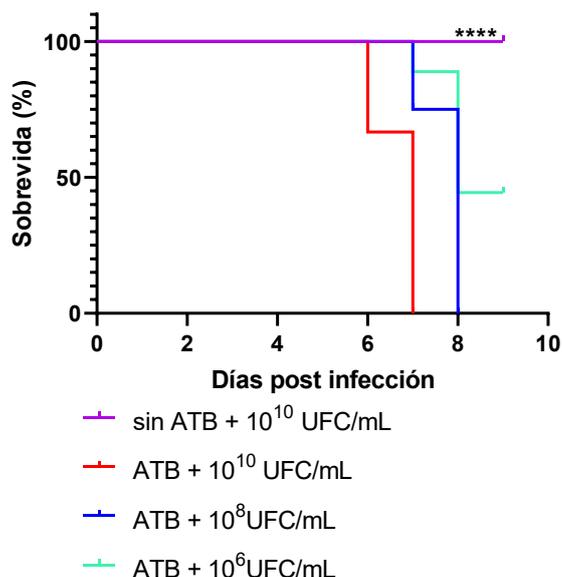
Tanto los ratones BALB como C57 infectados no muestran leucocitosis ni tampoco neutrofilia. No obstante, se ve un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de PMN en la sangre periférica de los ratones BALB comparado con los ratones C57 infectados.

A partir de esta aproximación experimental y teniendo en cuenta sus limitaciones, los resultados sugieren que la diferencia en la susceptibilidad de los ratones BALB y C57 a la infección con STEC O157:H7 no se debería a diferencias en la composición de la microbiota asociada a cada una de las cepas murinas.

#### **14.2. Efecto de la disbiosis inducida en la progresión a SUH en ratones BALB y C57.**

Para evaluar en forma directa la relevancia de la microbiota en las infecciones por STEC O157:H7, ratones adultos de ambas cepas (6-8 semanas) fueron tratados con ampicilina para generar una disbiosis. Los ratones fueron divididos al azar en distintos grupos que recibieron distintas dosis de la cepa pW, abarcando un rango de infección desde  $10^6$  UFC/mL hasta  $10^{10}$  UFC/mL. Cabe destacar que se utilizaron ratones adultos para analizar la dependencia de la microbiota en un contexto donde ambas cepas murinas sobreviven a la infección con cepas STEC O157:H7.

#### 14.2.1. Evaluación de la sobrevida en ratones BALB tratados con ampicilina e infectados.

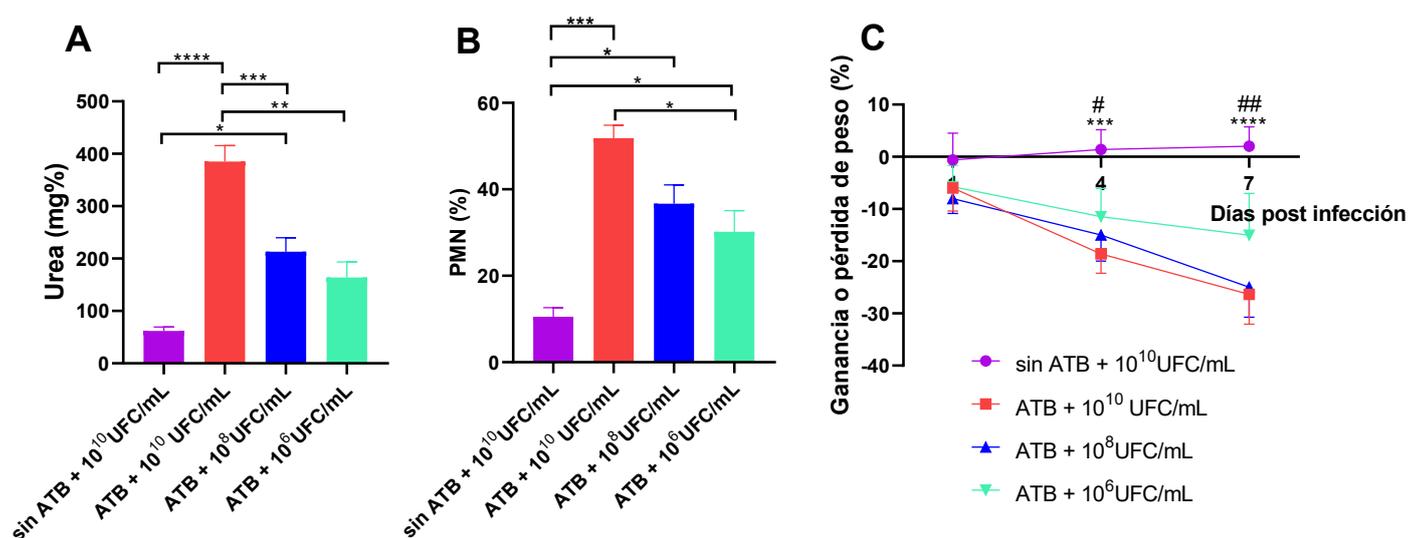


**Figura 56. Curvas de sobrevida de ratones BALB adultos tratados con ampicilina (ATB) e infectados con distintas dosis de pW.** Ratones BALB (n=4-9 según grupo) fueron administrados de 2 dosis de ATB e infectados con las dosis de pW que se indican en la leyenda de la figura, según se detalla en Materiales y métodos. Los datos fueron analizados por la prueba de Mantel-Cox. \*\*\*\*p<0.0001 entre sin ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL vs ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL y ATB + 10<sup>8</sup> UFC/mL.

En la figura 56 se puede ver que el 100% de los ratones BALB tratados con ATB e infectados con dosis de pW de 10<sup>8</sup> y 10<sup>10</sup> UFC/mL murieron al cabo de 6-8 días p.i., mientras que el 100% de los ratones sin tratar con ATB e infectados con la dosis infectiva más alta testada sobrevivieron al desafío hasta el día 9 p.i., momento en el cual se finalizaron los experimentos. Los ratones tratados con ATB y que recibieron la dosis infectiva más baja presentan un 50% sobrevida. Las curvas de sobrevida obtenidas mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL y los grupos tratados con ATB + infectados con 10<sup>8</sup> y 10<sup>10</sup> UFC/mL. No se hallaron diferencias significativas entre ATB + 10<sup>6</sup> UFC/mL y ninguno de los otros grupos experimentales.

14.2.2. Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con la STEC O157:H7 pW en ratones BALB tratados con ATB.

Post infección, los ratones fueron observados diariamente para constatar su peso como indicador de morbi-mortalidad y al día 7 p.i. fueron sangrados para determinar en sangre entera el recuento porcentual de PMN y en plasma la concentración de urea.



**Figura 57.** Los ratones fueron pesados diariamente post infección y al día 7 sangrados para determinar los niveles de urea plasmática y el porcentaje de PMN en sangre entera. **(A) Concentración plasmática de urea. (B) Recuento diferencial de leucocitos. (C) Ganancia o pérdida de peso respecto del peso inicial.** Los datos fueron analizados por un ANOVA de un factor (en A y B) o de dos factores (en C) seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . // en figura C: \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  entre grupo sin ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL respecto de todos los restantes. # $p < 0.05$  entre ATB + 10<sup>6</sup> UFC/mL y ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL, ## $p < 0.01$  entre ATB + 10<sup>6</sup> UFC/mL vs ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL y ATB + 10<sup>8</sup> UFC/mL. Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4-8 ratones BALB según grupo experimental.

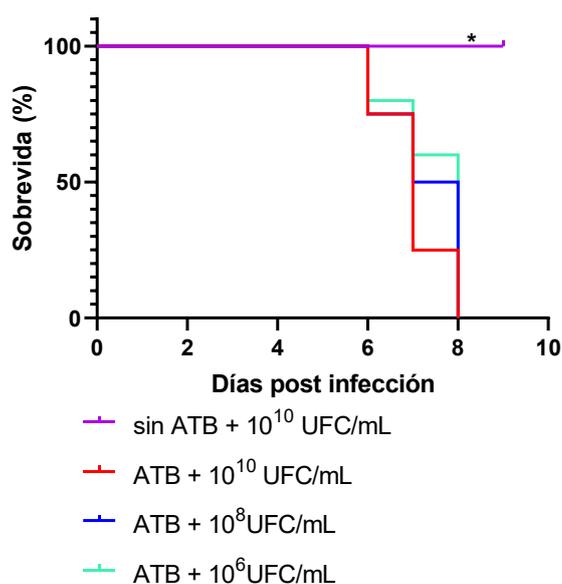
Como se muestra en la figura 57A, todos los grupos tratados con ATB e infectados muestran niveles patológicos de urea plasmática. Además, el grupo ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL presenta niveles de urea plasmática estadísticamente más elevados respecto de todos los otros grupos experimentales.

Se observa neutrofilia significativa en todos los grupos experimentales en comparación con el control sin ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL. Se observa también una diferencia significativa entre los grupos ATB + 10<sup>10</sup> UFC/mL y ATB + 10<sup>6</sup> UFC/mL (Figura 57B).

En cuanto al peso, se ve un descenso significativo en los grupos tratados con ATB respecto del control sin ATB +  $10^{10}$  UFC/mL al día 4 y 7 p.i. A su vez, dentro de los grupos que recibieron ATB se encuentran diferencias significativas a 4 días p.i. entre ATB +  $10^6$  UFC/mL y ATB +  $10^{10}$  UFC/mL, y a 7 días p.i. entre ATB +  $10^6$  UFC/mL vs ATB +  $10^{10}$  UFC/mL y ATB +  $10^8$  UFC/mL (Figura 57C).

En todos los parámetros analizados, se observa un efecto dosis-dependiente en el que los ratones que reciben una dosis infectiva mayor mueren con anterioridad con los niveles de urea plasmática más altos, así como también neutrofilia y mayor descenso de peso en comparación a los ratones infectados con las dosis más bajas.

#### 14.2.3. Evaluación de la sobrevida en ratones C57 tratados con ampicilina e infectados.



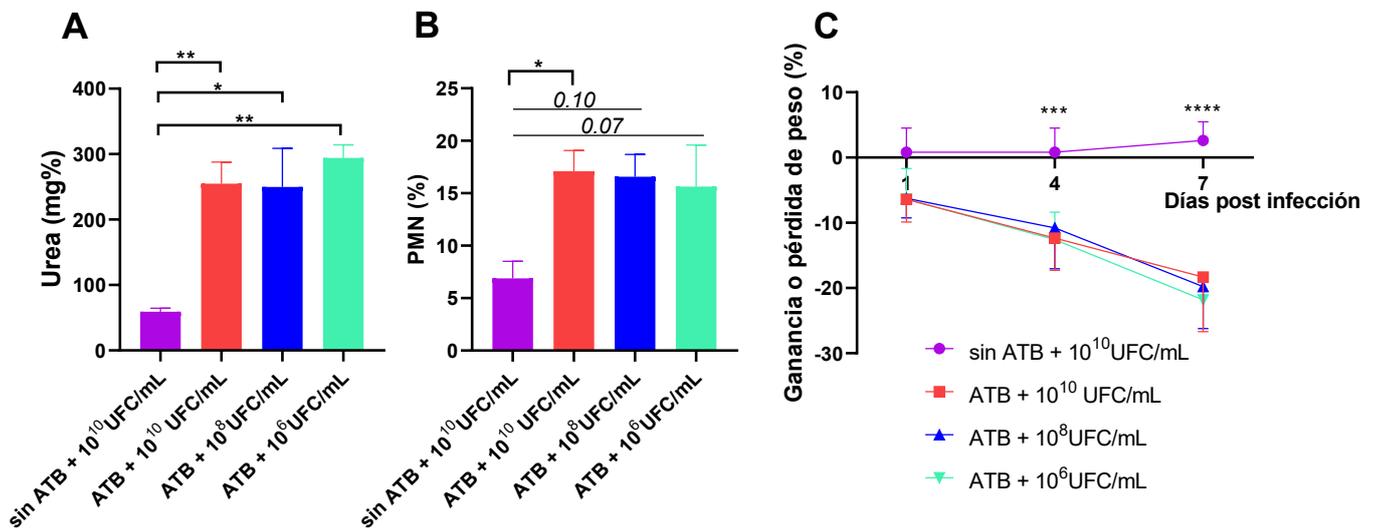
**Figura 58. Curvas de sobrevida de ratones C57 adultos tratados con ATB e infectados con distintas dosis de pW.** Ratones C57 (n=4-6 según grupo) fueron administrados de 2 dosis de ATB e infectados con distintas dosis de pW, las cuales se destacan en la leyenda de la figura, según se detalla en Materiales y métodos. Los datos fueron analizados por la prueba de Mantel-Cox. \*p<0.05.

De manera similar a lo ocurrido con la cepa BALB, puede observarse que el 100% de los ratones C57 tratados con ATB e infectados con pW murieron al cabo

de 6-8 días p.i., mientras que todos los ratones del grupo control de ratones sin recibir ATB e infectados con la dosis más alta de pW sobreviven hacia el día 9 p.i., momento en el cual los sobrevivientes fueron eutanasiados. Las curvas de supervivencia mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin ATB +  $10^{10}$  UFC/mL y todos los grupos tratados con ATB e infectados.

#### 14.2.4. Parámetros bioquímicos y clínicos evaluados durante el curso de la infección con pW en ratones C57 tratados con ATB.

Los ratones fueron pesados diariamente p.i. como indicador de morbilidad y al día 7 p.i. sangrados para determinar en sangre entera el porcentaje de PMN y la concentración de urea plasmática.



**Figura 59.** Los ratones infectados fueron pesados diariamente y al día 7 p.i. se sangraron para evaluar la concentración de urea plasmática y el recuento porcentual de PMN en sangre entera. **(A) Concentración plasmática de urea. (B) Porcentaje de PMN. (C) Ganancia o pérdida de peso respecto del peso inicial.** Los datos fueron analizados por un ANOVA de un factor (en A y B) o de dos factores (en C) seguido de un post test de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . // en figura C: \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  entre grupo sin ATB +  $10^{10}$  UFC/mL en comparación con todos los restantes. Cada barra o punto muestra la media  $\pm$  SEM de 4-6 ratones C57 según grupo experimental.

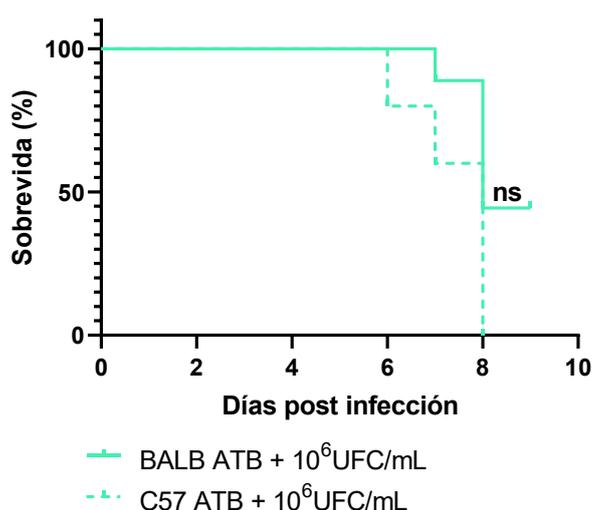
Como se puede ver en la figura 59A, todos los grupos experimentales que recibieron ATB y fueron infectados muestran valores patológicos de urea plasmática y significativamente elevados comparados con el grupo sin tratar con ATB e infectados.

Se observa un incremento en el porcentaje de PMN en todos los grupos tratados con ATB, aunque es significativo únicamente en el grupo ATB +  $10^{10}$  UFC/mL en comparación con el grupo control sin tratar con ATB e infectados. Los otros grupos (ATB +  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL) muestran una tendencia que no llega a ser significativa respecto del grupo sin tratar con ATB e infectados, posiblemente a causa del bajo número de ratones estudiados (Figura 59B).

Con respecto al peso, se ve un descenso significativo en todos los grupos tratados con ATB e infectados, independientemente de la dosis recibida, respecto del control sin ATB +  $10^{10}$  UFC/mL al día 4 y 7 p.i. (Figura 59C).

#### 14.2.5. Comparación de la supervivencia de ratones BALB y C57 tratados con ATB e infectados con la dosis más baja de pW.

Para evaluar si aún con la dosis infectiva más baja, se continúan observando diferencias en la mortalidad entre cepas murinas, se cotejó la curva de supervivencia de los ratones tratados con ATB e infectados con  $10^6$  UFC/mL de pW de ambas cepas. Cabe destacar que no se compararon las curvas de supervivencia de los grupos ATB e infectados con  $10^8$  y  $10^{10}$  UFC pW/mL, ya que ambas cepas murinas presentan un 100% de mortalidad con estas dosis en el mismo intervalo de tiempo.



**Figura 60. Curvas de supervivencia de ratones BALB y C57 adultos tratados con ATB e infectados con pW.** Ratones BALB (n=9) y C57 (n=5) fueron administrados de 2 dosis de ATB e infectados con  $10^6$  UFC/mL de pW, según se detalla en Materiales y métodos. Los datos fueron analizados por la prueba de Mantel-Cox.

Al comparar las curvas de supervivencia de los ratones de ambas cepas tratados con ATB e infectados con  $10^6$  UFC/mL de pW , aunque los ratones BALB muestran cerca de un 50% de supervivencia, no se hallan diferencias estadísticamente significativas (figura 60). Para poder tener una conclusión más robusta y afirmar que no existen diferencias en la susceptibilidad a la infección en este modelo murino, se debería evaluar un número mayor de ratones o desafiar con dosis infectivas menores a  $10^6$  UFC/mL.

# Discusión



Si bien el SUH es una enfermedad con una baja tasa de incidencia a nivel mundial, en Argentina presenta un comportamiento endemo-epidémico con la mayor tasa de incidencia del mundo [Carbonari y col., 2022]. Los motivos por los cuales se observa esta marcada diferencia no se encuentran completamente dilucidados, pero seguramente resulta de la sumatoria de diversos factores que implican tanto al agente etiológico como al hospedador.

Desde el punto de vista de los factores que involucran al agente etiológico, uno de ellos podría ser la circulación en nuestro país de ciertos serotipos de STEC altamente patogénicos que se asocian con mayor frecuencia al desarrollo de enfermedad gastrointestinal grave y progresión a SUH. Entre ellos, se destacan los serotipos O157:H7; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM y O26:H11 [Ylinen y col., 2020; Alconcher y col., 2021]. Dichos serotipos disponen de factores de virulencia que les proporcionan una mayor habilidad para persistir y colonizar el tracto gastrointestinal del hospedador, siendo el O157:H7 el serotipo asociado a la mayoría de los casos de SUH en Argentina [Pianciola y Rivas, 2018; Alconcher y col., 2021]. Otro factor podría ser la variante de Stx que porta la bacteria, dado que prácticamente la totalidad de las cepas que circulan en nuestro país expresan las variantes Stx2a y Stx2c, las cuales son fuertemente asociadas a enfermedad severa y SUH [Rivas y col., 2006].

Por otro lado, los hábitos alimenticios: está reportado que el consumo de carne vacuna en nuestro país alcanzó en el año 2022 los 47,7 kg/persona/año, lo cual incrementaría las probabilidades de contagio [CICCRA Informe N°254]. Por último, las deficiencias en los sistemas de control en la cadena alimenticia, desde los productores hasta el consumidor, y la ausencia de campañas de educación dirigidas a la población general podrían ser otros factores que contribuyan a la alta incidencia de SUH en nuestro país.

Finalmente, el hecho de que solamente entre el 10-15% de los casos de infecciones con STEC desarrollen SUH [Gould y col., 2013; Khalid y Andreoli, 2018], implica que también existen factores del hospedador que podrían influir sobre la autolimitación y resolución de la infección, así como sobre la evolución y progresión a SUH [Ibarra y Palermo, 2010]. Lamentablemente, hasta la fecha no existen tratamientos específicos que ayuden a limitar y disminuir el daño

producido por la Stx una vez que se desarrolla el SUH, así como tampoco medidas preventivas como vacunas para disminuir la incidencia del SUH, no sólo en Argentina sino a nivel mundial. Es por todo esto que creemos que resulta importante el estudio de cuáles son las diferencias entre el 10-15% de los individuos que desarrollan SUH frente al 85-90% de los individuos que resuelven una infección con STEC en su fase gastrointestinal, o incluso la cursan de manera asintomática, para diseñar nuevas terapéuticas que permitan actuar en etapas previas al desarrollo del SUH.

En primer lugar, quisimos estudiar la influencia de la variabilidad genética del hospedador en la respuesta a una infección con una cepa STEC O157:H7 altamente virulenta (perteneciente al clado 8 y que porta el gen *stx2a*) [Manning y col., 2008; Amigo y col., 2015]. Para ello infectamos ratones BALB y C57 siguiendo el modelo de infección a la edad del destete, sabiendo que a esa edad ocurren cambios tanto en la composición de la microbiota intestinal como en el sistema inmune de mucosas del ratón que los torna más sensibles que a la edad adulta [Cebra. 1999; Diaz y col., 2004]. Por esta razón, este modelo murino de infección presenta ventajas frente a los que utilizan ratones adultos tratados con antibióticos o dietas hipoproteicas para hacerlos susceptibles. Entre ellas, destacamos el mantenimiento de una microbiota intestinal intacta y que posteriormente a la infección, se reproducen las manifestaciones sistémicas del SUH como insuficiencia renal, leucopenia, neutrofilia y muerte [Fernández-Brando y col., 2014]. Mientras que en los seres humanos se considera que la dosis infectiva necesaria para desarrollar SUH es extremadamente baja (1-100 UFC) [Karpman y col., 2017; Idland y col., 2022], el ratón a la edad del destete necesita dosis mucho más elevadas para desarrollar los signos de la enfermedad. Esto es debido, al menos en gran medida, a que dicha bacteria no es un patógeno murino. Al desafiar a los ratones de ambas cepas murinas con la misma dosis de STEC O157:H7 (entre 1,0 y  $3,5 \times 10^{12}$  UFC/kg ratón) y en simultáneo, los ratones C57 resultaron ser sumamente susceptibles a la infección mientras que los ratones BALB no. En efecto, demostramos que las cepas BALB y C57 tienen una evolución diferente cuando son infectados oralmente con STEC O157:H7 al destete. Observamos que, frente a una misma dosis infectiva, el 88% de los ratones C57 y

el 11% de los ratones BALB mueren al cabo de 3-4 días p.i., siendo esta diferencia en la mortalidad significativa, al menos dentro del rango de dosis evaluado. Esta diferencia en la susceptibilidad dentro de una misma especie animal reproduce lo que se ve en humanos, incluso dentro del mismo rango etario, donde algunos de ellos presentan diarrea sanguinolenta y evolución a SUH, mientras que otros presentan sintomatología leve como diarrea acuosa que se autolimita o directamente no presentan sintomatología alguna.

Cuando determinamos los parámetros clínicos y bioquímicos, observamos que los ratones fallecían con niveles elevados de urea en plasma ( $>150$  mg%), lo cual es un indicador de daño renal inducido por la Stx2, como ha sido previamente reportado en modelos de SUH [Fernández-Brando y col., 2014; Fernández-Brando y col., 2020].

Al evaluar la progresión de la infección en ambas cepas detectamos que únicamente los ratones BALB infectados presentaron neutrofilia. La ausencia de neutrofilia en los ratones C57 infectados podría deberse a que un número importante de los neutrófilos fueron reclutados de circulación sistémica a otros tejidos/órganos, por ejemplo, el intestino; o que simplemente estos ratones generan una respuesta inflamatoria distinta a los ratones BALB. Por otro lado, los ratones BALB controles mostraron un mayor porcentaje de PMN en comparación con los ratones C57 controles. Esta diferencia podría estar relacionada con una respuesta diferente frente a las condiciones experimentales (privación de alimentos, entre otros) y/o frente a factores estresantes (sonidos, inoculación oral, sangrías, cambio de salas experimentales, entre otros), en lugar de ser una diferencia real entre cepas [Vlisidou y col., 2004; Deng y col., 2016; Ishikawa y col., 2020]. Por lo tanto, concluimos que la neutrofilia durante la infección con STEC O157:H7 en ratones BALB refleja más bien una respuesta inflamatoria contra la infección gastrointestinal que puede ser necesaria para controlarla y no necesariamente asociada a mayor daño sistémico.

A su vez, en ninguna de las dos cepas hallamos cambios significativos en el número total de leucocitos, a diferencia de lo reportado previamente en modelos murinos [Fernández-Brando y col., 2014], lo cual podría deberse a diferencias en

diversas variables como el modelo utilizado, la dosis infectiva y el tiempo en el cual se determina el recuento total de leucocitos durante la infección, entre otras.

También observamos una mayor pérdida de peso en los ratones BALB en comparación con los ratones C57, tanto en ratones controles como infectados. Esto podría estar relacionado con la respuesta de la cepa BALB, al destete y/o a la respuesta frente a factores estresantes propios de la manipulación del ratón, como ya se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, la diferencia significativa en el descenso del peso observada al día 3 p.i. entre ratones BALB controles e infectados podría ser propia de la infección, aunque fue transitoria y rápidamente revertida hacia el día 4 p.i. En coincidencia con lo anterior, al día 3 p.i. se encontró la ingesta más baja de alimento. Similarmente, los ratones C57 infectados mostraron una pérdida de peso máxima y la ingesta de alimento más baja en el día 3 p.i., en comparación con sus controles sin infectar. Sin embargo, ninguno de estos ratones recuperó peso ni sobrevivió. Aunque la anorexia y la pérdida de peso están relacionadas y son condiciones que resultan perjudiciales para la salud en determinadas ocasiones, no se correlacionaron con la gravedad de la infección por STEC O157:H7. Entre la bibliografía existente, pueden encontrarse numerosos reportes en donde se indica que, dependiendo del patógeno en cuestión, la anorexia inducida por la infección resulta beneficiosa para el hospedador [Exton MS. 1997; Bazar y col., 2005; Kanra y col., 2006; Sánchez y col., 2018]. Por ejemplo, se ha propuesto que la anorexia puede representar una conducta beneficiosa para combatir infecciones manteniendo el sesgo hacia un perfil Th2, particularmente vital en la lucha contra patógenos bacterianos extracelulares; y que la estimulación vagal y neurohormonal del intestino durante la alimentación promueve el sesgo hacia un perfil Th1, que es deseable en la defensa contra infecciones virales o patógenos intracelulares. Analizados en conjunto, el aumento en el porcentaje de PMN en circulación sistémica y la anorexia observados en ratones BALB luego de la infección son fenómenos complejos que podrían resultar beneficiosos y estar relacionados con la respuesta inflamatoria, inmune y/o al estrés desencadenado por la infección gastrointestinal con STEC O157:H7.

Cuando administramos a ambas cepas murinas y a la misma edad (al destete) una dosis letal de Stx2 e.v., observamos que no existen diferencias significativas en la mortalidad entre ellas. Cuando determinamos los parámetros bioquímicos y clínicos para evaluar la progresión a SUH, vimos que todos los ratones desafiados, independientemente de la cepa, presentaban niveles elevados de uremia y neutrofilia al día 3 post intoxicación, y un descenso de peso significativo al día 2. Estos hallazgos están de acuerdo con lo reportado previamente en los modelos de intoxicación con Stx2 [Fernández y col., 2000; Mejías y col., 2016; Pineda y col., 2021].

En conclusión, tomando en conjunto los resultados obtenidos al estudiar ambos modelos de SUH, podemos decir que la mayor mortalidad en los ratones C57 durante la infección gastrointestinal con STEC O157:H7 no se debe a una mayor sensibilidad a la toxina, a causa de por ejemplo una mayor expresión del Gb3 en las células blanco, sino a otros factores. Por el contrario, dichos resultados sugieren una respuesta diferente entre ambas cepas murinas frente a la infección gastrointestinal con las cepas STEC.

En este sentido, es extensa la bibliografía que reporta que los ratones BALB son capaces de controlar infecciones a causa de microorganismos extracelulares mediante la rápida producción de anticuerpos específicos como consecuencia de una respuesta inmunológica celular fundamentalmente de tipo Th2. Por el contrario, los ratones C57 son capaces de controlar de manera más eficiente infecciones con patógenos intracelulares, los cuales requieren de una respuesta celular más bien citotóxica para su eliminación [Farooq y Ashour, 2021]. Por ejemplo, se ha reportado que los ratones BALB son capaces de controlar infecciones a causa del parásito gastrointestinal *Heligmosomoides polygyrus* [Smith y col., 2018], el hongo *Candida albicans* durante infecciones en mucosa oral y vaginal [Carvalho y col., 2012] y queratitis ocular [Zou y col., 2012], y la bacteria *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (patógeno extracelular invasivo) [Fransen y col., 2015]. Además de la producción de anticuerpos, resulta clave para el control de la infección y la eliminación de los patógenos mencionados anteriormente una respuesta inmunológica celular de tipo Th2 y Th17 según lo expuesto por los autores. Por otro lado, los ratones C57 controlan

de mejor manera las infecciones por bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes* [Liu y col., 2000] y *Mycoplasma pulmonis* [Mize y col., 2018], y por virus como el Citomegalovirus [Lu y col., 2018]; dado que en este tipo de infecciones resulta relevante la producción temprana de IL-12 e IL-15 por DC para la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un perfil de tipo Th1 y la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>alto</sup> y NK secretoras de IFN- $\gamma$  en bazo, respuesta inmunológica montada eficientemente en los ratones C57 infectados. Nuestros resultados están en línea con estos antecedentes, considerando que las bacterias STEC son patógenos extracelulares.

Tradicionalmente, se le ha atribuido a la respuesta inmune la principal función de detectar y erradicar microorganismos como un mecanismo de defensa propio de diversas especies, desde mamíferos hasta plantas, mediante la participación de vías de eliminación de patógenos, denominadas colectivamente como "mecanismos de resistencia". Éstos son responsables de reducir la carga microbiana en los sitios de infección. Sin embargo, hay otros mecanismos de la respuesta inmune durante las infecciones microbianas que no estén dirigidas contra el patógeno sino contra las toxinas y otras moléculas nocivas que éste produce, que incluyen también mecanismos de reparación tisular, conocidos en conjunto como "mecanismos de tolerancia" [Råberg y col., 2007; Schneider y Ayres. 2008; Medzhitov y col., 2012]. En nuestro modelo de infección, ambas cepas murinas mostraron niveles similares de excreción bacteriana en materia fecal y de colonización intestinal en los tres segmentos analizados a los 3 días p.i., lo que sugiere que ambas cepas de ratón son igualmente resistentes a la STEC O157:H7. No obstante, los ratones BALB presentaron menor daño a lo largo del tracto gastrointestinal, al menos en las dosis infectivas evaluadas, lo cual indica que factores genéticos o epigenéticos presentes en esta cepa podrían inducir mecanismos de tolerancia. En el mismo sentido, los ratones C57 pese a tener el mismo nivel de colonización intestinal que los ratones BALB, mostraron mayor daño tisular en el intestino caracterizado por una depleción total de las células caliciformes, congestión vascular, infiltrado leucocitario y disrupción del epitelio superficial (este último hallazgo sólo en intestino grueso), en comparación con los ratones BALB que mostraron solamente focos de depleción de células

caliciformes y congestión vascular. Cabe agregar que los ratones BALB mostraron un menor pasaje de Dx-FITC a través de la barrera epitelial intestinal, mientras que los ratones C57 mostraron un aumento significativo de la permeabilidad intestinal.

El aumento del daño intestinal junto con la disminución de la función de la barrera intestinal en los ratones C57 infectados en comparación con los ratones BALB infectados posiblemente permite la translocación de factores patogénicos como LPS y Stx2 del lumen intestinal a circulación sistémica [Schüller y col., 2007; Brigotti y col., 2008; Malyukova y col. 2009; Schüller. 2011], provocando el daño renal observado y la muerte, a pesar de tener un nivel de colonización intestinal similar. Ante lo expuesto anteriormente, proponemos que los ratones BALB son más tolerantes a la infección con STEC O157:H7 que los ratones C57, ya que son capaces de montar mecanismos que ayudan a preservar la integridad de los tejidos, junto con una respuesta inmunológica adecuada que controla y ayuda a resolver la infección. Se ha demostrado previamente que la respuesta inmune inflamatoria es un mecanismo importante para limitar infecciones [Rausher. 2001; Schneider y Ayres. 2008; Medzhitov y col., 2012], pero también tiene un alto potencial para dañar a los tejidos del hospedador cuando es excesiva o no es controlada. Es necesario llevar a cabo mayor investigación para profundizar si el aumento del daño tisular observado en los ratones C57 infectados es causado directamente por el patógeno o indirectamente por la respuesta inmune inadecuada del hospedador.

Dentro de los mecanismos de tolerancia, nos propusimos estudiar si en los ratones BALB infectados se generaban anticuerpos anti-STE C O157:H7 y/o anti-Stx2 de manera rápida y eficaz, que les permitiera tolerar el desafío infeccioso que resulta letal en los ratones C57.

Recientemente, se ha propuesto que los ratones BALB presentan un sistema inmune de mucosas más eficiente en comparación al de los ratones C57 como consecuencia de una mejor señalización mediada por el ácido retinoico [Goverse y col., 2015]. Se sabe que el ácido retinoico favorece la localización de los linfocitos Treg en el intestino [Bai y col., 2009; Menning y col., 2010], mejora la integridad epitelial y, por lo tanto, incrementa la capacidad funcional de la barrera

intestinal. Además, influye sobre las células linfoides innatas vírgenes al sesgar el perfil de estas hacia las del grupo 3 productoras de IL-22 e IL-17, las cuales protegen contra patologías asociadas a las mucosas. En la misma línea de evidencia, se ha reportado recientemente que los ratones BALB tienen una cantidad significativa de IgA secretora innata. Esto podría estar asociado con una mayor abundancia de células B, particularmente de la subpoblación celular B1, en esta cepa de ratón en comparación con los ratones C57 [Fransen y col., 2015]. En ese sentido, se ha demostrado que la IgA innata presente en la mucosa intestinal juega un rol importante en el control de la infección por *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y en promover una mayor sobrevivencia en ratones BALB que en ratones C57 [Wijburg y col., 2006]. Sin embargo, en ninguno de los ratones BALB o C57 controles detectamos IgA innata libre en los sobrenadantes de materia fecal que fuera capaz de reconocer a las STEC O157:H7, ni tampoco bacterias comensales recubiertas de IgA. Esta observación sugiere que la IgA anti-STE C O157:H7 detectada en los sobrenadantes de materia fecal en los ratones BALB infectados fue consecuencia de una respuesta inmune específica. Aunque no encontramos IgA innata capaz de reconocer a la cepa STEC O157:H7, no puede descartarse que dicha IgA desempeñe un papel inmunoregulatorio en el desencadenamiento de la respuesta específica anti-STE C O157:H7. En particular y de manera llamativa, en los ratones BALB infectados se detectó IgA unida a bacterias STEC O157:H7 tan pronto como 3 días p.i. y libre en los sobrenadantes de materia fecal a los 7 días p.i. Estos resultados confirman la especificidad de la respuesta inmune humoral e indican que cuando las bacterias STEC O157:H7 han sido eliminadas y no están siendo excretadas en la materia fecal, se detectan niveles de IgA específica que reconocen a las STEC O157:H7, así como también a la H7 en los sobrenadantes de materia fecal. En conjunto todos estos resultados sugieren que durante la infección en ratones BALB, se produce una rápida estimulación en la producción de IgA local ausente en los ratones C57. De acuerdo con estos hallazgos, se ha reportado que bacterias potencialmente patógenas que poseen la capacidad de atravesar todas las capas de mucus y colonizar el epitelio intestinal, como es el caso de las STEC O157:H7, inducen la producción de IgA específica de alta afinidad y con capacidad opsonizante [Palm

y col., 2014]. Cabe destacar que además de la función de exclusión, se ha demostrado que la IgA permite la entrada limitada de complejos inmunes antígeno-IgA o de bacterias recubiertas de IgA en las placas de Peyer [Kadaoui y Corthésy. 2007; Martinoli y col., 2007; Breedveld y van Egmond. 2019], favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune local y sistémica.

Además, los ratones BALB infectados produjeron niveles detectables de IgG anti-Stx2 en plasma a los 3 y 7 días p.i., mientras que en los ratones C57 tampoco se detectaron estos anticuerpos. Con relación a la rápida aparición de anticuerpos específicos de isotipos G y A anti-Stx2, anti-STEC O157:H7 y anti-H7, Roco y colaboradores demostraron que el cambio de isotipo en linfocitos B activados puede ocurrir tan pronto como a los 2.5 días post estimulación antigénica. Dicho cambio de isotipo se produce fundamentalmente por fuera de los centros germinales, en el borde del folículo primario donde ocurre la colaboración T-B inicial en órganos linfoides secundarios. Conforme los linfocitos B activados se diferencian en células del centro germinal, disminuyen los mecanismos moleculares que promueven el cambio de isotipo y se favorecen aquellos implicados en la hipermutación somática. El cambio de isotipo extrafolicular también se observó en plasmablastos secretores de anticuerpos [Roco y col., 2019].

Dado que la cantidad de Stx2 necesaria para inducir daño renal es muy baja, se ha reportado que bajas concentraciones de anticuerpos neutralizantes son capaces de proteger a ratones contra el daño sistémico ocasionado por la inyección e.v. de Stx2 [Mejías y col., 2013; Mejías y col., 2016]. Teniendo en consideración esta observación, llevamos a cabo diversos ensayos de transferencia de anticuerpos para evaluar: 1) si la mortalidad observada en los ratones C57 infectados era efectivamente a causa del daño renal inducido por la toxina; 2) si los anticuerpos anti-Stx2 producidos en los ratones BALB infectados tenían capacidad neutralizante y protectora. En el primer ensayo, observamos que una cantidad de 30 picomoles de un anticuerpo neutralizante anti-Stx2 previamente producido y testeado en nuestro laboratorio, inyectados de manera e.v. en ratones C57 inmediatamente después de la infección con STEC O157:H7 pudo evitar completamente su muerte, lo cual confirma que la mortalidad

observada en estos ratones depende de que la Stx2 entre en circulación sistémica. Paralelamente, observamos que los ratones BALB que sobrevivieron a la infección con STEC O157:H7 estaban completamente protegidos frente a un desafío con Stx2 e.v., confirmando la capacidad neutralizante de esos anticuerpos *in vivo*. Por otro lado, el plasma de ratones BALB infectados, fue capaz de inducir un significativo retraso en la mortalidad de los ratones C57 luego de la infección con STEC O157:H7, comparado con el plasma de ratones BALB controles. Que no se haya observado una protección completa frente a la infección puede deberse a una limitación experimental, ya que el plasma de los ratones BALB infectados debió ser diluido al quinto en PBS para la administración i.p., alcanzando posiblemente una concentración insuficiente en los ratones C57 para neutralizar la totalidad de la Stx2 presente.

En resumen, podemos decir que los ratones BALB una vez infectados, montan mecanismos de tolerancia basados principalmente en una rápida y específica respuesta de anticuerpos anti-STE C O157:H7 (que incluyen anticuerpos anti-H7) y anti-Stx2 con capacidad neutralizante, y dicha respuesta humoral es la responsable de limitar el daño tisular y preservar la vida del animal durante la infección con STEC O157:H7.

El próximo paso para confirmar si la respuesta inmune humoral específica es la responsable de la mayor sobrevivencia en los ratones BALB infectados fue el diseño de un esquema de depleción de linfocitos B. Para garantizar la depleción total de linfocitos B, y así evitar el desarrollo de una respuesta inmune humoral específica durante las primeras 72 h de infección, los ratones BALB al destete recibieron 4 h previo a la infección anticuerpo anti-B220 y refuerzos adicionales a 24 y 48 h p.i. Con este esquema, observamos que la depleción de linfocitos B incrementa sustancialmente la mortalidad en los ratones BALB, la cual va acompañada de neutrofilia, descenso progresivo del peso corporal y una elevación de la concentración plasmática de urea. Además, como era esperable, estos ratones carecen de anticuerpos anti-STE C O157:H7 y anti-Stx2 a nivel sistémico, y tampoco se observa producción de IgA local a los 3 días p.i. Estos resultados demuestran que la activación de los linfocitos B, con su consecuente producción de anticuerpos anti-Stx2 neutralizantes y anti-STE C O157:H7, juegan

un rol clave en la protección de los ratones contra las infecciones por STEC. Cabe mencionar que, en línea con nuestros resultados, la depleción de linfocitos B incrementa la susceptibilidad a diversas infecciones en otros modelos murinos [Belperron y col., 2007; Sahputra y col., 2019; Dai y col., 2021].

Por otro lado, la relevancia de los anticuerpos anti-Stx2 séricos y/o antibacterianos locales para la contención y el control de infecciones gastrointestinales generadas por STEC O157:H7 en humanos fue previamente estudiada. Se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-Stx2 neutralizantes en el suero de poblaciones humanas “resistentes” (pacientes que han tenido SUH y se recuperaron, así como adultos de áreas endémicas), constituyendo evidencia indirecta que correlaciona la especificidad de la respuesta de anticuerpos con la protección contra complicaciones sistémicas secundarias a la infección gastrointestinal con STEC O157:H7 [Ludwig y col., 2001; Karmali y col., 2003; Fernández-Brando y col., 2011]. A su vez, en pacientes con diarrea a causa de una infección con STEC O157:H7 y en pacientes con SUH, se detectó la presencia de anticuerpos específicos anti-intimina, anti-EspA y anti-EspB evidenciando la activación de la respuesta inmune humoral específica y sugiriendo la relevancia de estos anticuerpos antibacterianos en la protección [Karpman y col., 2002]. En efecto, no es menor añadir que si bien existe la posibilidad de reinfecciones con cepas del mismo serotipo u otras STEC, el SUH típico sucede una única vez [Karpman y col., 2017], sugiriendo que los anticuerpos producidos durante la primoinfección, así como también la memoria inmunológica, alcanzan para la prevención de la complicación sistémica frente a infecciones posteriores. Si bien confirmamos que la activación de los linfocitos B con su consecuente producción de anticuerpos específicos son necesarios para la protección contra infecciones por STEC, puede que otros mecanismos que involucren a la respuesta celular también sean relevantes para garantizar la mayor sobrevivencia observada en los ratones BALB, y que no han sido caracterizados en el presente trabajo de tesis. Los linfocitos B, fundamentalmente los B2, requieren de los linfocitos T CD4+ para la producción de anticuerpos dirigidos principalmente contra antígenos proteicos. Por ende, la depleción de linfocitos T CD4+ podría contribuir notablemente a la ausencia de anticuerpos específicos y, por lo tanto, a la mortalidad. Con relación

a lo anteriormente expuesto, se ha reportado que tanto los linfocitos B como los linfocitos T CD4+ poseen un rol fundamental en la protección contra infecciones gastrointestinales producidas por *Citrobacter rodentium*, un patógeno murino que comparte características similares a la STEC O157:H7, ya que es un microorganismo LEE+ y tiene la capacidad de provocar lesiones A/E [Simmons y col., 2003]. A su vez, otros actores de la respuesta celular podrían participar en la protección contra las infecciones por STEC. Por ejemplo, se ha reportado previamente que los neutrófilos poseen un papel central en la eliminación de *C. rodentium* [Kamada y col., 2015]. También, los linfocitos Th17 en mucosa median la inmunidad protectora contra determinados hongos y bacterias extracelulares al promover el reclutamiento de neutrófilos, la producción de péptidos antimicrobianos y de factores de reparación tisular que ayudan a conservar el tejido epitelial [Mills, KHG. 2020]; y por fuera de la respuesta celular, también podrían estar involucrados mediadores solubles como la IL-10 endógena en el control de la infección, según lo reportado en otras aproximaciones experimentales [Belo y col., 2021].

La relevancia de los anticuerpos neutralizantes anti-Stx2 en la prevención del SUH también ha sido reportada previamente [Mejías y col., 2013]. Estos anticuerpos bloquean la interacción de la toxina con su receptor Gb3 en las células endoteliales glomerulares y las células epiteliales tubulares del riñón y así evitan la internalización y su citotoxicidad. Respecto a los anticuerpos anti-STE C O157:H7, no está muy caracterizada su funcionalidad, es decir, si son opsonizantes y/o neutralizantes, y a su vez, si tienen o no relevancia en evitar o disminuir la progresión a SUH. Para elucidar los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos anti-STE C O157:H7 generados durante la infección podrían conferir protección, llevamos a cabo diversos ensayos *in vitro*. En primer lugar, para garantizar que en todos los ensayos realizados nos encontráramos en una condición de exceso de anticuerpo, dado que algunos de ellos requieren de grandes cantidades de bacterias, diseñamos un esquema de reinfección para incrementar el título de anticuerpos específicos anti-STE C O157:H7. Bajo el esquema de 3 infecciones a intervalos de 10 días se logró el objetivo del aumento del título entre las sucesivas infecciones, obteniendo un título final en plasma de

IgG anti-STE $C$  O157:H7 de 2048 y de IgA anti-STE $C$  O157:H7 en materia fecal de 1024. En efecto, pese al posible consumo de anticuerpos durante las sucesivas infecciones, el título de anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7 fue significativamente en aumento. Posteriormente, caracterizamos si estos anticuerpos producidos durante las infecciones eran capaces de reconocer a las STE $C$  O157:H7 (anticuerpos opsonizantes) y de interferir con algún evento biológico relevante en la patogénesis bacteriana, como sería inhibir su motilidad y/o crecimiento (anticuerpos neutralizantes). Encontramos que los anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7, tanto los presentes en plasma (de isotipo G) así como los hallados en materia fecal (de isotipo A y G) poseían capacidad opsonizante, es decir, eran capaces de reconocer específicamente a las STE $C$  O157:H7, y no a otras *E. coli* comensales.

Habiendo demostrado la presencia de IgG con capacidad opsonizante en materia fecal y considerando reportes previos en los que se demostró que la IgG hallada en materia fecal podría ser resultado del transporte paracelular de la IgG plasmática [Chen y col., 2001], decidimos llevar a cabo los ensayos de neutralización *in vitro* utilizando solamente plasma de los animales re infectados, dado que es una muestra estéril.

De manera relevante, encontramos que los anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7 presentes en plasma (de isotipo G) presentan capacidad neutralizante, ya que fueron capaces de interferir con la motilidad bacteriana. En línea con estos hallazgos, otros autores reportaron que los anticuerpos anti-flagelina serían los responsables de inhibir la motilidad bacteriana de las cepas *Salmonella typhimurium* [Khani y col., 2020] y *E. coli*, mientras que los anticuerpos anti-LPS de *E. coli* reducen parcialmente la motilidad bacteriana [Cullender y col., 2013]. Por otro lado, los anticuerpos anti-flagelina además de interferir en la motilidad son capaces de regular negativamente la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los flagelos de *E. coli* [Cullender y col., 2013] y de interferir con la adhesión de una cepa STE $C$  O157:H7 a células epiteliales rectales bovinas [Mahajan y col., 2009].

Con la hipótesis de que, una vez generada la respuesta inmune humoral, los anticuerpos en el medio intestinal podrían interferir con la duplicación

bacteriana y limitar la colonización intestinal reduciendo el daño intestinal, estudiamos si los anticuerpos anti-STECH O157:H7 eran capaces de interferir con el crecimiento bacteriano. Si bien no encontramos anticuerpos anti-STECH O157:H7 que bloqueen significativamente la duplicación bacteriana, existen reportes en donde se observó que un anticuerpo monoclonal de isotipo A es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* a través del reconocimiento de la serina hidroximetil transferasa, relevante en el metabolismo bacteriano y presente en diversas especies bacterianas [Okai y col., 2016; Sasaki y col., 2021]. Sin embargo, a pesar de haber observado una reducción no significativa en la fase exponencial de las STECH O157:H7 incubadas con el plasma de ratones re infectados en comparación de plasmas controles, no descartamos que aumentando el número de replicas biológicas podamos hallar diferencias significativas entre estos grupos.

Si bien, en el transcurso de la presente tesis, no se pudo determinar de manera acabada contra qué componentes bacterianos están dirigidos los anticuerpos anti-STECH O157:H7 o cuales son los relevantes en la opsonización y/o neutralización, si pudimos demostrar que dichos anticuerpos reconocen al menos a la proteína H7 de manera específica, y éstos podrían poseer sin duda alguna de estas funciones, como por ejemplo la inhibición de la motilidad bacteriana. Otra funcionalidad de los anticuerpos que no pudo ser estudiada y resultaría interesante investigar es la opsonofagocitosis, ya que existen reportes previos en un modelo infeccioso de *C. rodentium* en el que hallan que la IgG anti-*C. rodentium* en materia fecal es reconocida por fagocitos a través de sus receptores de Fc $\gamma$  (fundamentalmente neutrófilos), y a través de dicha interacción fagocitan y eliminan a la bacteria patógena más rápida y eficientemente, generando menor daño a nivel intestinal, incluso evitando la muerte del animal [Kamada y col., 2015]. Los fagocitos reconocerían a las STECH O157:H7 opsonizada con IgG o IgA a través de sus receptores presentes en la membrana celular, para su ingestión y posterior destrucción. Estas células reconocen a la IgG a través de su receptor para Fc $\gamma$  (principalmente CD64 y CD32 presentes en macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y mastocitos) [Nimmerjahn y Ravetch. 2008] y a la IgA monomérica (también presente en el lumen intestinal, en una

fracción menor que la dimérica) a través del Fc $\alpha$  (CD89 en humanos; presentes en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos) [Morton y Brandtzaeg. 2001]. Otros efectos inhibitorios relevantes que podrían tener estos anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7 son, por ejemplo, la inhibición de la adhesión a líneas celulares epiteliales humanas de intestino (tal como las Caco-2 y las HCT-8) y la inhibición de la respuesta inflamatoria sobre líneas celulares reporteras (tal como las Caco-2 CCL20:luc, HekBlue-hTLR4). Si bien se realizaron algunos ensayos preliminares, se requiere mayor experimentación para obtener resultados concluyentes.

Como conclusión, podemos decir que los anticuerpos anti-STE $C$  O157:H7 a través de su capacidad opsonizante y neutralizante cumplen un papel fundamental en definir la evolución durante las infecciones con este patógeno.

A raíz de todos los resultados obtenidos y discutidos en el presente trabajo de tesis, pudimos determinar que las diferencias halladas en la respuesta inmunológica entre las cepas murinas son relevantes en conferir protección frente a las infecciones por STE $C$  y en definir la progresión a SUH. Sin embargo, existen otros factores denominados epigenéticos, entre los que se incluye la composición de la microbiota, sobre la cual se ha descrito ampliamente el rol protector que posee frente a la defensa contra determinados patógenos [Momose y col., 2007; Öncül y Yildırım, 2019; Pinhal y col., 2019], en la contribución con el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en la maduración del sistema inmune de mucosas [Shi y col., 2017]. La composición del microbioma intestinal de los ratones BALB y C57 adultos presenta un 80% de los taxones compartidos, y mayoritariamente está compuesta por anaerobios de los filos Bacteroidetes y Firmicutes [Korach-Rechtman y col., 2019]. Sin embargo, se hallan diferencias basales significativas en algunas especies bacterianas que interactúan estrechamente con el hospedador, como *Akkermansia*, *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* [Fransen y col., 2015]. También, los mismos autores hallan un incremento del género *Parasutterella*, implicadas en la degradación del componente secretor en detrimento de la estabilidad de la IgA, en los ratones C57 respecto de los BALB, lo que podría contribuir a reducir la abundancia de la IgA en los ratones C57. A su vez, otros autores destacan que la diversidad microbiana es

mucho menor en los ratones C57 en comparación a los ratones BALB, y que estas cepas difieren significativamente en los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Verrucomicrobia [Somayajulu y col., 2021]. Estos autores, a su vez, encuentran una mayor abundancia de *B. thetaiotaomicron* y *L. johnsonii* en ratones C57. Se sabe que la microbiota se modifica con diversos factores, tal como la edad, el estrés, la alimentación, el ambiente, el sexo biológico, la lactancia, entre otros [Elderman y col., 2018]. Las diferencias en la composición de oligosacáridos de la leche materna están determinadas genéticamente y afectan el desarrollo de la composición de la microbiota en su descendencia, por ende, la microbiota de un ratón al destete es completamente distinta a la de un adulto [Fuhrer y col., 2010; Monteagudo-Mera y col., 2016]. En este sentido, se ha demostrado que, a través de algunas bacterias de la leche materna, la microbiota de los ratones de hasta 21 días (momento en el cual se destetan), está enriquecida principalmente de Bifidobacterias y Lactobacilos en comparación a la microbiota de un ratón adulto. Dichas bacterias tienen actividad probiótica. Por todo lo anteriormente expuesto, nos propusimos analizar la influencia de la microbiota en la susceptibilidad a las infecciones por STEC O157:H7 en las cepas murinas BALB y C57. Para ello seguimos dos aproximaciones experimentales: por un lado, ensayos de cohabitación de crías BALB amamantadas hasta el destete por una nodriza C57 y, recíprocamente de crías C57 amamantadas por una nodriza BALB, para lograr que la microbiota intestinal de las crías sea semejante a la de su nodriza; y por otro, la administración de un antibiótico de amplio espectro para generar una disbiosis y evaluar si dicho efecto incrementa la susceptibilidad a la infección con STEC O157:H7, pero manteniendo las diferencias ya observadas entre ambas cepas murinas.

Cuando realizamos los experimentos de cohabitación, observamos que el intercambio de crías no influyó en la susceptibilidad anteriormente vista. Casi la totalidad de las crías C57 sucumbieron frente a la infección con STEC O157:H7, con niveles elevados de urea en plasma y un abrupto descenso de peso al día 3 p.i.; en contraposición a los ratones BALB, los cuales sobrevivieron al desafío infeccioso con niveles normales de urea al día 3 p.i., un aumento progresivo en el peso y un leve incremento del porcentaje de PMN en sangre periférica. Si bien a

partir de estos resultados podríamos concluir que únicamente los factores genéticos son los responsables de la mayor susceptibilidad de los ratones C57, no descartamos que la microbiota pueda intervenir en conferir o no protección, directa o indirectamente. En efecto, una limitación de este ensayo es que no se pudo determinar si la composición de la microbiota de un ratón BALB después de la cohabitación se asemeja a la de un ratón C57, y viceversa, utilizando técnicas como PCR cuantitativa en tiempo real o la secuenciación del ARN ribosomal 16s del genoma presente en la materia fecal. El trasplante de materia fecal, frente a la cohabitación, es una metodología más atractiva desde el punto de vista que es más controlada. Consiste en la administración de un cóctel de antibióticos durante 14 días, y luego en la administración oral de la materia fecal del donante durante otros 15-20 días. Dicha metodología no pudo ser aplicada en nuestro modelo murino de infección a la edad del destete por los tiempos que implica. Sin embargo, otros autores a través de la cohabitación y el trasplante de materia fecal también fallaron en reproducir la microbiota intestinal de un ratón BALB en un ratón C57, y viceversa. Sus hallazgos sugieren que, independientemente de la metodología utilizada, los ratones reproducen una microbiota más parecida a la original debido a que la genética del hospedador afecta la composición de la microbiota intestinal [Stebegg y col., 2019], posiblemente por la existencia de un repertorio definido de IgA innata polireactiva en cada cepa murina que controla la colonización y composición de la microbiota con determinadas especies bacterianas, y que restablece la microbiota original [Lindner y col., 2012; Fransen y col., 2015]. A su vez, en un modelo de listeriosis transmitida por alimentos se encontró que el trasplante de materia fecal de ratones BALB a ratones C57 no logró que éstos últimos sean más susceptibles a la infección, así como el trasplante de materia fecal a la inversa no confirió resistencia a los ratones BALB [Myers-Morales y col., 2013], sugiriendo que los factores genéticos, más que los epigenéticos estarían asociados a la menor susceptibilidad de los ratones C57 en esta infección, aunque los mismos autores plantean que no pudieron reproducir a un 100% la microbiota de un ratón C57 en un ratón BALB y viceversa. Por otro lado, hay publicaciones en donde a través de experimentos de cohabitación y/o trasplante de materia fecal se obtuvieron resultados exitosos [Ellekilde y col.,

2014; Buffington y col., 2016; Stebegg y col., 2019; Liu y col., 2021]. Particularmente, en la infección con *C. rodentium* se reportaron resultados interesantes en donde el trasplante de materia fecal de una cepa murina resistente a la infección (NIH Swiss) a una susceptible (C3H/HeJ) es capaz de revertir la mortalidad en ésta [Willing y col., 2011], atribuyéndole a la microbiota intestinal un rol fundamental en la defensa contra este patógeno en particular. Sin embargo, cabe mencionar que las cepas murinas utilizadas no fueron ni BALB ni C57, y que la microbiota es capaz de inducir cambios en el sistema inmune de mucosas [Shi y col., 2017], por ende, no es la microbiota o el sistema inmunológico, sino que posiblemente ambos estén involucrados, o el resultado de su interacción, tanto en la resistencia como en la susceptibilidad a infecciones.

La segunda aproximación consistió en la administración previa a la infección de un antibiótico de amplio espectro, como lo es la ampicilina, para ver si eliminando la microbiota desaparecían las diferencias entre cepas. En este caso, utilizamos ratones adultos para analizar la dependencia de la microbiota y una cepa bacteriana resistente a la ampicilina (pW). Como era esperado, el efecto de la disbiosis inducida por la administración de ampicilina en ratones BALB y C57 adultos incrementó notablemente la susceptibilidad a la infección por STEC en comparación con sus controles. Mientras que una dosis de  $10^6$  UFC/mL fue capaz de generar muerte en ambas cepas murinas tratadas con antibióticos, los controles sin tratamiento antibiótico que recibieron  $10^{10}$  UFC/mL no mostraron ningún signo que demuestre afección por la infección (como neutrofilia, descenso de peso, elevación de la urea plasmática). En coincidencia con nuestros resultados, otros autores han reportado que el tratamiento con antibióticos incrementa marcadamente la susceptibilidad de los ratones a infecciones gastrointestinales [Theriot y col., 2014; Thiemann y col., 2016; Gutiérrez y col., 2020]. Más aún, algunos modelos de SUH por infección con STEC O157:H7 en ratones adultos necesitan sensibilizar a los ratones con antibiótico para poder reproducir la enfermedad sistémica [Shimizu y col., 2003; Lin y col., 2017].

En el caso de los ratones BALB tratados con ampicilina, se obtuvo un efecto dosis dependiente en todos los parámetros evaluados, observándose la mayor

neutrofilia, concentración de urea plasmática y descenso de peso en los ratones que recibieron la mayor dosis infectiva ( $10^{10}$  UFC/mL) en comparación con los que recibieron la menor dosis ( $10^6$  UFC/mL). Sin embargo, este efecto dosis dependiente no fue observado en los ratones C57 tratados con ampicilina, ya que no se encontraron diferencias en los parámetros bioquímicos y clínicos entre las dosis evaluadas. Si bien no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre ambas cepas murinas a ninguna de las dosis infectivas probadas, con la menor dosis los ratones C57 presentan un 100% de mortalidad y los ratones BALB casi un 50%. Por lo tanto, para obtener una conclusión más robusta se debería infectar a un número mayor de ratones con esa dosis, o incluso con dosis infectivas menores a  $10^6$  UFC/mL, para poder concluir que ambas cepas son igualmente susceptibles al desafío infeccioso cuando son tratadas con ampicilina. Si en este modelo de disbiosis se siguieran observando diferencias entre BALB y C57 en la supervivencia frente a infecciones con STEC con dosis iguales o menores a  $10^6$  UFC/mL, se podría concluir que las mismas estarían ligadas a factores genéticos (mayormente inmunológicos) o epigenéticos (microbiota no sensible a ampicilina). Como conclusión, no podemos descartar que la microbiota (en la interacción microbiota-sistema inmune y microbiota-patógeno) tenga un papel importante en conferir protección frente a las infecciones con STEC O157:H7.

Como siguiente objetivo, y retomando el concepto de la importancia de la respuesta de anticuerpos para definir el curso de las infecciones con STEC O157:H7, nos propusimos investigar si los anticuerpos anti-STE C O157:H7 son suficientes para prevenir la infección y/o evitar el desarrollo del SUH. Para esto, decidimos seleccionar a la proteína H7 como inmunógeno para desarrollar en los ratones una respuesta inmunológica preventiva. La elección de H7 como antígeno se basó en que es altamente inmunogénica, es efectiva a bajas dosis, induce una robusta respuesta a base de anticuerpos y posee propiedades adyuvantes [Errea y col., 2015; Asadi Karam y col., 2016; Biedma y col., 2019]. Por otro lado, dada su naturaleza proteica, es un antígeno T-dependiente y presenta la ventaja de generar memoria inmunológica (tanto de linfocitos T como de linfocitos B); a diferencia de formulaciones que utilizan el LPS O157, el cual además de ser

toxigénico, es un antígeno T-independiente y a menos que sea conjugado, no genera memoria inmunológica. Por otra parte, el diseño de vacunas a base de proteínas o subunidades es mucho más seguro que las de bacteria viva atenuada, ya que estas al poseer capacidad replicativa pueden generar infección y/o enfermedad en personas inmunosuprimidas. También, presentan ventajas frente a las bacterias inactivadas, dado que los tratamientos químicos o físicos para la inactivación pueden alterar la estructura y la conformación de determinados epítopes. A su vez, habíamos observado que luego de una primoinfección se detectaban niveles de anticuerpos específicos anti-H7 en sangre y materia fecal. Por último, la facilidad para la obtención y purificación de dicho antígeno en nuestro laboratorio, sumado a todos los antecedentes anteriormente mencionados, hizo que eligiéramos como inmunógeno a la proteína H7 para generar una respuesta anti-STE $\Delta$ Stx2 O157:H7 en ratones BALB previo a ser infectados.

Luego del proceso de obtención y purificación de H7 a partir de la cepa STEC  $\Delta$ Stx2 (para evitar la contaminación de los lotes de H7 con la Stx, factor patogénico esencial para el desarrollo del SUH), se obtuvo una única banda de peso molecular aproximado de 70 kDa por SDS-PAGE en coincidencia con la bibliografía [Reid y col., 1999; McNeilly y col., 2010; Tahoun y col., 2015]. Además, mediante ensayos de actividad biológica pudimos determinar que la proteína obtenida tenía la capacidad de ser reconocida e interactuar con el TLR5. Estos resultados nos permiten concluir que la estrategia de obtención y purificación de la H7 no altera su sitio de reconocimiento y unión a TLR5, manteniendo su bioactividad. Cuando la fuente de obtención de los flagelos son bacterias Gram negativas, el contaminante principal de los lotes es el LPS [Didierlaurent y col., 2004; Hiriart y col., 2012; Kreutzberger y col., 2022]. Mediante una prueba colorimétrica específica, pudimos ver que los lotes obtenidos contaban con alrededor de 60 pg de LPS por  $\mu$ g de H7. Sin embargo, en la superficie bacteriana también se hallan otras proteínas tal como fimbrias y otras adhesinas [McWilliams y Torres. 2014], así como los componentes del T3SS, que podrían estar siendo obtenidas junto con la flagelina durante el proceso de purificación. Aunque las condiciones del cultivo bacteriano usadas para la purificación de H7

no deberían inducir a la expresión del T3SS [Fernández-Brando y col., 2020], no podemos descartar totalmente la presencia de trazas de estas proteínas u otras en nuestros lotes de H7, por debajo de la concentración que permite visualizar el SDS-PAGE, teñido ya sea con Coomassie Blue R-250 o con plata, una técnica más sensible [Sasse y Gallagher. 2004; Kumar, G. 2018].

Una vez obtenida y purificada la H7, llevamos a cabo el esquema de inmunización, en ausencia de adyuvante, encontrando una respuesta inmune humoral robusta en la mucosa intestinal y a nivel sistémico. Detectamos IgG específica anti-H7 en los ratones inmunizados hasta 2 meses después de la última inmunización, tanto en plasma como en materia fecal, con un pico de máxima producción de IgG específica a 41 días post primera dosis en ambas muestras, obteniéndose una cinética similar en la producción de IgG anti-H7 tanto a nivel sistémico como a nivel local. El máximo título de IgG anti-H7 alcanzado en plasma fue de 256000 y en materia fecal de 64. Por otro lado, la IgA específica anti-H7 en materia fecal fue detectable hasta 41 días post primera dosis, con un pico de máxima producción a 27 días post primera dosis, diferenciándose de la cinética hallada para la IgG específica en mucosa intestinal. El máximo título encontrado de IgA anti-H7 en materia fecal fue de 64. La capacidad de la H7 de inducir una robusta respuesta inmune humoral también ha sido reportada previamente por McNeilly y colaboradores en bovinos, aun cuando en estos estudios utilizaron adyuvantes y otras proteínas relevantes en la patogénesis de STEC O157:H7, como EspA e intimina en las formulaciones vacunales. Los autores reportan IgA e IgG específica anti-H7 en suero y exudados nasales y rectales cuando el ganado fue inmunizado en un esquema de 3 dosis de manera intramuscular. A su vez, las cinéticas en la producción de IgG específica en suero y de IgA en exudados nasales fueron similares a las obtenidas en los ratones en plasma (para IgG) y materia fecal (para IgA). También son similares los títulos de IgG anti-H7 en suero informados por estos autores y los obtenidos en este trabajo de tesis [McNeilly y col., 2008; McNeilly y col., 2010; McNeilly y col., 2015]. Por otra parte, encontramos que los niveles de anticuerpos IgA anti-H7 decaen más rápido que los niveles de IgG anti-H7, posiblemente a que la vida media de la IgA sérica es mucho menor que la vida media de la IgG sérica

[Cottignies-Calamarte y col., 2023]. En ratones adultos, se ha reportado que la IgG sérica (IgG1, 2a, 2b, 3) tiene una vida media de 6-8 días, mientras que una forma de IgA polimérica se elimina del suero con una vida media de 17-22 horas [Vieira y Rajewsky. 1988]. Cabe mencionar que en ratones se encuentran concentraciones de IgA sérica mucho menores que en el hombre, encontrándose predominantemente en su forma polimérica [Kerr. 1990]. Teniendo esto en cuenta, ha sido sugerido que en el desarrollo del ELISA específico anti-H7 en plasma, los epítopes disponibles de esta proteína serían mayoritariamente reconocidos por la IgG plasmática, dificultando la detección de la IgA específica. Por lo cual, decidimos no evaluar la IgA plasmática, y solo medirla en la materia fecal. También, cabe destacar que el título obtenido en materia fecal, tanto para la IgG como la IgA específica, es relativo y no representa un título real; ya que cuanto más se concentre a los extractos de materia fecal, mayor es el título de anticuerpos que uno detecta. El éxito de una inmunización depende no solamente de la naturaleza del antígeno, sino también de la dosis, el esquema y la vía de inmunización. Si bien la vía elegida para la administración de la H7 fue intranasal, encontramos niveles significativos de IgA específica anti-H7 en mucosa intestinal. Dada la conformación del sistema de mucosas, y que éste funciona como una unidad, no resulta extraño que la aplicación tópica de una formulación en una superficie mucosal desencadene respuestas inmunológicas en otras. Estos hallazgos van de la mano con reportes previos de Asadi Karam y colaboradores en los que demuestran que la inmunización intranasal con FimH (factor de virulencia relevante en la patogénesis de *E. coli* uropatógena) formulada con FliC y toxina colérica como adyuvantes, permite la inducción de IgA específica en otras mucosas distales, como la vaginal y la vesical [Asadi Karam y col., 2016]. Por otro lado, la IgG específica anti-H7 hallada en materia fecal, es el resultado de la producción local, pero también del transporte paracelular de la IgG plasmática [Chen y col., 2001].

A su vez, inmunizamos otro grupo de ratones con una flagelina no relacionada, en este caso FliC, para confirmar que la protección de los ratones frente al desafío con STEC O157:H7 sea a causa de la respuesta humoral específica anti-H7, y descartar que dicha protección se deba a eventos

“inespecíficos” tales como la respuesta inflamatoria generada por la inmunización con cualquier flagelina. A través del mismo esquema de inmunización que previamente habíamos realizado con H7, pero utilizando FliC, obtuvimos tanto en mucosa intestinal como a nivel sistémico una robusta respuesta inmune humoral específica con una cinética y títulos máximos semejantes a los alcanzados con la inmunización con H7. Con más detalle, detectamos IgG específica anti-FliC en plasma y materia fecal, e IgA específica en materia fecal al menos hasta 41 días post primera dosis, ya que a tiempos posteriores no se realizaron determinaciones. Sin embargo, dentro de los tiempos de muestreo evaluados, se obtuvo un pico de máxima producción de IgG anti-FliC a 41 días post primera dosis en plasma y materia fecal con un título de 256000 y 64, respectivamente; y un pico de máxima producción de IgA anti-FliC en materia fecal a 27 días post primera dosis con un título de 32. En línea con los hallazgos obtenidos durante la inmunización con FliC, se ha reportado, usando la misma vía de administración, aunque bajo otro esquema, la presencia de anticuerpos específicos anti-FliC en suero del orden de  $10^5$  similares a los alcanzados en el presente trabajo de tesis [Nempont y col., 2008]. Lo destacable de éste y otros reportes [Hiriart y col., 2012; Errea y col., 2015; Fougeron y col., 2021; Pérez-Cruz y col., 2021], es que cuando la FliC se administra como adyuvante o como inmunógeno se utilizan dosis de 1 a 5  $\mu\text{g}$  en esquemas de 2 dosis a intervalos de 14 o 21 días, obteniéndose una respuesta inmune humoral muy robusta y similar a la alcanzada, al menos en suero, en la presente tesis. Dichas observaciones indican que con un esquema de dosis más simplificado y con menores  $\mu\text{g}$  de proteína, tanto de FliC como de H7, se podría alcanzar una respuesta inmune humoral igualmente significativa a la generada por el esquema de 3 dosis de 10  $\mu\text{g}$ .

Posteriormente, se evaluó si los anticuerpos generados por la inmunización con FliC reconocían de manera cruzada a la H7. Observamos que los anticuerpos provenientes tanto de plasma como de materia fecal reconocían específicamente a cada flagelina y no se evidenció que los anticuerpos anti-FliC reconocieran a la H7. Cabe mencionar que no se realizó el estudio inverso, de si los anticuerpos anti-H7 reconocen a la FliC, ya que los ensayos de infección no se llevaron a cabo

con *Salmonella typhimurium* y es un objetivo que excede el alcance de esta tesis. Dado que hay regiones N- y C- terminales altamente conservadas y que el sitio de interacción con el TLR5 ubicado en la región N-terminal entre los aminoácidos 89-96 es idéntico en FliC y H7 [Vijayan y col., 2018; Pang y col., 2022], no se descarta la posibilidad de que se detecten anticuerpos anti-FliC que reconozcan a la H7 a menores diluciones de las muestras. Sobre todo, porque si bien los anticuerpos anti-flagelina están dirigidos principalmente contra epítopes de la región central hipervariable del monómero, existen anticuerpos dirigidos contra la región N-terminal donde se localiza el sitio de reconocimiento del TLR5 [Biedma y col., 2019]. Estos resultados nos permiten concluir que, a pesar de tener sitios conservados entre las distintas flagelinas, los anticuerpos producidos son específicos, al menos en las diluciones de plasma y materia fecal evaluadas. Ante lo anteriormente expuesto, sería interesante evaluar a futuro si existe reacción cruzada de los anticuerpos anti-H7 con otras flagelinas de *E. coli* enterohemorrágica. Esto sería beneficioso, porque ampliaría el rango de protección hacia otras STEC con distintos antígenos flagelares.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos alentaron no sólo a estudiar la relevancia de los anticuerpos anti-STECS generados durante una infección en la prevención del SUH, sino en pensar que la H7 podría ser un posible candidato para formar parte de una formulación vacunal que apunte a actuar en la fase infecciosa. Con este objetivo, nos propusimos caracterizar además de la respuesta inmune humoral, la respuesta inmune celular generada por la H7. La activación de las células dendríticas por componentes bacterianos a través de los TLR es uno de los principales eventos durante la inducción de una respuesta inmune. Encontramos que la H7 fue capaz de aumentar la expresión de CD86 en la superficie celular de BMDC y de inducir la síntesis y secreción de IL-6 e IL-12p70. La secreción de estas citoquinas tiene gran relevancia, ya que están implicadas en la polarización de linfocitos T hacia un perfil Th1 [Ashour y col., 2020] y Th17 [Zhou y col., 2007; Shao y col., 2020; Yang y col., 2022]. A su vez, la IL-6 es relevante en la polarización de los linfocitos T helper foliculares [Eto y col., 2011; Chavele y col., 2015], células que colaboran con los linfocitos B en la producción de anticuerpos. Nuestros hallazgos coinciden con reportes previos en

los cuales se usó como estímulo a FliC, y donde se reporta su capacidad de aumentar la expresión de CD80 y CD86 en la superficie celular de BMDC de ratones C57, y de inducir la secreción de IL-6 [Didierlaurent y col., 2004; Bates y col., 2009]. A su vez, otros autores reportaron que BMDC de ratones BALB diferenciadas con IL-10 (tolerogénicas) o diferenciadas con GM-CSF e IL-4, al ser estimuladas con FliC secretan cantidades significativas de IL-12 [Vicente-Suárez y col., 2009]. Tanto en nuestros resultados como en estos reportes, la expresión de CD86 en la superficie de BMDC, así como la secreción de IL-6, IL-12p70 y TNF- $\alpha$  inducida por las flagelinas, es significativamente menor a los resultados obtenidos con BMDC estimuladas con LPS.

También es interesante tener en cuenta que hay distintos subtipos de células dendríticas obtenidas del intestino, siendo algunos de éstos secretores de TNF- $\alpha$  [Uematsu y col., 2008]. Dado que en nuestras muestras no se contempló la relevancia de evaluar la expresión de otros marcadores, no podemos definir cuál de las subpoblaciones hemos obtenido en nuestros cultivos celulares. Por otra parte, aunque hay pocos trabajos donde analizan los efectos *in vitro* de la H7, podemos mencionar un reporte en el cual describen que los PBMC estimulados con flagelina de *E. coli* inducen menor expresión del mRNA de TNF- $\alpha$ , en comparación con PBMC incubados con FliC [Makvandi y col., 2018]. Resumiendo los datos hallados en la bibliografía, la capacidad de la respuesta a la flagelina varía entre las distintas subpoblaciones de células dendríticas, y no todas las flagelinas tienen la misma capacidad de activar a un mismo tipo celular. Además, la secreción de citoquinas, así como la expresión de moléculas coestimuladoras, se ven influenciadas por las condiciones del cultivo (concentración de antígeno, tiempos de incubación, etc.).

Por otro lado, una hipótesis que explica la menor respuesta de BMDC a la flagelina en comparación con el LPS es que sólo una pequeña fracción de la población total de BMDC expresan TLR5; de hecho, se reportaron 3 fenotipos de células dendríticas que no expresan este TLR [Uematsu y Akira, 2009]. A pesar de que no todas las células dendríticas expresen el TLR5, la flagelina de las bacterias Gram negativas tiene una afinidad extremadamente alta por este receptor [Mizel y col., 2003], ingresando dentro de la célula a través de un mecanismo de

endocitosis dependiente de TLR5. A su vez, que la H7 sea menos toxigénica que el LPS, la hace más interesante para tener en cuenta como un posible candidato vacunal, considerando que una fuerte respuesta inflamatoria con la liberación de grandes cantidades de IL-6 y TNF- $\alpha$  podría tener efectos nocivos en el epitelio mucoso.

El estudio de la memoria inmunológica es clave al momento de seleccionar antígenos vacunales, ya que una vez que los títulos de anticuerpos decaen, es importante contar con células que posean la capacidad de reconocer rápida y eficientemente a un determinado antígeno y/o inmunógeno y se diferencien a células efectoras, células plasmáticas secretoras de anticuerpos, nuevas células de memoria, etc. Es por esto que estudiamos la respuesta celular *ex vivo* incubando leucocitos obtenidos de ratones inmunizados de ganglio mediastínico y bazo con BMDC estimuladas o no con H7. La relevancia de este cultivo mixto es que únicamente los linfocitos T o B de memoria capaces de reconocer a través de su TCR o BCR la secuencia peptídica presentada en el MHCII de las BMDC se activarán, proliferarán y se diferenciarán (ensayo de proliferación específica). Encontramos que los linfocitos, particularmente la subpoblación CD4+, de los ganglios mediastínicos y del bazo de ratones inmunizados mostraron una proliferación específica significativa en respuesta a BMDC estimuladas con H7, con secreción de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-17A, sugiriendo estos resultados un perfil de respuesta T mixto Th1/Th2/Th17, tanto en bazo como en ganglio mediastínico. Cabe mencionar que los ensayos de proliferación específica llevados a cabo en esta tesis fueron realizados 4 semanas luego de completado el esquema de inmunización, ya que se sabe por bibliografía que, una vez eliminado el antígeno o inmunógeno, la respuesta T efectora muere por apoptosis y predomina la respuesta T de memoria [Saeidi y col., 2018]. Que la inmunización con H7 genere un perfil de respuesta T mixto Th1/Th2/Th17 es interesante, ya que las citoquinas IL-4 e IL-5 participan en la proliferación de células B activadas y en la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas secretoras de IgA e IgG, además de intervenir en la producción de linfocitos B de memoria de vida media larga [Granato y col., 2014; Hashiguchi y col., 2020]. La IL-17A actúa sobre las células epiteliales de la mucosa induciendo la secreción de interleuquinas tales

como IL-8, IL-6 y G-CSF, las cuales reclutan principalmente a neutrófilos. Además, se ha reportado que estimula a los enterocitos a secretar péptidos antimicrobianos (como mucinas y lectinas) y factores de reparación tisular que promueven la recuperación del tejido dañado llevando a la homeostasis [McGeachy y col., 2019; Mills. 2022]. Por lo tanto, la inducción de linfocitos Th17 luego de la inmunización con H7 contribuiría a proteger al hospedador durante la infección aguda con STEC O157:H7, y la generación de linfocitos Th2 a promover la producción de anticuerpos específicos anti-H7 de isotipo IgA e IgG en mucosa y en plasma. Nuestros hallazgos coinciden con reportes previos en los que se ha demostrado que FliC, dada su naturaleza proteica, es capaz de generar una respuesta inmune celular específica mediada por linfocitos T CD4+. Bobat y colaboradores demostraron que los linfocitos T CD4+ de ratones SM1 (que poseen un TCR transgénico que reconoce específicamente a péptidos de FliC) teñidos con CFSE al ser transferidos de manera e.v. en ratones vírgenes son capaces de proliferar específicamente cuando a dichos ratones se los inmuniza 24 horas post transferencia de manera i.p. con FliC [Bobat y col., 2011]. Sin embargo, el perfil de respuesta T efectora que se genera en respuesta a la flagelina es bastante variable. Recientemente, se ha reportado que cuando la FliC es administrada a través de una superficie mucosa, las DC convencionales de tipo 2 responden con la secreción de IL-23, IL-6 y TGF- $\beta$ . La liberación de IL-23 conduce a la activación inmediata de células linfoides innatas de tipo 3 que secretan IL-22, una citoquina asociada al desarrollo de una respuesta celular T de tipo Th17 [Viyajan y col., 2018]. A su vez, otras células dendríticas con un fenotipo CD103+ CD11c<sup>alto</sup> CD11b<sup>alto</sup> en mucosa poseen la capacidad de diferenciar a linfocitos B vírgenes en células plasmáticas secretoras de IgA y también, junto con las células dendríticas con un fenotipo CD172 $\alpha$ + TLR5+, la capacidad de diferenciar linfocitos T CD4+ vírgenes hacia un perfil Th1 y Th17 en respuesta a FliC [Uematsu y col., 2009; Fujimoto y col., 2011; Liu y col., 2016]. Por otro lado, la inmunización con FliC nativa o monomérica se ha asociada a respuestas fundamentalmente de tipo Th2 con la presencia de anticuerpos séricos anti-FliC específicos predominantemente de isotipo IgG1, mientras que cuando se produce alguna modificación en su estructura genera respuestas más bien del tipo Th1 con

un cambio en el isotipo de los anticuerpos anti-FliC específicos en suero hacia un predominio de IgG2a [Cunningham y col., 2004; Didierlaurent y col., 2004; Ramos y col., 2004; Bobat y col., 2011]. Estos antecedentes permiten concluir que la respuesta a la flagelina genera un perfil de respuesta T mixto, y que depende tanto de la vía de inmunización, así como también de qué manera se administre (soluble, fusionada con otras proteínas, etc.).

Para complementar el estudio de la memoria inmunológica, llevamos a cabo un ensayo de DTH *in vivo* en ratones a 2 meses luego de completado el esquema de inmunización. La DTH es una reacción inflamatoria local mediada por linfocitos T de memoria efectores CCR7+ en el lugar de inyección del antígeno con el cual se ha primado al sistema inmunológico [Beeton y Chandy. 2007]. Encontramos un aumento significativo de la hinchazón en las almohadillas plantares de los ratones inmunizados con H7 en comparación con los controles, demostrando que la inmunización desencadenó una respuesta T de memoria eficiente. A su vez, cabe destacar que algunos autores señalan que la respuesta Th1 es un sello distintivo de la DTH [Ramos y col., 2004], correlacionando la respuesta hallada *in vivo* en los ratones inmunizados con la respuesta Th1 obtenida *ex vivo* en los linfocitos T de memoria de bazo y ganglio mediastínico incubados con BMDC estimuladas con H7.

Una vez caracterizada la respuesta inmune humoral y celular anti-H7, el próximo objetivo fue desafiar con STEC O157:H7 cepa pW a los ratones inmunizados para evaluar si efectivamente la presencia de anticuerpos anti-H7 en mucosa intestinal alcanzan para prevenir la infección y/o la progresión a SUH. Los resultados obtenidos fueron realmente claros y definitivos, ya que los ratones inmunizados con H7 sobrevivieron manifestando solamente un ligero aumento en el porcentaje de PMN en sangre periférica y en los niveles de urea plasmática que retornan a niveles basales a 15 días p.i.; mientras que los ratones controles (sin inmunizar o inmunizados con FliC) mueren como consecuencia de la enfermedad renal inducida por la Stx2. Por lo tanto, podemos hipotetizar que todos los mecanismos inmunológicos descriptos, tanto de la inmunidad humoral como de la celular, participan en conferir protección específica a ratones desafiados con una dosis letal de STEC O157:H7 pW. En la misma línea experimental, Iannino y

colaboradores diseñaron una quimera antigénica formada por la combinación de secuencias peptídicas de proteínas relevantes en la patogénesis de STEC (EspA, intimina, Tir y H7) y la fusionaron a la secuencia señal que dispara la síntesis de  $\beta$ -lactamasa en la cepa atenuada de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, utilizada como plataforma vacunal. Cuando las bacterias son expuestas a un agente  $\beta$ -lactámico, se induce la producción de esta enzima junto con la secreción de la quimera al espacio periplásmico bacteriano. La inmunización oral con esta plataforma vacunal, en un esquema de única dosis, promovió el desarrollo de una respuesta inmune humoral específica en mucosa, pero no a nivel sistémico, capaz de proteger a los ratones desafiados con  $10^{10}$  UFC de STEC O157:H7 [Iannino y col., 2022]. Otros autores diseñaron una plataforma vacunal utilizando nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con una proteína quimérica formada por intimina y H7 administrada por 3 vías: oral, intranasal y subcutánea. Los autores observaron que la administración oral tuvo la mejor respuesta humoral a nivel de mucosas y en cuanto a la mortalidad, todos los ratones que fueron inmunizados por alguna vía mucosal (oral e intranasal) y desafiados con 100 dosis letales 50 sobrevivieron, mientras que todos los ratones controles murieron antes del día 5 p.i. [Abianeh y col., 2023]. De los reportes mencionados, así como también de los resultados obtenidos en esta tesis [Bernal y col., 2023], podemos decir que el diseño de plataformas vacunales a base de proteínas que son relevantes en la patogénesis bacteriana, sobre todo en el establecimiento de la colonización intestinal, son capaces de prevenir el desarrollo del SUH.

A continuación, analizamos si los anticuerpos anti-H7 en la mucosa intestinal de los ratones inmunizados eran capaces de interferir con la colonización bacteriana, encontrando que la inmunización con H7 es capaz de reducir significativamente la colonización en intestino delgado, grueso y ciego de ratones infectados con STEC O157:H7 pW en comparación con los ratones no inmunizados o inmunizados con FliC. Además, los ratones no inmunizados o inmunizados con FliC presentaron un mayor daño en la barrera intestinal, evidenciado por una mayor permeabilidad a 6 días p.i. en comparación con los ratones inmunizados con H7. El aumento de la permeabilidad intestinal es

probablemente consecuencia de una mayor colonización, que produce una mayor inflamación y daño intestinal con una pérdida de la integridad de la función de barrera en los grupos controles en comparación con los ratones inmunizados con H7. En línea con estos resultados, ha sido reportado que la inmunización del ganado con H7 fue capaz de reducir la colonización de STEC O157:H7 en comparación con el grupo control [McNeilly y col., 2008]. En otra aproximación más reciente, los mismos autores desarrollaron distintas plataformas vacunales basadas en subunidades de proteínas y encuentran que el ganado inmunizado con EspA, intimina y H7, y posteriormente desafiado con  $10^{10}$  UFC STEC O157:H7, presenta una reducción drástica de la colonización y la excreción bacteriana en comparación con el grupo control [McNeilly y col., 2015]. Otros autores diseñaron una plataforma vacunal fusionando a la intimina y a la H7. El esquema de inmunización mostró que esta plataforma desarrolló una respuesta inmune humoral específica en los ratones y que cuando éstos fueron desafiados oralmente con bacterias STEC O157:H7, la excreción bacteriana se redujo en 6 órdenes de magnitud en los ratones inmunizados en comparación al grupo control [Samiei y col., 2023]. Estos antecedentes, junto con los resultados obtenidos en esta tesis, nos permiten concluir que los anticuerpos anti-H7 en mucosa intestinal son capaces de prevenir el desarrollo la enfermedad sistémica al interferir en el primer paso de la cascada patogénica del SUH, la cual es la colonización intestinal.

Los ratones inmunizados con H7 y sobrevivientes al desafío infeccioso fueron eutanasiados al día 15 p.i., momento en el cual se les tomó una última muestra de sangre para determinar parámetros bioquímicos y clínicos y caracterizar la respuesta inmune humoral. A este tiempo, la concentración plasmática de urea y el porcentaje de PMN regresaron a niveles basales, sugiriendo que algo de Stx2 alcanzó la circulación sistémica durante el período agudo, pero que no fue suficiente para inducir daño irreversible o el desarrollo del SUH. Un hallazgo notable fue la presencia de IgG específica anti-Stx2 en plasma, así como también anticuerpos anti-H7 en sobrenadantes de materia fecal en los ratones inmunizados e infectados a los 15 días p.i. Estos resultados sugieren que la inmunización con H7 no impide que se monte una respuesta inmune específica

contra otros factores de virulencia de la STEC O157:H7, y que la infección actuó como un refuerzo, ya que los anticuerpos anti-H7 en materia fecal no se consumieron totalmente. Esta observación es muy importante, dado que en nuestro país hay una alta circulación de cepas patógenas de STEC y sería deseable que la vacunación no prevenga el desarrollo de una respuesta inmunológica contra otros factores de virulencia durante las subsecuentes infecciones gastrointestinales.

Actualmente no existen vacunas para prevenir el SUH que puedan ser aplicadas en humanos. Sin embargo, se ha ensayado una vacuna polisacárida conjugada a base de LPS de STEC O157:H7 detoxificado [Ahmed y col., 2006]. La fase clínica I y II para este desarrollo se llevó a cabo en adultos y niños, y se encontró que esta vacuna era segura para todas las edades. Además, generó una respuesta inmune humoral específica a nivel sistémico y se encontró que el suero de las poblaciones de ambas edades vacunadas contaba con actividad bactericida. Sin embargo, existen ciertas limitaciones para el uso del LPS en vacunas. Por un lado, el LPS no logró inducir una respuesta inmune humoral duradera, especialmente en niños, y en dicho trabajo no se evaluó la respuesta humoral en mucosa intestinal, la cual es fundamental para prevenir la colonización [Ahmed y col., 2006]. Como ha sido mencionado anteriormente, hay mucho progreso en la investigación de distintas plataformas vacunales para prevenir el SUH. Si bien la mayoría están enfocadas en evitar el desarrollo de la fase toxigénica [Mejías y col., 2013; Almasian y col., 2018; Sreerohini y col., 2019; Ghaffari Marandi y col., 2019], algunas investigaciones apuntan a la prevención de la fase infecciosa intentando bloquear el primer paso en la cascada patogénica del SUH [Iannino y col., 2022; Dyatlov y col., 2022; Abianeh y col., 2023]. Según nuestro punto de vista, y en coincidencia con otros autores, creemos que sería beneficioso una vacuna que apuntara a la prevención de ambas fases [Kordbacheh y col., 2019; Arshadi y col., 2022].

Con los resultados obtenidos en la presente tesis y los antecedentes mencionados anteriormente, podemos concluir que la vacunación dirigida contra la fase infecciosa es suficiente para prevenir el desarrollo de las complicaciones sistémicas asociadas a la infección. La inmunización intranasal de ratones BALB

con H7 indujo exitosamente una respuesta T y B específica a nivel sistémico, así como también en mucosa, capaz de conferir protección contra un desafío letal con bacterias STEC O157:H7 y prevenir el desarrollo del SUH. Si bien la eficacia es la cuestión más relevante en una vacuna, la caracterización de su mecanismo de acción es también importante para generar conocimiento y brindar información que puede ser útil para el desarrollo de nuevas vacunas.

# Conclusiones



- 1.** Frente a la infección con la cepa STEC O157:H7, los ratones C57 resultan ser más susceptibles que los ratones BALB, y dicha susceptibilidad no se asocia a una mayor sensibilidad a la Stx2.
- 2.** Los ratones BALB presentan menor daño intestinal, tanto histológico como funcional, a pesar de tener un mismo nivel de carga bacteriana que los ratones C57.
- 3.** La infección con STEC O157:H7 estimula en la cepa BALB una rápida y eficiente producción de IgA local anti-H7 y anti-STECH O157:H7; y de IgG sérica anti-Stx2 , anti-H7 y anti-STECH O157:H7, ausente en los ratones C57 infectados.
- 4.** La respuesta humoral rápida y específica anti-STECH y anti-Stx2 con capacidad neutralizante y opsonizante es la responsable de limitar el daño tisular durante la infección con STECH O157:H7, preservando la integridad del tejido intestinal y del riñón y, en consecuencia, la vida del animal. Esta respuesta resultó ser un eficiente mecanismo de tolerancia.
- 5.** La disbiosis incrementa la susceptibilidad a las infecciones por STECH O157:H7, con lo cual la microbiota podría participar en la protección al competir con el patógeno por un mismo nicho ecológico y/o al estimular al sistema inmune de mucosas
- 6.** La inmunización con H7 desencadena una robusta respuesta humoral específica en plasma (IgG) y mucosa intestinal (IgA e IgG) que se mantiene hasta al menos 2 meses de finalizado el plan de inmunización
- 7.** La H7 activa a las células dendríticas in vitro, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie y la liberación de citoquinas proinflamatorias.
- 8.** La H7 genera una respuesta T de memoria específica, con un perfil mixto Th1/Th2/Th17, que se mantiene hasta al menos 2 meses de finalizado el plan de inmunización (determinada in vivo mediante DTH).
- 9.** El esquema de inmunización intranasal con H7 logra evitar el desarrollo del SUH luego de la infección cepas STECH O157:H7.
- 10.** Los mecanismos inmunológicos descritos, fundamentalmente la producción de anticuerpos específicos anti-H7 y la respuesta Th17 en mucosa

podrían participar en la protección de los ratones inmunizados frente a la infección con una dosis letal de STEC O157:H7

**11.** La presencia de anticuerpos anti-STE C O157:H7 y anti-H7 interfieren con la motilidad bacteriana (determinado in vitro) y con la colonización intestinal (determinada in vivo en los ratones inmunizados), respectivamente.

**12.** La inmunización con H7 no impide que, luego de la infección con cepas STEC O157:H7, se genere una respuesta inmune humoral contra otros factores de virulencia del patógeno.

Como conclusión general, la respuesta inmune humoral específica anti-STE C O157:H7 y/o anti-H7 con capacidad neutralizante y opsonizante en la mucosa intestinal es central para el control y la resolución de la infección. Estos resultados alientan a que se considere la incorporación de H7 como componente de una formulación vacunal que podría mitigar las infecciones con STEC, pero fundamentalmente prevenir el desarrollo del SUH, y contribuir a disminuir las altas tasas de este síndrome en la población pediátrica de nuestro país.

# Referencias



- Abianeh, H. S., Nazarian, S., Sadeghi, D., Razgi, A. S. H., & Samarin, M. Z. (2023). PLGA nanoparticles containing Intimin-Flagellin fusion protein for *E. coli* O157:H7 nano-vaccine. *Journal of immunological methods*, 520, 113517. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2023.113517>
- Adams, C., Vose, A., Edmond, M. B., & Lyckholm, L. (2017). *Shigella sonnei* and hemolytic uremic syndrome: A case report and literature review. *IDCases*, 8, 6–8. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.02.003>
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 52(11), 1185–1193. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1349173>
- Ahmed Ali, E. M., Abbakar, N. M., Abdel Raheem, M. B., & Ellidir, R. A. (2017). Characteristics and outcome of hemolytic uremic syndrome in Sudanese children in a single Centre in Khartoum State. *Sudanese journal of paediatrics*, 17(2), 42–48. <https://doi.org/10.24911/SJP.2017.2.5>
- Ahmed, A., Li, J., Shiloach, Y., Robbins, J. B., & Szu, S. C. (2006). Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children. *The Journal of infectious diseases*, 193(4), 515–521. <https://doi.org/10.1086/499821>
- Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8), 675–680. <https://doi.org/10.1038/90609>
- Albanese, A., Gerhardt, E., García, H., Amigo, N., Cataldi, A., Zotta, E., & Ibarra, C. (2015). Inhibition of water absorption and selective damage to human colonic mucosa induced by Shiga toxin-2 are enhanced by *Escherichia coli* O157:H7 infection. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 305(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.02.002>
- Alconcher, L. F., Balestracci, A., Coccia, P. A., Suarez, A. D. C., Ramírez, F. B., Monteverde, M. L., Perez Y Gutiérrez, M. G., Carlopio, P. M., Principi, I., Estrella, P., Micelli, S., Leroy, D. C., Quijada, N. E., Seminara, C., Giordano, M. I., Hidalgo Solís, S. B., Saurit, M., Caminitti, A., Arias, A., Liern, M., ... Rivas, M. (2021). Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Argentina: update of serotypes and genotypes and their relationship with severity of the disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 36(9), 2811–2817. <https://doi.org/10.1007/s00467-021-04988-y>
- Almasian, P., Amani, J., Arani, F. B., Nazarian, S., Kazemi, R., & Tabrizi, N. M. (2018). Preparation of chitosan nanoparticle containing recombinant StxB antigen of EHEC and evaluation its immunogenicity in BALB/c mice. *Iranian journal of microbiology*, 10(6), 361–370.
- Altegoer, F., & Bange, G. (2015). Undiscovered regions on the molecular landscape of flagellar assembly. *Current opinion in microbiology*, 28, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.08.011>
- Amaral, M. M., Sacerdoti, F., Jancic, C., Repetto, H. A., Paton, A. W., Paton, J. C., & Ibarra, C. (2013). Action of shiga toxin type-2 and subtilase cytotoxin on human microvascular endothelial cells. *PloS one*, 8(7), e70431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070431>

Amigo, N., Mercado, E., Bentancor, A., Singh, P., Vilte, D., Gerhardt, E., Zotta, E., Ibarra, C., Manning, S. D., Larzábal, M., & Cataldi, A. (2015). Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have Hypervirulent-Like Phenotypes. *PLoS one*, 10(6), e0127710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127710>

Ardavín C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), 582–590. <https://doi.org/10.1038/nri1127>

Armstrong, G. D., Rowe, P. C., Goodyer, P., Orrbine, E., Klassen, T. P., Wells, G., MacKenzie, A., Lior, H., Blanchard, C., & Auclair, F. (1995). A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 171(4), 1042–1045. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.4.1042>

Arshadi, N., Mousavi Gargari, S. L., Amani, J., & Nazarian, S. (2022). Immunogenicity of inactivated *Escherichia coli* O157:H7 with Stx2B microparticle in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 25(9), 1069–1076. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.63775.14053>

Arshadi, N., Mousavi, S. L., Amani, J., & Nazarian, S. (2020). Immunogenic Potency of Formalin and Heat Inactivated *E. coli* O157:H7 in Mouse Model Administered by Different Routes. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 12(3), 194–200.

Asadi Karam, M. R., Habibi, M., & Bouzari, S. (2016). Use of flagellin and cholera toxin as adjuvants in intranasal vaccination of mice to enhance protective immune responses against uropathogenic *Escherichia coli* antigens. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 44(5), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.006>

Ashour, D., Arampatzi, P., Pavlovic, V., Förstner, K. U., Kaisho, T., Beilhack, A., Erhard, F., & Lutz, M. B. (2020). IL-12 from endogenous cDC1, and not vaccine DC, is required for Th1 induction. *JCI insight*, 5(10), e135143. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135143>

Assimakopoulos, S. F., Triantos, C., Maroulis, I., & Gogos, C. (2018). The Role of the Gut Barrier Function in Health and Disease. *Gastroenterology research*, 11(4), 261–263. <https://doi.org/10.14740/gr1053w>

Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., & Tangye, S. G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), 1767–1779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1767>

Bai, A., Lu, N., Guo, Y., Liu, Z., Chen, J., & Peng, Z. (2009). All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *Journal of leukocyte biology*, 86(4), 959–969. <https://doi.org/10.1189/jlb.0109006>

Bai, X., Chi, X., Qiao, Q., Xie, S., Wan, S., Ni, L., Wang, P., Jin, W., & Dong, C. (2020). T Follicular Helper Cells Regulate Humoral Response for Host Protection against Intestinal *Citrobacter rodentium* Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 204(10), 2754–2761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000046>

Bakema, J. E., & van Egmond, M. (2011). The human immunoglobulin A Fc receptor FcαRI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal immunology*, 4(6), 612–624. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.36>

- Barnes, M. J., & Powrie, F. (2009). Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*, 31(3), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.011>
- Bates, J. T., Uematsu, S., Akira, S., & Mizel, S. B. (2009). Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 182(12), 7539–7547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804225>
- Bazar, K. A., Yun, A. J., & Lee, P. Y. (2005). "Starve a fever and feed a cold": feeding and anorexia may be adaptive behavioral modulators of autonomic and T helper balance. *Medical hypotheses*, 64(6), 1080–1084. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.05.020>
- Beatson, S. A., Minamino, T., & Pallen, M. J. (2006). Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends in microbiology*, 14(4), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.008>
- Beeton, C., & Chandy, K. G. (2007). Induction and monitoring of active delayed type hypersensitivity (DTH) in rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (6), 237. <https://doi.org/10.3791/237>
- Belo, V. A., Pereira, J. A., Souza, S. F. D., Tana, F. L., Pereira, B. P., Lopes, D. O., Ceron, C. S., Novaes, R. D., Corsetti, P. P., & de Almeida, L. A. (2021). The role of IL-10 in immune responses against *Pseudomonas aeruginosa* during acute lung infection. *Cell and tissue research*, 383(3), 1123–1133. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03308-4>
- Belperron, A. A., Dailey, C. M., Booth, C. J., & Bockenstedt, L. K. (2007). Marginal zone B-cell depletion impairs murine host defense against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection and immunity*, 75(7), 3354–3360. <https://doi.org/10.1128/IAI.00422-07>
- Bentancor, L. V., Bilen, M., Brando, R. J., Ramos, M. V., Ferreira, L. C., Ghiringhelli, P. D., & Palermo, M. S. (2009). A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 16(5), 712–718. <https://doi.org/10.1128/CVI.00328-08>
- Berdasco, C., Pinto, A., Calabró, V., Arenas, D., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Evelson, P., & Goldstein, J. (2019). Shiga toxin 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* induces reactive glial cells and neurovascular disarrangements including edema and lipid peroxidation in the murine brain hippocampus. *Journal of biomedical science*, 26(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0509-x>
- Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., & Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*, 23(5), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.013>
- Bernal, A. M., Fernández-Brando, R. J., Bruballa, A. C., Fiorentino, G. A., Pineda, G. E., Zotta, E., Vermeulen, M., Ramos, M. V., Rumbo, M., & Palermo, M. S. (2021). Differential Outcome between BALB/c and C57BL/6 Mice after *Escherichia coli* O157:H7 Infection Is Associated with a Dissimilar Tolerance Mechanism. *Infection and immunity*, 89(5), e00031-21. <https://doi.org/10.1128/IAI.00031-21>
- Bernal, A. M., Sosa, F. N., Todero, M. F., Montagna, D. R., Vermeulen, M. E., Fernández-Brando, R. J., Ramos, M. V., Errea, A. J., Rumbo, M., & Palermo, M. S. (2023). Nasal immunization with H7 flagellin protects mice against hemolytic uremic syndrome

secondary to *Escherichia coli* O157:H7 gastrointestinal infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1143918. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1143918>

Best, A., La Ragione, R. M., Sayers, A. R., & Woodward, M. J. (2005). Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chicks by shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, 73(3), 1836–1846. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1836-1846.2005>

Bettelheim K.A. (2007). “The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens”. *Crit Rev Microbiol* 33(1):67-87.

Biedma, M. E., Cayet, D., Tabareau, J., Rossi, A. H., Ivičak-Kocjan, K., Moreno, G., Errea, A., Soulard, D., Parisi, G., Jerala, R., Berguer, P., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2019). Recombinant flagellins with deletions in domains D1, D2, and D3: Characterization as novel immunoadjuvants. *Vaccine*, 37(4), 652–663. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.009>

Bielaszewska, M., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Jarosch, K. A., Steil, D., Zhang, W., He, X., Lloubes, R., Fruth, A., Kim, K. S., Schmidt, M. A., Dobrindt, U., Mellmann, A., & Karch, H. (2017). Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006159>

Biernbaum, E. N., Dassanayake, R. P., Nicholson, E. M., & Kudva, I. T. (2023). Comparative evaluation of antimicrobial activity of human granulysin, bovine and porcine NK-lysins against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *PloS one*, 18(9), e0292234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292234>

Bitzan, M., Poole, R., Mehran, M., Sicard, E., Brockus, C., Thuning-Roberson, C., & Rivière, M. (2009). Safety and pharmacokinetics of chimeric anti-Shiga toxin 1 and anti-Shiga toxin 2 monoclonal antibodies in healthy volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(7), 3081–3087. <https://doi.org/10.1128/AAC.01661-08>

Blyth, G. A. D., Connors, L., Fodor, C., & Cobo, E. R. (2020). The Network of Colonic Host Defense Peptides as an Innate Immune Defense Against Enteropathogenic Bacteria. *Frontiers in immunology*, 11, 965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00965>

Bobat, S., Flores-Langarica, A., Hitchcock, J., Marshall, J. L., Kingsley, R. A., Goodall, M., Gil-Cruz, C., Serre, K., Leyton, D. L., Letran, S. E., Gaspal, F., Chester, R., Chamberlain, J. L., Dougan, G., López-Macías, C., Henderson, I. R., Alexander, J., MacLennan, I. C., & Cunningham, A. F. (2011). Soluble flagellin, FliC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of *Salmonella typhimurium* infection. *European journal of immunology*, 41(6), 1606–1618. <https://doi.org/10.1002/eji.201041089>

Boletín Epidemiológico Nacional N° 663. 2023

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

Boots M. (2008). Fight or learn to live with the consequences?. *Trends in ecology & evolution*, 23(5), 248–250. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.01.006>

Borkowska, A., Sobstyl, A., Chatupnik, A., Chilimoniuk, Z., Dobosz, M., & Marosz, S. (2020). Hemolytic uremic syndrome (HUS) – case report. *J Educ Health Sport*, 10(9), 431-435.

Bosworth, B. T., Samuel, J. E., Moon, H. W., O'Brien, A. D., Gordon, V. M., & Whipp, S. C. (1996). Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infection and immunity*, 64(1), 55–60. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.55-60.1996>

Bou Ghanem, E. N., Nelson, C. C., & D'Orazio, S. E. (2011). T cell-intrinsic factors contribute to the differential ability of CD8+ T cells to rapidly secrete IFN- $\gamma$  in the absence of antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(3), 1703–1712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001960>

Brando, R. J., Miliwebsky, E., Bentancor, L., Deza, N., Baschkier, A., Ramos, M. V., Fernández, G. C., Meiss, R., Rivas, M., & Palermo, M. S. (2008). Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. *Clinical and experimental immunology*, 153(2), 297–306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03698.x>

Breedveld, A., & van Egmond, M. (2019). IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in immunology*, 10, 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>

Bridger, P. S., Mohr, M., Stamm, I., Fröhlich, J., Föllmann, W., Birkner, S., Metcalfe, H., Werling, D., Baljer, G., & Menge, C. (2010). Primary bovine colonic cells: a model to study strain-specific responses to *Escherichia coli*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 137(1-2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.04.010>

Brigotti, M., Carnicelli, D., Ravanelli, E., Barbieri, S., Ricci, F., Bontadini, A., Tozzi, A. E., Scavia, G., Caprioli, A., & Tazzari, P. L. (2008). Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), 1019–1027. <https://doi.org/10.1189/jlb.0308157>

Bruballa, A. C., Shiromizu, C. M., Bernal, A. M., Pineda, G. E., Sabbione, F., Trevani, A. S., Bentancor, L. V., Ramos, M. V., Fernández-Brando, R. J., Muñoz, M. J., & Palermo, M. S. (2020). Role of Shiga Toxins in Cytotoxicity and Immunomodulatory Effects of *Escherichia coli* O157:H7 during Host-Bacterial Interactions in vitro. *Toxins*, 12(1), 48. <https://doi.org/10.3390/toxins12010048>

Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, 165(7), 1762–1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>

Burguet, L., Taton, B., Prezelin-Reydit, M., Rubin, S., Picard, W., Gruson, D., Ryman, A., Contin-Bordes, C., Coppo, P., Combe, C., & Delmas, Y. (2022). Urine Protein/Creatinine Ratio in Thrombotic Microangiopathies: A Simple Test to Facilitate Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic and Uremic Syndrome Diagnosis. *Journal of clinical medicine*, 11(3), 648. <https://doi.org/10.3390/jcm11030648>

Cadona, J. S., Burgán, J., González, J., Bustamante, A. V., & Sanso, A. M. (2020). Differential expression of the virulence gene *nlxB* among Shiga toxin-producing

Escherichia coli strains. *Heliyon*, 6(6), e04277.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04277>

Cai, K., Gao, X., Li, T., Wang, Q., Hou, X., Tu, W., Xiao, L., Tian, M., Liu, Y., & Wang, H. (2011). Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine*, 29(5), 946–952.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.035>

Capozzo, A. V., Pistone Creydt, V., Dran, G., Fernández, G., Gómez, S., Bentancor, L. V., Rubel, C., Ibarra, C., Isturiz, M., & Palermo, M. S. (2003). Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. *Infection and immunity*, 71(7), 3971–3978. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3971-3978.2003>

Carbonari, C. C., Miliwebsky, E. S., Zolezzi, G., Deza, N. L., Fittipaldi, N., Manfredi, E., Baschkier, A., D'Astek, B. A., Melano, R. G., Schesi, C., Rivas, M., & Chinen, I. (2022). The Importance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145:NM[H28]/H28 Infections in Argentina, 1998-2020. *Microorganisms*, 10(3), 582.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030582>

Carlson-Banning, K. M., & Sperandio, V. (2016). Catabolite and Oxygen Regulation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence. *mBio*, 7(6), e01852-16.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01852-16>

Carvalho, A., Giovannini, G., De Luca, A., D'Angelo, C., Casagrande, A., Iannitti, R. G., Ricci, G., Cunha, C., & Romani, L. (2012). Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cellular & molecular immunology*, 9(3), 276–286. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.1>

Cazorla, S. I., Maldonado-Galdeano, C., Weill, R., De Paula, J., & Perdigón, G. D. V. (2018). Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Frontiers in microbiology*, 9, 736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00736>

Cebra J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1046S–1051S.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>

Chairatana, P., & Nolan, E. M. (2017). Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 52(1), 45–56.  
<https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1243654>

Chakraborty, S., Harro, C., DeNearing, B., Ram, M., Feller, A., Cage, A., Bauers, N., Bourgeois, A. L., Walker, R., & Sack, D. A. (2015). Characterization of Mucosal Immune Responses to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine Antigens in a Human Challenge Model: Response Profiles after Primary Infection and Homologous Rechallenge with Strain H10407. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 23(1), 55–64.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00617-15>

Chan, T. D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., & Brink, R. (2009). Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), 3139–3149.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901690>

- Chang, S. Y., Ko, H. J., & Kweon, M. N. (2014). Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Experimental & molecular medicine*, 46(3), e84. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.16>
- Chavele, K. M., Merry, E., & Ehrenstein, M. R. (2015). Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(6), 2482–2485. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401190>
- Chen, D., Periwal, S. B., Larrivee, K., Zuleger, C., Erickson, C. A., Endres, R. L., & Payne, L. G. (2001). Serum and mucosal immune responses to an inactivated influenza virus vaccine induced by epidermal powder immunization. *Journal of virology*, 75(17), 7956–7965. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.7956-7965.2001>
- Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K., & Cerutti, A. (2020). Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature reviews. Immunology*, 20(7), 427–441. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0261-1>
- Cheng, H., Guan, X., Chen, D., & Ma, W. (2019). The Th17/Treg Cell Balance: A Gut Microbiota-Modulated Story. *Microorganisms*, 7(12), 583. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120583>
- Chirido, F. (2008) Inmunidad en las mucosas. *Introducción a la Inmunología Humana 5ª ed.* (357-376).
- Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M. E., Schaeveerbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Frontiers in immunology*, 8, 1678. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678>
- Chun, E., Lavoie, S., Fonseca-Pereira, D., Bae, S., Michaud, M., Hoveyda, H. R., Fraser, G. L., Gallini Comeau, C. A., Glickman, J. N., Fuller, M. H., Layden, B. T., & Garrett, W. S. (2019). Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity. *Immunity*, 51(5), 871–884.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.014>
- CICCRA, Informe económico mensual N° 254. Cámara de la industria y comercio de carnes y derivados de la República Argentina. 2022.
- Conrady, D. G., Flagler, M. J., Friedmann, D. R., Vander Wielen, B. D., Kovall, R. A., Weiss, A. A., & Herr, A. B. (2010). Molecular basis of differential B-pentamer stability of Shiga toxins 1 and 2. *PloS one*, 5(12), e15153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015153>
- Coombs B.K., Wickham M.E., Mascarenhas M., Gruenheid S., Finlay B.B., Karmali M.A. (2018). “Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli strains”. *Appl Environ Microbiol* (7):2153-60.
- Corrigan, J. J., Jr, & Boineau, F. G. (2001). Hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics in review*, 22(11), 365–369.
- Costigan, C., Raftery, T., Carroll, A. G., Wildes, D., Reynolds, C., Cunney, R., Dolan, N., Drew, R. J., Lynch, B. J., O'Rourke, D. J., Stack, M., Sweeney, C., Shahwan, A., Twomey, E., Waldron, M., Riordan, M., Awan, A., & Gorman, K. M. (2022). Neurological involvement in children with hemolytic uremic syndrome. *European journal of pediatrics*, 181(2), 501–512. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04200-1>

Cottignies-Calamarte, A., Tudor, D., & Bomsel, M. (2023). Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Frontiers in immunology*, 14, 1037033. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1037033>

Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B. (2013). "Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*". *Clin Microbiol Rev* 26(4):822-80.

Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>

Cullender, T. C., Chassaing, B., Janzon, A., Kumar, K., Muller, C. E., Werner, J. J., Angenent, L. T., Bell, M. E., Hay, A. G., Peterson, D. A., Walter, J., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A. T., & Ley, R. E. (2013). Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut. *Cell host & microbe*, 14(5), 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.009>

Cunningham, A. F., Khan, M., Ball, J., Toellner, K. M., Serre, K., Mohr, E., & MacLennan, I. C. (2004). Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *European journal of immunology*, 34(11), 2986–2995. <https://doi.org/10.1002/eji.200425403>

Dai, G., Noell, K., Weckbecker, G., & Kolls, J. K. (2021). Effect of Subcutaneous Anti-CD20 Antibody-Mediated B Cell Depletion on Susceptibility to *Pneumocystis* Infection in Mice. *mSphere*, 6(3), e01144-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01144-20>

Datta, S. S., De, D., & Naik, A. (2021). Diagnosis and management of hemolytic uremic syndrome in children: A transfusionist's perspective. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 6(1), 96-99.

de Buys Roessingh, A. S., de Lagausie, P., Baudoin, V., Loirat, C., & Aigrain, Y. (2007). Gastrointestinal complications of post-diarrheal hemolytic uremic syndrome. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 17(5), 328–334. <https://doi.org/10.1055/s-2007-965013>

De Magistris M. T. (2006). Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. *Advanced drug delivery reviews*, 58(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.002>

de Sousa-Pereira, P., & Woof, J. M. (2019). IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4), 57. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>

Del Pozo-Yauner, L., Herrera, G. A., Perez Carreon, J. I., Turbat-Herrera, E. A., Rodriguez-Alvarez, F. J., & Ruiz Zamora, R. A. (2023). Role of the mechanisms for antibody repertoire diversification in monoclonal light chain deposition disorders: when a friend becomes foe. *Frontiers in immunology*, 14, 1203425. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1203425>

den Besten, G., Gerding, A., van Dijk, T. H., Ciapaite, J., Bleeker, A., van Eunen, K., Havinga, R., Groen, A. K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2015). Protection against the Metabolic Syndrome by Guar Gum-Derived Short-Chain Fatty Acids Depends on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Glucagon-Like Peptide-1. *PloS one*, 10(8), e0136364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136364>

Deng, Q., Chen, H., Liu, Y., Xiao, F., Guo, L., Liu, D., Cheng, X., Zhao, M., Wang, X., Xie, S., Qi, S., Yin, Z., Gao, J., Chen, X., Wang, J., Guo, N., Ma, Y., & Shi, M. (2016). Psychological stress promotes neutrophil infiltration in colon tissue through adrenergic signaling in DSS-induced colitis model. *Brain, behavior, and immunity*, 57, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.017>

Diaz, R. L., Hoang, L., Wang, J., Vela, J. L., Jenkins, S., Aranda, R., & Martín, M. G. (2004). Maternal adaptive immunity influences the intestinal microflora of suckling mice. *The Journal of nutrition*, 134(9), 2359–2364. <https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2359>

Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L. A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J. P., & Sirard, J. C. (2004). Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(11), 6922–6930. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6922>

Diepold, A., & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1679), 20150020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0020>

Dillon, A., & Lo, D. D. (2019). M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Frontiers in immunology*, 10, 1499. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01499>

DiLuzio, W. R., Turner, L., Mayer, M., Garstecki, P., Weibel, D. B., Berg, H. C., & Whitesides, G. M. (2005). *Escherichia coli* swim on the right-hand side. *Nature*, 435(7046), 1271–1274. <https://doi.org/10.1038/nature03660>

Domingo, S., Díaz, R., & Gamazo, C. (1995). Antibiotic treatment induces an increase of the specific antibody levels in *Brucella melitensis* infected mice. *FEMS immunology and medical microbiology*, 12(2), 91–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00180.x>

Dowling, T. C., Chavillaz, P. A., Young, D. G., Melton-Celsa, A., O'Brien, A., Thuning-Roberson, C., Edelman, R., & Tacket, C. O. (2005). Phase 1 safety and pharmacokinetic study of chimeric murine-human monoclonal antibody c alpha Stx2 administered intravenously to healthy adult volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1808–1812. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1808-1812.2005>

Dran, G. I., Fernández, G. C., Rubel, C. J., Bermejo, E., Gomez, S., Meiss, R., Isturiz, M. A., & Palermo, M. S. (2002). Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney international*, 62(4), 1338–1348. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid554.x>

Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K., & Hutchinson, S. J. (2001). The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(7), 923–931. <https://doi.org/10.1086/322598>

Dyatlov, I. A., Svetoch, E. A., Mironenko, A. A., Eruslanov, B. V., Firstova, V. V., Fursova, N. K., Kovalchuk, A. L., Lvov, V. L., & Aparin, P. G. (2022). Molecular Lipopolysaccharide Di-Vaccine Protects from Shiga-Toxin Producing Epidemic Strains of *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4. *Vaccines*, 10(11), 1854. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111854>

Dziva, F., Vlisidou, I., Crepin, V. F., Wallis, T. S., Frankel, G., & Stevens, M. P. (2007). Vaccination of calves with EspA, a key colonisation factor of *Escherichia coli* O157:H7, induces antigen-specific humoral responses but does not confer protection against intestinal colonisation. *Veterinary microbiology*, 123(1-3), 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.016>

Eaton, K. A., Fontaine, C., Friedman, D. I., Conti, N., & Alteri, C. J. (2017). Pathogenesis of Colitis in Germ-Free Mice Infected With EHEC O157:H7. *Veterinary pathology*, 54(4), 710–719. <https://doi.org/10.1177/0300985817691582>

Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2015). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PloS one*, 10(12), e0144611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144611>

Ehrenstein, M. R., & Notley, C. A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature reviews. Immunology*, 10(11), 778–786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>

Elderman, M., Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., van Beek, A., de Haan, B., Savelkoul, H., de Vos, P., & Faas, M. (2018). Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biology of sex differences*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0186-6>

Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C. S., Jakesevic, M., Rune, I., Tranberg, B., Vogensen, F. K., Nielsen, D. S., Bahl, M. I., Licht, T. R., Hansen, A. K., & Hansen, C. H. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Scientific reports*, 4, 5922. <https://doi.org/10.1038/srep05922>

Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., & Girón, J. A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(20), 7426–7435. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-07>

Errea, A., González Maciel, D., Hiriart, Y., Hozbor, D., & Rumbo, M. (2015). Intranasal administration of TLR agonists induces a discriminated local innate response along murine respiratory tract. *Immunology letters*, 164(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.01.004>

Etcheverría A.I., Padola N.L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4(5):366-72.

Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T. C., Kageyama, R., Yusuf, I., & Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T<sub>fh</sub>) differentiation. *PloS one*, 6(3), e17739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017739>

Ewing, M. M., Karper, J. C., Abdul, S., de Jong, R. C., Peters, H. A., de Vries, M. R., Redeker, A., Kuiper, J., Toes, R. E., Arens, R., Jukema, J. W., & Quax, P. H. (2013). T-cell co-stimulation by CD28-CD80/86 and its negative regulator CTLA-4 strongly influence accelerated atherosclerosis development. *International journal of cardiology*, 168(3), 1965–1974. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.12.085>

Exton M. S. (1997). Infection-induced anorexia: active host defence strategy. *Appetite*, 29(3), 369–383. <https://doi.org/10.1006/appe.1997.0116>

Fakhouri, F., Roumenina, L., Provot, F., Sallée, M., Caillard, S., Couzi, L., Essig, M., Ribes, D., Dragon-Durey, M. A., Bridoux, F., Rondeau, E., & Frémeaux-Bacchi, V. (2010). Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(5), 859–867. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009070706>

Farfan, M. J., Cantero, L., Vergara, A., Vidal, R., & Torres, A. G. (2013). The long polar fimbriae of STEC O157:H7 induce expression of pro-inflammatory markers by intestinal epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.017>

Farooq, S. M., & Ashour, H. M. (2021). Type II Collagen-Specific B Cells Induce Immune Tolerance in Th1-Skewed, Th2-Skewed, and Arthritis-Prone Strains of Mice. *Cells*, 10(4), 870. <https://doi.org/10.3390/cells10040870>

Feitz, W. J. C., Bouwmeester, R., van der Velden, T. J. A. M., Goorden, S., Licht, C., van den Heuvel, L. P. J. W., & van de Kar, N. C. A. J. (2021). The Shiga Toxin Receptor Globotriaosylceramide as Therapeutic Target in Shiga Toxin E. coli Mediated HUS. *Microorganisms*, 9(10), 2157. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102157>

Fernandez, G. C., Lopez, M. F., Gomez, S. A., Ramos, M. V., Bentancor, L. V., Fernandez-Brando, R. J., Landoni, V. I., Dran, G. I., Meiss, R., Isturiz, M. A., & Palermo, M. S. (2006). Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clinical and experimental immunology*, 146(1), 76–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03155.x>

Fernández, G. C., Rubel, C., Dran, G., Gómez, S., Isturiz, M. A., & Palermo, M. S. (2000). Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 95(3), 227–234. <https://doi.org/10.1006/clim.2000.4862>

Fernández-Brando R.J, & Ramos M.V. (2015). Cap. 2: “Participación de la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)” en “Síndrome Urémico Hemolítico post-entérico: Actualización en patogénesis, diagnóstico y tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico asociado a la toxina Shiga”. Editorial académica española. pp: 13-20

Fernández-Brando, R. J., Bentancor, L. V., Mejías, M. P., Ramos, M. V., Exeni, A., Exeni, C., Laso, M.delC., Exeni, R., Isturiz, M. A., & Palermo, M. S. (2011). Antibody response to Shiga toxins in Argentinean children with enteropathic hemolytic uremic syndrome at acute and long-term follow-up periods. *PloS one*, 6(4), e19136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019136>

Fernandez-Brando, R. J., Cabrera, G., Baschkier, A., Mejías, M. P., Panek, C. A., Miliwebsky, E., Abrey-Recalde, M. J., Bentancor, L. V., Ramos, M. V., Rivas, M., & Palermo, M. S. (2014). Oral administration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* induces intestinal and systemic specific immune response in mice. *Medical microbiology and immunology*, 203(3), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00430-013-0325-y>

Fernandez-Brando, R. J., McAteer, S. P., Montañez-Culma, J., Cortés-Araya, Y., Tree, J., Bernal, A., Fuentes, F., Fitzgerald, S., Pineda, G. E., Ramos, M. V., Gally, D. L., & Palermo, M. S. (2020). Mechanisms involved in the adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to the

host intestinal microenvironment. *Clinical science (London, England : 1979)*, 134(24), 3283–3301. <https://doi.org/10.1042/CS20200971>

Ferreira, B. L., Ferreira, É. R., de Brito, M. V., Salu, B. R., Oliva, M. L. V., Mortara, R. A., & Orikaza, C. M. (2018). BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Frontiers in microbiology*, 9, 553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00553>

Fiorentino, G. A., Miliwebsky, E., Ramos, M. V., Zolezzi, G., Chinen, I., Guzmán, G., Nocera, R., Fernández-Brando, R., Santiago, A., Exeni, R., & Palermo, M. S. (2023). Etiological diagnosis of post-diarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS): humoral response contribution. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 38(3), 739–748. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05671-6>

Foster J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature reviews. Microbiology*, 2(11), 898–907. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1021>

Fougeron, D., Van Maele, L., Songhet, P., Cayet, D., Hot, D., Van Rooijen, N., Mollenkopf, H. J., Hardt, W. D., Benecke, A. G., & Sirard, J. C. (2015). Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine*, 33(29), 3331–3341. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.022>

Francino M. P. (2014). Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(3), 769–790. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030769>

Frankel, G., & Phillips, A. D. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular microbiology*, 10(3), 549–556. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01103.x>

Fransen, F., Zagato, E., Mazzini, E., Fosso, B., Manzari, C., El Aidy, S., Chiavelli, A., D'Erchia, A. M., Sethi, M. K., Pabst, O., Marzano, M., Moretti, S., Romani, L., Penna, G., Pesole, G., & Rescigno, M. (2015). BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity*, 43(3), 527–540. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.011>

Fu, H., Wang, A., Mauro, C., & Marelli-Berg, F. (2013). T lymphocyte trafficking: molecules and mechanisms. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 18(2), 422–440. <https://doi.org/10.2741/4111>

Fu, Y. Y., Egorova, A., Sobieski, C., Kuttiyara, J., Calafiore, M., Takashima, S., Clevers, H., & Hanash, A. M. (2019). T Cell Recruitment to the Intestinal Stem Cell Compartment Drives Immune-Mediated Intestinal Damage after Allogeneic Transplantation. *Immunity*, 51(1), 90–103.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.003>

Fuhrer, A., Sprenger, N., Kurakevich, E., Borsig, L., Chassard, C., & Hennet, T. (2010). Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization. *The Journal of experimental medicine*, 207(13), 2843–2854. <https://doi.org/10.1084/jem.20101098>

Fujimoto, K., Karuppuchamy, T., Takemura, N., Shimohigoshi, M., Machida, T., Haseda, Y., Aoshi, T., Ishii, K. J., Akira, S., & Uematsu, S. (2011). A new subset of CD103<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1

response and CTL activity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 186(11), 6287–6295. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004036>

Fukata, M., & Arditi, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal immunology*, 6(3), 451–463. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.13>

Gandhi, T., Patki, M., Kong, J., Koya, J., Yoganathan, S., Reznik, S., & Patel, K. (2019). Development of an Arginine Anchored Nanoglobule with Retrograde Trafficking Inhibitor (Retro-2) for the Treatment of an Enterohemorrhagic Escherichia coli Outbreak. *Molecular pharmaceutics*, 16(10), 4405–4415. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00727>

Gao, X., Cai, K., Shi, J., Liu, H., Hou, X., Tu, W., Xiao, L., Wang, Q., & Wang, H. (2009). Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection. *Vaccine*, 27(14), 2070–2076. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.115>

Gao, X., Wang, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Lubos, M. L., Huang, M., Olsen, R., Mushegian, A., Slawson, C., & Hardwidge, P. R. (2013). NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *Cell host & microbe*, 13(1), 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.010>

Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and immunity*, 73(5), 2573–2585. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005>

Gassen, R. B., Fazolo, T., Nascimento de Freitas, D., Borges, T. J., Lima, K., Antunes, G. L., Maito, F., Bueno Mendes, D. A., Báfica, A., Rodrigues, L. C., Jr, Stein, R., Duarte de Souza, A. P., & Bonorino, C. (2021). IL-21 treatment recovers follicular helper T cells and neutralizing antibody production in respiratory syncytial virus infection. *Immunology and cell biology*, 99(3), 309–322. <https://doi.org/10.1111/imcb.12418>

Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 167(4), 1882–1885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1882>

Ghaffari Marandi, B. H., Zolfaghari, M. R., Kazemi, R., Motamedi, M. J., & Amani, J. (2019). Immunization against Vibrio cholerae, ETEC, and EHEC with chitosan nanoparticle containing LSC chimeric protein. *Microbial pathogenesis*, 134, 103600. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103600>

Ghosh, E., Yoshimoto, M., Nakauchi, H., Weissman, I. L., & Herzenberg, L. A. (2019). Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis and the origins of innate-like B lymphocytes. *Development* (Cambridge, England), 146(15), dev170571. <https://doi.org/10.1242/dev.170571>

Girard, M. C., Sacerdoti, F., Rivera, F. P., Repetto, H. A., Ibarra, C., & Amaral, M. M. (2015). Prevention of renal damage caused by Shiga toxin type 2: Action of Miglustat on human endothelial and epithelial cells. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 105, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.021>

Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>

Gordon S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–930. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01201-1)

Gordon, V. M., Whipp, S. C., Moon, H. W., O'Brien, A. D., & Samuel, J. E. (1992). An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infection and immunity*, 60(2), 485–490. <https://doi.org/10.1128/iai.60.2.485-490.1992>

Gorjifard, S., & Goldszmid, R. S. (2016). Microbiota-myeloid cell crosstalk beyond the gut. *Journal of leukocyte biology*, 100(5), 865–879. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RI0516-222R>

Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., White, P. L., Wymore, K., Gierke, R. E., Mahon, B. E., Griffin, P. M., & Emerging Infections Program Foodnet Working Group (2013). Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne pathogens and disease*, 10(5), 453–460. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1401>

Goverse, G., Olivier, B. J., Molenaar, R., Knippenberg, M., Greuter, M., Konijn, T., Cook, E. C., Beijer, M. R., Fedor, D. M., den Haan, J. M., Napoli, J. L., Bouma, G., & Mebius, R. E. (2015). Vitamin A metabolism and mucosal immune function are distinct between BALB/c and C57BL/6 mice. *European journal of immunology*, 45(1), 89–100. <https://doi.org/10.1002/eji.201343340>

Grainger, J., Daw, R., & Wemyss, K. (2018). Systemic instruction of cell-mediated immunity by the intestinal microbiome. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1910. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14633.1>

Granato, A., Hayashi, E. A., Baptista, B. J., Bellio, M., & Nobrega, A. (2014). IL-4 regulates Bim expression and promotes B cell maturation in synergy with BAFF conferring resistance to cell death at negative selection checkpoints. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 192(12), 5761–5775. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300749>

Grasset, E. K., Chorny, A., Casas-Recasens, S., Gutzeit, C., Bongers, G., Thomsen, I., Chen, L., He, Z., Matthews, D. B., Oropallo, M. A., Veeramreddy, P., Uzzan, M., Mortha, A., Carrillo, J., Reis, B. S., Ramanujam, M., Sintes, J., Magri, G., Maglione, P. J., Cunningham-Rundles, C., ... Cerutti, A. (2020). Gut T cell-independent IgA responses to commensal bacteria require engagement of the TACI receptor on B cells. *Science immunology*, 5(49), eaat7117. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat7117>

Gross, M., Salame, T. M., & Jung, S. (2015). Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*, 6, 254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00254>

Guth, B. E. C., Prado, V., Rivas, M. (2010). “Shiga toxin-producing *Escherichia coli*” en *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Betham Science: Bentham, UK, pp. 65–83.

Gutierrez, D., Weinstock, A., Antharam, V. C., Gu, H., Jasbi, P., Shi, X., Dirks, B., Krajmalnik-Brown, R., Maldonado, J., Guinan, J., & Thangamani, S. (2020). Antibiotic-induced gut metabolome and microbiome alterations increase the susceptibility to *Candida albicans* colonization in the gastrointestinal tract. *FEMS microbiology ecology*, 96(1), fiz187. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz187>

Ha, S. A., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T., & Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *The Journal of experimental medicine*, 203(11), 2541–2550. <https://doi.org/10.1084/jem.20061041>

Haas K. M. (2015). B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362(1), 98–109. <https://doi.org/10.1111/nyas.12760>

Habibi, M., Asadi Karam, M. R., Shokrgozar, M. A., Oloomi, M., Jafari, A., & Bouzari, S. (2015). Intranasal immunization with fusion protein MrpH-FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Molecular immunology*, 64(2), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.008>

Habtezion, A., Nguyen, L. P., Hadeiba, H., & Butcher, E. C. (2016). Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*, 150(2), 340–354. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.046>

Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242–1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>

Hall, G., Kurosawa, S., & Stearns-Kurosawa, D. J. (2018). Dextran Sulfate Sodium Colitis Facilitates Colonization with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: a Novel Murine Model for the Study of Shiga Toxicosis. *Infection and immunity*, 86(11), e00530-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00530-18>

Halliley, J. L., Tipton, C. M., Liesveld, J., Rosenberg, A. F., Darce, J., Gregoret, I. V., Popova, L., Kaminiski, D., Fucile, C. F., Albizua, I., Kyu, S., Chiang, K. Y., Bradley, K. T., Burack, R., Slifka, M., Hammarlund, E., Wu, H., Zhao, L., Walsh, E. E., Falsey, A. R., ... Lee, F. E. (2015). Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity*, 43(1), 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.016>

Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., & Kobata, T. (2020). IL-21 and IL-5 coordinately induce surface IgA+ cells. *Immunology letters*, 224, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.05.004>

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>

Herlihey, F. A., & Clarke, A. J. (2017). Controlling Autolysis During Flagella Insertion in Gram-Negative Bacteria. *Advances in experimental medicine and biology*, 925, 41–56. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_52](https://doi.org/10.1007/5584_2016_52)

Hervas-Stubbs, S., Mancheño, U., Riezu-Boj, J. I., Larraga, A., Ochoa, M. C., Alignani, D., Alfaro, C., Morales-Kastresana, A., Gonzalez, I., Larrea, E., Pircher, H., Le Bon, A., Lopez-

Picazo, J. M., Martín-Algarra, S., Prieto, J., & Melero, I. (2012). CD8 T cell priming in the presence of IFN- $\alpha$  renders CTLs with improved responsiveness to homeostatic cytokines and recall antigens: important traits for adoptive T cell therapy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 189(7), 3299–3310. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102495>

HespeL, C., & Moser, M. (2012). Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *European journal of immunology*, 42(10), 2535–2543. <https://doi.org/10.1002/eji.201242480>

Hews, C. L., Tran, S. L., Wegmann, U., Brett, B., Walsham, A. D. S., Kavanaugh, D., Ward, N. J., Juge, N., & Schüller, S. (2017). The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium *ex vivo*. *Cellular microbiology*, 19(6), e12717. <https://doi.org/10.1111/cmi.12717>

Hiriart, Y., Errea, A., González Maciel, D., Lopez, J. C., & Rumbo, M. (2012). A method for the purification of bacterial flagellin that allows simple upscaling. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28(1), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0786-3>

Hiriart, Y., Pardo, R., Bukata, L., Lauché, C., Muñoz, L., Berengeno, A. L., Colonna, M., Ortega, H. H., Goldbaum, F. A., Sanguineti, S., & Zylberman, V. (2019). Preclinical Studies of NEAST (Neutralizing Equine Anti-Shiga Toxin): A Potential Treatment for Prevention of *Stec*-Hus. *International Journal of Drug Development and Research*, 11(3), 15-24.

Ho, N. K., Henry, A. C., Johnson-Henry, K., & Sherman, P. M. (2013). Pathogenicity, host responses and implications for management of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 27(5), 281–285. <https://doi.org/10.1155/2013/138673>

Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 11(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>

Holodick, N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N., & Hernández, A. M. (2017). Defining Natural Antibodies. *Frontiers in immunology*, 8, 872. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00872>

Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. J., & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 195(8), 3665–3674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402898>

Iacob, S., Iacob, D. G., & Luminos, L. M. (2019). Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats. *Frontiers in microbiology*, 9, 3328. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03328>

Iannino, F., Uriza, P. J., Duarte, C. M., Pepe, M. V., Roset, M. S., & Briones, G. (2022). Development of a *Salmonella*-based oral vaccine to control intestinal colonization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in animals. *Vaccine*, 40(8), 1065–1073. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.01.032>

Ibarra, C., & Palermo, M. S. (2010). “Host Response to Pathogenic *Escherichia coli*” en *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Betham Science: Bentham, UK, pp. 122-141.

- Idland, L., Bø-Granquist, E. G., Aspholm, M., & Lindbäck, T. (2022). The Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* to Grow in Raw Cow's Milk Stored at Low Temperatures. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(21), 3411. <https://doi.org/10.3390/foods11213411>
- Imdad, A., Mackoff, S. P., Urciuoli, D. M., Syed, T., Tanner-Smith, E. E., Huang, D., & Gomez-Duarte, O. G. (2021). Interventions for preventing diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*, 7(7), CD012997. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012997.pub2>
- Iraporda, C., Romanin, D. E., Bengoa, A. A., Errea, A. J., Cayet, D., Foligné, B., Sirard, J. C., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Rumbo, M. (2016). Local Treatment with Lactate Prevents Intestinal Inflammation in the TNBS-Induced Colitis Model. *Frontiers in immunology*, 7, 651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00651>
- Ishikawa, Y., Kitaoka, S., Kawano, Y., Ishii, S., Suzuki, T., Wakahashi, K., Kato, T., Katayama, Y., & Furuyashiki, T. (2021). Repeated social defeat stress induces neutrophil mobilization in mice: maintenance after cessation of stress and strain-dependent difference in response. *British journal of pharmacology*, 178(4), 827–844. <https://doi.org/10.1111/bph.15203>
- Jang, Y. S., Seo, G. Y., Lee, J. M., Seo, H. Y., Han, H. J., Kim, S. J., Jin, B. R., Kim, H. J., Park, S. R., Rhee, K. J., Kim, W. S., & Kim, P. H. (2015). Lactoferrin causes IgA and IgG2b isotype switching through betaglycan binding and activation of canonical TGF- $\beta$  signaling. *Mucosal immunology*, 8(4), 906–917. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.121>
- Johannes, L., & Römer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature reviews. Microbiology*, 8(2), 105–116. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2279>
- Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Jokiranta T. S. (2017). HUS and atypical HUS. *Blood*, 129(21), 2847–2856. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-709865>
- Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins*, 12(2), 67. <https://doi.org/10.3390/toxins12020067>
- Kadaoui, K. A., & Corthésy, B. (2007). Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(11), 7751–7757. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7751>
- Kamada, N., Sakamoto, K., Seo, S. U., Zeng, M. Y., Kim, Y. G., Cascalho, M., Vallance, B. A., Puente, J. L., & Núñez, G. (2015). Humoral Immunity in the Gut Selectively Targets Phenotypically Virulent Attaching-and-Effacing Bacteria for Intraluminal Elimination. *Cell host & microbe*, 17(5), 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.001>
- Kanra, G. Y., Ozen, H., & Kara, A. (2006). Infection and anorexia. *The Turkish journal of pediatrics*, 48(4), 279–287.

- Karlsson, J., Pütsep, K., Chu, H., Kays, R. J., Bevins, C. L., & Andersson, M. (2008). Regional variations in Paneth cell antimicrobial peptide expression along the mouse intestinal tract. *BMC immunology*, 9, 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-37>
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Petric, M., Dutil, L., Rahn, K., Ludwig, K., Arbus, G. S., Michel, P., Sherman, P. M., Wilson, J., Johnson, R., & Kaper, J. B. (2003). Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *The Journal of infectious diseases*, 188(11), 1724–1729. <https://doi.org/10.1086/379726>
- Karpman, D., & Ståhl, A. L. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenesis and the Host Response. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0009-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0009-2013>
- Karpman, D., Békássy, Z. D., Sjögren, A. C., Dubois, M. S., Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Jarvis, K. G., Gansheroff, L. J., O'Brien, A. D., Arbus, G. S., & Kaper, J. B. (2002). Antibodies to intimin and *Escherichia coli* secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 17(3), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s00467-001-0792-z>
- Karpman, D., Håkansson, A., Perez, M. T., Isaksson, C., Carlemalm, E., Caprioli, A., & Svanborg, C. (1998). Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Infection and immunity*, 66(2), 636–644. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.636-644.1998>
- Karpman, D., Loos, S., Tati, R., & Arvidsson, I. (2017). Haemolytic uraemic syndrome. *Journal of internal medicine*, 281(2), 123–148. <https://doi.org/10.1111/joim.12546>
- Karpman, D., Papadopoulou, D., Nilsson, K., Sjögren, A. C., Mikaelsson, C., & Lethagen, S. (2001). Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 97(10), 3100–3108. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3100>
- Kashiwada, M., Levy, D. M., McKeag, L., Murray, K., Schröder, A. J., Canfield, S. M., Traver, G., & Rothman, P. B. (2010). IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 821–826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909235107>
- Kavaliauskiene, S., Dyve Lingelem, A. B., Skotland, T., & Sandvig, K. (2017). Protection against Shiga Toxins. *Toxins*, 9(2), 44. <https://doi.org/10.3390/toxins9020044>
- Kavanagh, D., Goodship, T. H., & Richards, A. (2013). Atypical hemolytic uremic syndrome. *Seminars in nephrology*, 33(6), 508–530. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.08.003>
- Keepers T.R., Psocka M. A., Gross L.K., Obrig T.G. (2006). "A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease." *J Am Soc Nephrol* 17(12): 3404-14.
- Kerr M. A. (1990). The structure and function of human IgA. *The Biochemical journal*, 271(2), 285–296. <https://doi.org/10.1042/bj2710285>
- Khalid, M., & Andreoli, S. (2019). Extrarenal manifestations of the hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC HUS). *Pediatric*

nephrology (Berlin, Germany), 34(12), 2495–2507. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4105-1>

Khani, M. H., Bagheri, M., Zahmatkesh, A., Aghaiypour, K., & Mirjalili, A. (2020). Effect of flagellin on inhibition of infectious mechanisms by activating opsonization and salmonella flagellum disruption. *Microbial pathogenesis*, 142, 104057. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104057>

Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., & Mazmanian, S. K. (2014). Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell host & microbe*, 15(3), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.006>

Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological reviews*, 279(1), 90–105. <https://doi.org/10.1111/imr.12563>

Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology*, 40(7), 1830–1835. <https://doi.org/10.1002/eji.201040391>

Konjar, Š., Ferreira, C., Blankenhaus, B., & Veldhoen, M. (2017). Intestinal Barrier Interactions with Specialized CD8 T Cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1281. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01281>

Korach-Rechtman, H., Freilich, S., Gerassy-Vainberg, S., Buhnik-Rosenblau, K., Danin-Poleg, Y., Bar, H., & Kashi, Y. (2019). Murine Genetic Background Has a Stronger Impact on the Composition of the Gut Microbiota than Maternal Inoculation or Exposure to Unlike Exogenous Microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 85(18), e00826-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00826-19>

Kordbacheh, E., Nazarian, S., Hajizadeh, A., Fasihi-Ramandi, M., & Fathi, J. (2019). Recombinant HcpA-EspA-Tir-Stx2B chimeric protein induces immunity against attachment and toxicity of *Escherichia coli* O157:H7. *Microbial pathogenesis*, 129, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.004>

Koskela, T., Puustinen, S., Salonen, V., & Mutikainen, P. (2002). Resistance and tolerance in a host plant-holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. *Evolution; international journal of organic evolution*, 56(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01403.x>

Kreutzberger, M. A. B., Sobe, R. C., Sauder, A. B., Chatterjee, S., Peña, A., Wang, F., Giron, J. A., Kiessling, V., Costa, T. R. D., Conticello, V. P., Frankel, G., Kendall, M. M., Scharf, B. E., & Egelman, E. H. (2022). Flagellin outer domain dimerization modulates motility in pathogenic and soil bacteria from viscous environments. *Nature communications*, 13(1), 1422. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29069-y>

Krueger, P. D., Osum, K. C., & Jenkins, M. K. (2021). CD4+ Memory T-Cell Formation during Type 1 Immune Responses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 13(12), a038141. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038141>

Kumar G. (2018). Principle and Method of Silver Staining of Proteins Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1853, 231–236. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0_26)

- Kurioka, T., Yunou, Y., & Kita, E. (1998). Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infection and immunity*, 66(4), 1726–1734. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.4.1726-1734.1998>
- Laplagne, D. A., Zylberman, V., Ainciart, N., Steward, M. W., Sciutto, E., Fossati, C. A., & Goldbaum, F. A. (2004). Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins*, 57(4), 820–828. <https://doi.org/10.1002/prot.20248>
- Larsen, S. B., Cowley, C. J., & Fuchs, E. (2020). Epithelial cells: liaisons of immunity. *Current opinion in immunology*, 62, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.004>
- Lawrence J. G. (2005). Common themes in the genome strategies of pathogens. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.007>
- Lawrence, M. G., Woodfolk, J. A., Schuyler, A. J., Stillman, L. C., Chapman, M. D., & Platts-Mills, T. A. (2017). Half-life of IgE in serum and skin: Consequences for anti-IgE therapy in patients with allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139(2), 422–428.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.056>
- Lazar, V., Ditu, L. M., Pircalabioru, G. G., Gheorghe, I., Curutiu, C., Holban, A. M., Picu, A., Petcu, L., & Chifiriuc, M. C. (2018). Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in immunology*, 9, 1830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01830>
- Lewis, S. B., Prior, A., Ellis, S. J., Cook, V., Chan, S. S., Gelson, W., & Schüller, S. (2016). Flagellin Induces  $\beta$ -Defensin 2 in Human Colonic Ex vivo Infection with Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 68. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00068>
- Li, M., Wang, Y., Sun, Y., Cui, H., Zhu, S. J., & Qiu, H. J. (2020). Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunology letters*, 217, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.013>
- Li, Y., Jin, L., & Chen, T. (2020). The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *BioMed research international*, 2020, 2032057. <https://doi.org/10.1155/2020/2032057>
- Li, Y., Wei, C., Xu, H., Jia, J., Wei, Z., Guo, R., Jia, Y., Wu, Y., Li, Y., Qi, X., Li, Z., & Gao, X. (2018). The Immunoregulation of Th17 in Host against Intracellular Bacterial Infection. *Mediators of inflammation*, 2018, 6587296. <https://doi.org/10.1155/2018/6587296>
- Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M., & Vance, R. E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nature immunology*, 9(10), 1171–1178. <https://doi.org/10.1038/ni.1646>
- Lin, R., Zhang, Y., Long, B., Li, Y., Wu, Y., Duan, S., Zhu, B., Wu, X., & Fan, H. (2017). Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus acidophilus* Expressing espA-Tir-M Confers Protection against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Challenge in Mice. *Frontiers in microbiology*, 8, 417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00417>
- Lindner, C., Wahl, B., Föhse, L., Suerbaum, S., Macpherson, A. J., Prinz, I., & Pabst, O. (2012). Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the

intestine. *The Journal of experimental medicine*, 209(2), 365–377. <https://doi.org/10.1084/jem.20111980>

Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., & Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nature immunology*, 3(9), 822–829. <https://doi.org/10.1038/ni829>

Liu, F. T., Goodarzi, H., & Chen, H. Y. (2011). IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 41(3), 298–310. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8252-4>

Liu, H., Chen, F., Wu, W., Cao, A. T., Xue, X., Yao, S., Evans-Marin, H. L., Li, Y. Q., & Cong, Y. (2016). TLR5 mediates CD172a(+) intestinal lamina propria dendritic cell induction of Th17 cells. *Scientific reports*, 6, 22040. <https://doi.org/10.1038/srep22040>

Liu, T., Nishimura, H., Matsuguchi, T., & Yoshikai, Y. (2000). Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cellular immunology*, 202(1), 31–40. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1644>

Liu, X., Li, X., Xia, B., Jin, X., Zou, Q., Zeng, Z., Zhao, W., Yan, S., Li, L., Yuan, S., Zhao, S., Dai, X., Yin, F., Cadenas, E., Liu, R. H., Zhao, B., Hou, M., Liu, Z., & Liu, X. (2021). High-fiber diet mitigates maternal obesity-induced cognitive and social dysfunction in the offspring via gut-brain axis. *Cell metabolism*, 33(5), 923–938.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.02.002>

Loirat, C., Fakhouri, F., Ariceta, G., Besbas, N., Bitzan, M., Bjerre, A., Coppo, R., Emma, F., Johnson, S., Karpman, D., Landau, D., Langman, C. B., Lapeyraque, A. L., Licht, C., Nester, C., Pecoraro, C., Riedl, M., van de Kar, N. C., Van de Walle, J., Vivarelli, M., ... HUS International (2016). An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 31(1), 15–39. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3076-8>

López, E. L., Contrini, M. M., Glatstein, E., González Ayala, S., Santoro, R., Allende, D., Ezcurra, G., Teplitz, E., Koyama, T., Matsumoto, Y., Sato, H., Sakai, K., Hoshida, S., Komoriya, K., Morita, T., Harning, R., & Brookman, S. (2010). Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 239–243. <https://doi.org/10.1128/AAC.00343-09>

Louise, C. B., & Obrig, T. G. (1992). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infection and immunity*, 60(4), 1536–1543. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1536-1543.1992>

Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M., & Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature reviews. Immunology*, 18(1), 46–61. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.106>

Lu, Y., & Swartz, J. R. (2016). Functional properties of flagellin as a stimulator of innate immunity. *Scientific reports*, 6, 18379. <https://doi.org/10.1038/srep18379>

Lu, Y., Liu, X., Huang, Y., Liao, Y., Xi, T., Zhang, Y., Shu, S., & Fang, F. (2018). The Effects of IL10 and NK Cells on the Susceptibility to Mouse Cytomegalovirus in BALB/c Mice despite the Compensation of IFN $\gamma$ . *Intervirology*, 61(3), 111–122. <https://doi.org/10.1159/000493316>

Ludwig, K., Karmali, M. A., Sarkim, V., Bobrowski, C., Petric, M., Karch, H., Müller-Wiefel, D. E., & Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie (2001). Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2272–2279. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2272-2279.2001>

Lyu, M., Suzuki, H., Kang, L., Gaspal, F., Zhou, W., Goc, J., Zhou, L., Zhou, J., Zhang, W., JRI Live Cell Bank, Shen, Z., Fox, J. G., Sockolow, R. E., Laufer, T. M., Fan, Y., Eberl, G., Withers, D. R., & Sonnenberg, G. F. (2022). ILC3s select microbiota-specific regulatory T cells to establish tolerance in the gut. *Nature*, 610(7933), 744–751. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05141-x>

Ma, Y., Seiler, K. P., Eichwald, E. J., Weis, J. H., Teuscher, C., & Weis, J. J. (1998). Distinct characteristics of resistance to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in C57BL/6N mice. *Infection and immunity*, 66(1), 161–168. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.161-168.1998>

Ma, Z., Zhang, H., Shang, W., Zhu, F., Han, W., Zhao, X., Han, D., Wang, P. G., & Chen, M. (2014). Glycoconjugate vaccine containing *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen linked with maltose-binding protein elicits humoral and cellular responses. *PloS one*, 9(8), e105215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105215>

Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunology*, 6(4), 666–677. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.30>

Macagno, A., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends in immunology*, 28(5), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.008>

MacConnachie, A. A., & Todd, W. T. (2004). Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in shiga toxin producing *Escherichia coli* infection. *Current opinion in infectious diseases*, 17(5), 479–482. <https://doi.org/10.1097/00001432-200410000-00013>

MacDonald T. T. (2003). The mucosal immune system. *Parasite immunology*, 25(5), 235–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00632.x>

MacLeod, D. L., Gyles, C. L., & Wilcock, B. P. (1991). Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Veterinary pathology*, 28(1), 66–73. <https://doi.org/10.1177/030098589102800109>

Magalhaes, J. G., Tattoli, I., & Girardin, S. E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in immunology*, 19(2), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.006>

Mahajan, A., Currie, C. G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., McNeilly, T. N., Roe, A., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., Gally, D. L., & Smith, D. G. (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of

Escherichia coli O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cellular microbiology*, 11(1), 121–137. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01244.x>

Makvandi, M., Teimoori, A., Parsa Nahad, M., Khodadadi, A., Cheshmeh, M. G. D., & Zandi, M. (2018). Expression of Salmonella typhimurium and Escherichia coli flagellin protein and its functional characterization as an adjuvant. *Microbial pathogenesis*, 118, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.016>

Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 9(3), 59. <https://doi.org/10.3390/ph9030059>

Maldonado-Contreras, A. L., & McCormick, B. A. (2011). Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell and tissue research*, 343(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1082-5>

Malyukova, I., Murray, K. F., Zhu, C., Boedeker, E., Kane, A., Patterson, K., Peterson, J. R., Donowitz, M., & Kovbasnjuk, O. (2009). Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296(1), G78–G92. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90347.2008>

Manea, M., & Karpman, D. (2009). Molecular basis of ADAMTS13 dysfunction in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 24(3), 447–458. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0986-8>

Manning, S. D., Motiwala, A. S., Springman, A. C., Qi, W., Lacher, D. W., Ouellette, L. M., Mladonicky, J. M., Somsel, P., Rudrik, J. T., Dietrich, S. E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., & Whittam, T. S. (2008). Variation in virulence among clades of Escherichia coli O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4868–4873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710834105>

Mantis, N. J., & Forbes, S. J. (2010). Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunological investigations*, 39(4-5), 383–406. <https://doi.org/10.3109/08820131003622635>

Marcato, P., Mulvey, G., Read, R. J., Vander Helm K, Nation, P. N., & Armstrong, G. D. (2001). Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. *The Journal of infectious diseases*, 183(3), 435–443. <https://doi.org/10.1086/318080>

Marchetti, S., Pluim, D., Beijnen, J. H., Mazzanti, R., van Tellingen, O., & Schellens, J. H. (2014). "Effect of the drug transporters ABCB1, ABCC2, and ABCG2 on the disposition and brain accumulation of the taxane analog BMS-275,183". *Investigational new drugs*, 32(6), 1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0143-0>

Martin-Gallausiaux, C., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Jamet, A., Ledue, F., Blottière, H. M., & Lapaque, N. (2018). Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Scientific reports*, 8(1), 9742. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28048-y>

Martinoli, C., Chiavelli, A., & Rescigno, M. (2007). Entry route of Salmonella typhimurium directs the type of induced immune response. *Immunity*, 27(6), 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.011>

- Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J., & Corthésy, B. (2014). Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut microbes*, 5(6), 688–695. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.983763>
- Maul, R. W., & Gearhart, P. J. (2010). Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. *Immunologic research*, 47(1-3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8142-5>
- Maynard, C. L., & Weaver, C. T. (2009). Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity*, 31(3), 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.012>
- McClure, R., & Massari, P. (2014). TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in immunology*, 5, 386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00386>
- McDermott, A. J., & Huffnagle, G. B. (2014). The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology*, 142(1), 24–31. <https://doi.org/10.1111/imm.12231>
- McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*, 50(4), 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
- McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Corbishley, A., Nath, M., Simmonds, H., McAteer, S. P., Mahajan, A., Low, J. C., Smith, D. G., Huntley, J. F., & Gally, D. L. (2015). Optimizing the Protection of Cattle against Escherichia coli O157:H7 Colonization through Immunization with Different Combinations of H7 Flagellin, Tir, Intimin-531 or EspA. *PloS one*, 10(5), e0128391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128391>
- McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Rosser, T., McAteer, S., Low, J. C., Smith, D. G., Huntley, J. F., Mahajan, A., & Gally, D. L. (2010). Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of Escherichia coli O157:H7 following oral challenge. *Vaccine*, 28(5), 1422–1428. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.076>
- McNeilly, T. N., Naylor, S. W., Mahajan, A., Mitchell, M. C., McAteer, S., Deane, D., Smith, D. G., Low, J. C., Gally, D. L., & Huntley, J. F. (2008). Escherichia coli O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. *Infection and immunity*, 76(6), 2594–2602. <https://doi.org/10.1128/IAI.01452-07>
- McWilliams, B. D., & Torres, A. G. (2014). Enterohemorrhagic Escherichia coli Adhesins. *Microbiology spectrum*, 2(3), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013>
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6071), 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>
- Meehan, T. F., Witherden, D. A., Kim, C. H., Sendaydiego, K., Ye, I., Garijo, O., Komori, H. K., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Eckmann, L., & Havran, W. L. (2014). Protection against colitis by CD100-dependent modulation of intraepithelial  $\gamma\delta$  T lymphocyte function. *Mucosal immunology*, 7(1), 134–142. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.32>
- Mejías, M. P. (2013). Generación de una respuesta humoral con capacidad neutralizante contra la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) en el modelo murino. Tesis doctoral. Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes.

- Mejias, M. P., Ghersi, G., Craig, P. O., Panek, C. A., Bentancor, L. V., Baschkier, A., Goldbaum, F. A., Zylberman, V., & Palermo, M. S. (2013). Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(5), 2403–2411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300999>
- Mejías, M. P., Hiriart, Y., Lauché, C., Fernández-Brando, R. J., Pardo, R., Bruballa, A., Ramos, M. V., Goldbaum, F. A., Palermo, M. S., & Zylberman, V. (2016). Development of camelid single chain antibodies against Shiga toxin type 2 (Stx2) with therapeutic potential against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Scientific reports*, 6, 24913. <https://doi.org/10.1038/srep24913>
- Mele, C., Remuzzi, G., & Noris, M. (2014). Hemolytic uremic syndrome. *Seminars in immunopathology*, 36(4), 399–420. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0416-x>
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Köck, R., Friedrich, A. W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M. A., & Karch, H. (2008). Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*, 14(8), 1287–1290. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071082>
- Melton-Celsa A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
- Melton-Celsa, A. R., Carvalho, H. M., Thuning-Roberson, C., & O'Brien, A. D. (2015). Protective efficacy and pharmacokinetics of human/mouse chimeric anti-Stx1 and anti-Stx2 antibodies in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 22(4), 448–455. <https://doi.org/10.1128/CVI.00022-15>
- Menning, A., Loddenkemper, C., Westendorf, A. M., Szilagyi, B., Buer, J., Siewert, C., Hamann, A., & Huehn, J. (2010). Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *European journal of immunology*, 40(9), 2539–2548. <https://doi.org/10.1002/eji.200939938>
- Mes, L., Steffen, U., Chen, H. J., Veth, J., Hoepel, W., Griffith, G. R., Schett, G., & den Dunnen, J. (2023). IgA2 immune complexes selectively promote inflammation by human CD103+ dendritic cells. *Frontiers in immunology*, 14, 1116435. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116435>
- Methot, S. P., & Di Noia, J. M. (2017). Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Advances in immunology*, 133, 37–87. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.002>
- Meyer-Bahlburg A. (2015). B-1 cells as a source of IgA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362, 122–131. <https://doi.org/10.1111/nyas.12801>
- Mills K. H. G. (2023). IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nature reviews. Immunology*, 23(1), 38–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>
- Miyamoto, Y., Imura, M., Kaper, J. B., Torres, A. G., & Kagnoff, M. F. (2006). Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. *Cellular microbiology*, 8(5), 869–879. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00673.x>

Mize, M. T., Sun, X. L., & Simecka, J. W. (2018). Interleukin-17A Exacerbates Disease Severity in BALB/c Mice Susceptible to Lung Infection with *Mycoplasma pulmonis*. *Infection and immunity*, 86(9), e00292-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00292-18>

Mizel, S. B., West, A. P., & Hantgan, R. R. (2003). Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 23624–23629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303481200>

Mohan, S., Kourentzi, K., Schick, K. A., Uehara, C., Lipschultz, C. A., Acchione, M., Desantis, M. E., Smith-Gill, S. J., & Willson, R. C. (2009). Association energetics of cross-reactive and specific antibodies. *Biochemistry*, 48(6), 1390–1398. <https://doi.org/10.1021/bi801901d>

Mohawk, K. L., Melton-Celsa, A. R., Zangari, T., Carroll, E. E., & O'Brien, A. D. (2010). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microbial pathogenesis*, 48(3-4), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.01.003>

Molyneux, G., Gibson, F. M., Gordon-Smith, E. C., Pilling, A. M., Liu, K. C., Rizzo, S., Sulsh, S., & Turton, J. A. (2005). The haemotoxicity of mitomycin in a repeat dose study in the female CD-1 mouse. *International journal of experimental pathology*, 86(6), 415–430. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2005.00452.x>

Momose, Y., Hirayama, K., & Itoh, K. (2008). Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(1-2), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9188-9>

Monteagudo-Mera, A., Arthur, J. C., Jobin, C., Keku, T., Bruno-Barcena, J. M., & Azcarate-Peril, M. A. (2016). High purity galacto-oligosaccharides enhance specific *Bifidobacterium* species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. *Beneficial microbes*, 7(2), 247–264. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0114>

Montero, D. A., Canto, F. D., Velasco, J., Colello, R., Padola, N. L., Salazar, J. C., Martin, C. S., Oñate, A., Blanco, J., Rasko, D. A., Contreras, C., Puente, J. L., Scheutz, F., Franz, E., & Vidal, R. M. (2019). Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 486–502. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1595985>

Montero, D. A., Del Canto, F., Salazar, J. C., Céspedes, S., Cádiz, L., Arenas-Salinas, M., Reyes, J., Oñate, Á., & Vidal, R. M. (2020). Immunization of mice with chimeric antigens displaying selected epitopes confers protection against intestinal colonization and renal damage caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *NPJ vaccines*, 5(1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0168-7>

Morace, I., Pilz, R., Federico, G., Jennemann, R., Kronic, D., Nordström, V., von Gerichten, J., Marsching, C., Schiebl, I. M., Müthing, J., Wunder, C., Johannes, L., Sandhoff, R., & Gröne, H. J. (2019). Renal globotriaosylceramide facilitates tubular albumin absorption and its inhibition protects against acute kidney injury. *Kidney international*, 96(2), 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.02.010>

Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and

function. *Mucosal immunology*, 14(4), 793–802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>

Mortensen, R., Nissen, T. N., Blauenfeldt, T., Christensen, J. P., Andersen, P., & Dietrich, J. (2015). Adaptive Immunity against *Streptococcus pyogenes* in Adults Involves Increased IFN- $\gamma$  and IgG3 Responses Compared with Children. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(4), 1657–1664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500804>

Morton, H. C., & Brandtzaeg, P. (2001). CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 49(3), 217–229.

Mousavi, T., Salek Moghadam, A., Falak, R., & Tebyanian, M. (2008). Co-administration of CpG oligonucleotides and chenopodium album extract reverse IgG2a/IgG1 ratios and increase IFN- $\gamma$  and IL-10 productions in a murine model of asthma. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 7(1), 1–6.

Moxley, R. A., Francis, D. H., Tamura, M., Marx, D. B., Santiago-Mateo, K., & Zhao, M. (2017). Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins*, 9(2), 49. <https://doi.org/10.3390/toxins9020049>

Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M. G., Callenberg, K. M., Partch, C. L., Rollins, D., Propheter, D. C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q. X., & Hooper, L. V. (2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, 505(7481), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature12729>

Mumy, K. L., & McCormick, B. A. (2009). The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. *Current opinion in pharmacology*, 9(6), 697–701. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.10.004>

Murthy, K. G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C., & Salzman, A. L. (2004). Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 279(7), 5667–5675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307759200>

Müthing, J., Schweppe, C. H., Karch, H., & Friedrich, A. W. (2009). Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and haemostasis*, 101(2), 252–264.

Myers-Morales, T., Bussell, K. M., & D'Orazio, S. E. (2013). Fecal transplantation does not transfer either susceptibility or resistance to food borne listeriosis in C57BL/6 and BALB/c/By mice. *F1000Research*, 2, 177. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-177.v1>

Nagano, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2012). The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. *Current opinion in immunology*, 24(4), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.007>

Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*, 9(7), 279. <https://doi.org/10.3390/biom9070279>

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>

Nathanson, S., Kwon, T., Elmaleh, M., Charbit, M., Launay, E. A., Harambat, J., Brun, M., Ranchin, B., Bandin, F., Cloarec, S., Bourdat-Michel, G., Piètrément, C., Champion, G., Ulinski, T., & Deschênes, G. (2010). Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 5(7), 1218–1228. <https://doi.org/10.2215/CJN.08921209>

National Research Council (US) Committee (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed (Washington: National Academies Press (US)).

Nejadghaderi, S. A., Nazemalhosseini-Mojarad, E., & Asadzadeh Aghdai, H. (2021). Fecal microbiota transplantation for COVID-19; a potential emerging treatment strategy. *Medical hypotheses*, 147, 110476. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110476>

Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., & Sirard, J. C. (2008). Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), 2036–2043. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2036>

Nestoridi, E., Tsukurov, O., Kushak, R. I., Ingelfinger, J. R., & Grabowski, E. F. (2005). Shiga toxin enhances functional tissue factor on human glomerular endothelial cells: implications for the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 3(4), 752–762. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01205.x>

Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell host & microbe*, 25(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>

Newberry, R. D., & Lorenz, R. G. (2005). Organizing a mucosal defense. *Immunological reviews*, 206, 6–21. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00282.x>

Nikoopour, E., Bellemore, S. M., & Singh, B. (2015). IL-22, cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine*, 74(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.007>

Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 8(1), 34–47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>

Nishikawa, K., Matsuoka, K., Watanabe, M., Igai, K., Hino, K., Hatano, K., Yamada, A., Abe, N., Terunuma, D., Kuzuhara, H., & Natori, Y. (2005). Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. *The Journal of infectious diseases*, 191(12), 2097–2105. <https://doi.org/10.1086/430388>

Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G., & Dinarello, C. A. (2013). Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Seminars in immunology*, 25(6), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.014>

Noviski, M., Mueller, J. L., Satterthwaite, A., Garrett-Sinha, L. A., Brombacher, F., & Zikherman, J. (2018). IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *eLife*, 7, e35074. <https://doi.org/10.7554/eLife.35074>

Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar;15(3):160-71. doi: 10.1038/nri3795. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25698678.

Oakes, R. S., Kirkham, J. K., Nelson, R. D., & Siegler, R. L. (2008). Duration of oliguria and anuria as predictors of chronic renal-related sequelae in post-diarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatric nephrology* (Berlin, Germany), 23(8), 1303–1308. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0799-9>

Okai, S., Usui, F., Yokota, S., Hori-I, Y., Hasegawa, M., Nakamura, T., Kurosawa, M., Okada, S., Yamamoto, K., Nishiyama, E., Mori, H., Yamada, T., Kurokawa, K., Matsumoto, S., Nanno, M., Naito, T., Watanabe, Y., Kato, T., Miyauchi, E., Ohno, H., ... Shinkura, R. (2016). High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nature microbiology*, 1(9), 16103. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.103>

Okumura, R., & Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 49(5), e338. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.20>

Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>

Oliveira, L. M., Teixeira, F. M. E., & Sato, M. N. (2018). Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators of inflammation*, 2018, 3067126. <https://doi.org/10.1155/2018/3067126>

Öncül, N., & Yıldırım, Z. (2019). Inhibitory effect of bacteriocins against *Escherichia coli* O157:H7. *Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional*, 25(6), 504–514. <https://doi.org/10.1177/1082013219840462>

Owaga, E., Hsieh, R. H., Mugendi, B., Masuku, S., Shih, C. K., & Chang, J. S. (2015). Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20841–20858. <https://doi.org/10.3390/ijms160920841>

Palermo, M., Alves-Rosa, F., Rubel, C., Fernández, G. C., Fernández-Alonso, G., Alberto, F., Rivas, M., & Isturiz, M. (2000). Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clinical and experimental immunology*, 119(1), 77–83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01103.x>

Palm, N. W., de Zoete, M. R., Cullen, T. W., Barry, N. A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P. H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., Ruggiero, E., Cho, J. H., Goodman, A. L., & Flavell, R. A. (2014). Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 158(5), 1000–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.006>

Pang, S., Wu, W., Liu, Q., Zhu, G., & Duan, Q. (2022). Different serotypes of *Escherichia coli* flagellin exert identical adjuvant effects. *BMC veterinary research*, 18(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03412-3>

Park, M. J., Lee, S. H., Kim, E. K., Lee, E. J., Baek, J. A., Park, S. H., Kwok, S. K., & Cho, M. L. (2018). Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice. *Scientific reports*, 8(1), 3753. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21856-2>

Paul W. E. (2010). What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?. *Immunology and cell biology*, 88(3), 236–239. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.2>

Peine, M., Marek, R. M., & Löhning, M. (2016). IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends in immunology*, 37(5), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.007>

Pérez-Cruz, M., Koné, B., Porte, R., Carnoy, C., Tabareau, J., Gosset, P., Trottein, F., Sirard, J. C., Pichavant, M., & Gosset, P. (2021). The Toll-Like Receptor 5 agonist flagellin prevents Non-typeable *Haemophilus influenzae*-induced infection in cigarette smoke-exposed mice. *PloS one*, 16(3), e0236216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236216>

Phalipon, A., & Corthésy, B. (2003). Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends in immunology*, 24(2), 55–58. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)00031-5)

Pianciola, L., & Rivas, M. (2018). Genotypic Features of Clinical and Bovine *Escherichia coli* O157 Strains Isolated in Countries with Different Associated-Disease Incidences. *Microorganisms*, 6(2), 36. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020036>

Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological reviews*, 279(1), 70–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12567>

Pineda, G. E., Rearte, B., Todero, M. F., Bruballa, A. C., Bernal, A. M., Fernandez-Brando, R. J., Isturiz, M. A., Zotta, E., Alba-Soto, C. D., Palermo, M. S., & Ramos, M. V. (2021). Absence of interleukin-10 reduces progression of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clinical science (London, England : 1979)*, 135(3), 575–588. <https://doi.org/10.1042/CS20200468>

Pineda, G. E. (2022). Modulación de mecanismos inflamatorios en el Síndrome Urémico Hemolítico. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA.

Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., & de Jong, H. (2019). Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate. *Journal of bacteriology*, 201(13), e00147-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>

Pocheron, A. L., Le Dréan, G., Billard, H., Moyon, T., Pagniez, A., Heberden, C., Le Chatelier, E., Darmaun, D., Michel, C., & Parnet, P. (2021). Maternal Microbiota Transfer Programs Offspring Eating Behavior. *Frontiers in microbiology*, 12, 672224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.672224>

Porubsky, S., Federico, G., Müthing, J., Jennemann, R., Gretz, N., Büttner, S., Obermüller, N., Jung, O., Hauser, I. A., Gröne, E., Geiger, H., Gröne, H. J., & Betz, C. (2014). Direct acute tubular damage contributes to Shigatoxin-mediated kidney failure. *The Journal of pathology*, 234(1), 120–133. <https://doi.org/10.1002/path.4388>

Prieto, J. M. B., & Felipe, M. J. B. (2017). Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 54, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.08.002>

Puga, I., Cols, M., Barra, C. M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D. M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J. B., Serrano, S., Lorente, J. A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., ... Cerutti, A. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology*, 13(2), 170–180. <https://doi.org/10.1038/ni.2194>

- Qin, Z., Yang, X., Chen, G., Park, C., & Liu, Z. (2020). Crosstalks Between Gut Microbiota and *Vibrio Cholerae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 582554. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.582554>
- Qiu, Y., & Yang, H. (2013). Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 33(10), 551–562. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0162>
- Quintanar-Stephano, A., Abarca-Rojano, E., Jarillo-Luna, R. A., Rivera-Aguilar, V., Ventura-Juárez, J., Berczi, I., Kovacs, K., & Campos-Rodríguez, R. (2010). Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy decrease humoral immune responses to T-independent and T-dependent antigens. *Journal of physiology and biochemistry*, 66(1), 7–13. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0004-z>
- Råberg, L., Graham, A. L., & Read, A. F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1513), 37–49. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0184>
- Råberg, L., Sim, D., & Read, A. F. (2007). Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 812–814. <https://doi.org/10.1126/science.1148526>
- Rahman, R. C., Cobeñas, C. J., Drut, R., Amoreo, O. R., Ruscasso, J. D., Spizzirri, A. P., Suarez, A. del C., Zalba, J. H., Ferrari, C., & Gatti, M. C. (2012). Hemorrhagic colitis in postdiarrheal hemolytic uremic syndrome: retrospective analysis of 54 children. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 27(2), 229–233. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1973-z>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology*, 12(11), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.002>
- Rausher M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411(6839), 857–864. <https://doi.org/10.1038/35081193>
- Reboldi, A., & Cyster, J. G. (2016). Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunological reviews*, 271(1), 230–245. <https://doi.org/10.1111/imr.12400>
- Reid, S. D., Selander, R. K., & Whittam, T. S. (1999). Sequence diversity of flagellin (fliC) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(1), 153–160. <https://doi.org/10.1128/JB.181.1.153-160.1999>
- Reiland, H. A., Omolo, M. A., Johnson, T. J., & Baumler, D. J. (2014). A Survey of *Escherichia coli* O157:H7 Virulence Factors: The First 25 Years and 13 Genomes. *Advances in Microbiology*, 4, 390–423.
- Remuzzi, G., & Ruggenenti, P. (1995). The hemolytic uremic syndrome. *Kidney international*, 48(1), 2–19. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.261>

- Rescigno M. (2014). Intestinal microbiota and its effects on the immune system. *Cellular microbiology*, 16(7), 1004–1013. <https://doi.org/10.1111/cmi.12301>
- Rescigno, M., & Borrow, P. (2001). The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell*, 106(3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00454-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00454-8)
- Revu, S., Wu, J., Henkel, M., Rittenhouse, N., Menk, A., Delgoffe, G. M., Poholek, A. C., & McGeachy, M. J. (2018). IL-23 and IL-1 $\beta$  Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation. *Cell reports*, 22(10), 2642–2653. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.044>
- Riquelme-Neira, R., Rivera, A., Sáez, D., Fernández, P., Osorio, G., del Canto, F., Salazar, J. C., Vidal, R. M., & Oñate, A. (2016). Vaccination with DNA Encoding Truncated Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Factor for Adherence-1 Gene (efa-1') Confers Protective Immunity to Mice Infected with *E. coli* O157:H7. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 104. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00104>
- Rivas, M., Chinen, I., & Guth, B. E. C. (2016). “Enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*” en *Escherichia coli* in the Americas; Torres, A.G., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, pp. 97–123.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., Griffin, P. M., & Case-Control Study Group (2006). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne pathogens and disease*, 3(1), 88–96. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.88>
- Robinson, C. M., Sinclair, J. F., Smith, M. J., & O'Brien, A. D. (2006). Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9667–9672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602359103>
- Roco, J. A., Mesin, L., Binder, S. C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P. F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P. A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C. R., Schiepers, A., Corcoran, L. M., Toellner, K. M., Polo, J. M., Meyer-Hermann, M., Victora, G. D., & Vinuesa, C. G. (2019). Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*, 51(2), 337–350.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>
- Rogers, T. J., Paton, J. C., Wang, H., Talbot, U. M., & Paton, A. W. (2006). Reduced virulence of an *fliC* mutant of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21. *Infection and immunity*, 74(3), 1962–1966. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1962-1966.2006>
- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., Aly, M. R., Fraisier, V., Florent, J. C., Perrais, D., Lamaze, C., Raposo, G., Steinem, C., Sens, P., Bassereau, P., & Johannes, L. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, 450(7170), 670–675. <https://doi.org/10.1038/nature05996>
- Rozema, E. A., Stephens, T. P., Bach, S. J., Okine, E. K., Johnson, R. P., Stanford, K., & McAllister, T. A. (2009). Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of food protection*, 72(2), 241–250. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.241>

Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J. P., & Sirard, J. C. (2006). Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS letters*, 580(12), 2976–2984. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.036>

Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y. Y., Saeidi, H., Wong, W. F., Lee, C. Y. Q., Cheong, H. C., Yong, Y. K., Larsson, M., & Shankar, E. M. (2018). T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 9, 2569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>

Sahputra, R., Ruckerl, D., Couper, K. N., Muller, W., & Else, K. J. (2019). The Essential Role Played by B Cells in Supporting Protective Immunity Against *Trichuris muris* Infection Is by Controlling the Th1/Th2 Balance in the Mesenteric Lymph Nodes and Depends on Host Genetic Background. *Frontiers in immunology*, 10, 2842. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02842>

Saito, K., Suzuki, R., Koyanagi, Y., Isogai, H., Yoneyama, H., & Isogai, E. (2019). Inhibition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in a gnotobiotic mouse model with pre-colonization by *Bacteroides* strains. *Biomedical reports*, 10(3), 175–182. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1193>

Samiei, H., Nazarian, S., Hajizade, A., & Kordbacheh, E. (2023). In silico design, production and immunization evaluation of a recombinant bivalent fusion protein candidate vaccine against *E. coli* O157:H7. *International immunopharmacology*, 114, 109464. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109464>

Sánchez, D. S., Fischer Sigel, L. K., Balestracci, A., Ibarra, C., Amaral, M. M., & Silberstein, C. (2022). Eliglustat prevents Shiga toxin 2 cytotoxic effects in human renal tubular epithelial cells. *Pediatric research*, 91(5), 1121–1129. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01622-3>

Sanchez, K. K., Chen, G. Y., Schieber, A. M. P., Redford, S. E., Shokhirev, M. N., Leblanc, M., Lee, Y. M., & Ayres, J. S. (2018). Cooperative Metabolic Adaptations in the Host Can Favor Asymptomatic Infection and Select for Attenuated Virulence in an Enteric Pathogen. *Cell*, 175(1), 146–158.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.016>

Sansonetti P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature reviews. Immunology*, 4(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1499>

Sasaki, K., Mori, T., Hoshi, N., Sasaki, D., Inoue, J., Shinkura, R., & Kondo, A. (2021). W27 IgA suppresses growth of *Escherichia* in an in vitro model of the human intestinal microbiota. *Scientific reports*, 11(1), 14627. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94210-8>

Sasse, J., & Gallagher, S. R. (2004). Staining proteins in gels. *Current protocols in immunology*, Chapter 8. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0809s58>

Sauter, K. A., Melton-Celsa, A. R., Larkin, K., Troxell, M. L., O'Brien, A. D., & Magun, B. E. (2008). Mouse model of hemolytic-uremic syndrome caused by endotoxin-free Shiga toxin 2 (Stx2) and protection from lethal outcome by anti-Stx2 antibody. *Infection and immunity*, 76(10), 4469–4478. <https://doi.org/10.1128/IAI.00592-08>

Scalise, M. L. (2021). Presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en la microbiota cervico-vaginal. Efectos de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) en modelos celulares de desarrollo temprano de gestación. Tesis doctoral. Facultad de Medicina-UBA.

- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951–2963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
- Schneider P. (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Current opinion in immunology*, 17(3), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.005>
- Schneider, D. S., & Ayres, J. S. (2008). Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature reviews. Immunology*, 8(11), 889–895. <https://doi.org/10.1038/nri2432>
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., & Cerf-Bensussan, N. (2018). Modulation of the gut microbiota to improve innate resistance. *Current opinion in immunology*, 54, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.08.003>
- Schüller S. (2011). Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins*, 3(6), 626–639. <https://doi.org/10.3390/toxins3060626>
- Schüller, S., Heuschkel, R., Torrente, F., Kaper, J. B., & Phillips, A. D. (2007). Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes and infection*, 9(1), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.10.005>
- Schwartz R. H. (2005). Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology*, 6(4), 327–330. <https://doi.org/10.1038/ni1184>
- Schwartz, C., Turqueti-Neves, A., Hartmann, S., Yu, P., Nimmerjahn, F., & Voehringer, D. (2014). Basophil-mediated protection against gastrointestinal helminths requires IgE-induced cytokine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(48), E5169–E5177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412663111>
- Sciutto, E., Toledo, A., Cruz, C., Rosas, G., Meneses, G., Laplagne, D., Ainciart, N., Cervantes, J., Fragoso, G., & Goldbaum, F. A. (2005). Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine*, 23(21), 2784–2790. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.043>
- Secher, T., Shima, A., Hinsinger, K., Cintrat, J. C., Johannes, L., Barbier, J., Gillet, D., & Oswald, E. (2015). Retrograde Trafficking Inhibitor of Shiga Toxins Reduces Morbidity and Mortality of Mice Infected with Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 5010–5013. <https://doi.org/10.1128/AAC.00455-15>
- Senger, K., Hackney, J., Payandeh, J., & Zarrin, A. A. (2015). Antibody Isotype Switching in Vertebrates. *Results and problems in cell differentiation*, 57, 295–324. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_13)
- Shao, L., Li, M., Zhang, B., & Chang, P. (2020). Bacterial dysbiosis incites Th17 cell revolt in irradiated gut. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 131, 110674. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110674>
- Shashikanth, N., Yeruva, S., Ong, M. L. D. M., Odenwald, M. A., Pavlyuk, R., & Turner, J. R. (2017). Epithelial Organization: The Gut and Beyond. *Comprehensive Physiology*, 7(4), 1497–1518. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170003>

- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4, 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Shimizu, K., Asahara, T., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Ozawa, A., & Takeda, Y. (2003). Development of a lethal Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infection mouse model using multiple mitomycin C treatment. *Microbial pathogenesis*, 35(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0882-4010\(03\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0882-4010(03)00065-2)
- Shin, H., & Iwasaki, A. (2013). Tissue-resident memory T cells. *Immunological reviews*, 255(1), 165–181. <https://doi.org/10.1111/imr.12087>
- Shultz, P. J., & Raij, L. (1992). Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *The Journal of clinical investigation*, 90(5), 1718–1725. <https://doi.org/10.1172/JCI116045>
- Silberstein, C., Lucero, M. S., Zotta, E., Copeland, D. P., Lingyun, L., Repetto, H. A., & Ibarra, C. (2011). A glucosylceramide synthase inhibitor protects rats against the cytotoxic effects of shiga toxin 2. *Pediatric research*, 69(5 Pt 1), 390–394. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318211dd57>
- Simmons, C. P., Clare, S., Ghaem-Maghami, M., Uren, T. K., Rankin, J., Huett, A., Goldin, R., Lewis, D. J., MacDonald, T. T., Strugnell, R. A., Frankel, G., & Dougan, G. (2003). Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infection and immunity*, 71(9), 5077–5086. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5077-5086.2003>
- Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature reviews. Microbiology*, 17(7), 403–416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- Sirisinha S. (2015). The pleiotropic role of vitamin A in regulating mucosal immunity. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, 33(2), 71–89.
- Slack, E., Balmer, M. L., Fritz, J. H., & Hapfelmeier, S. (2012). Functional flexibility of intestinal IgA - broadening the fine line. *Frontiers in immunology*, 3, 100. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00100>
- Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M. A., Geuking, M. B., Beutler, B., Tedder, T. F., Hardt, W. D., Bercik, P., Verdu, E. F., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5940), 617–620. <https://doi.org/10.1126/science.1172747>
- Smith, K. A., Löser, S., Varyani, F., Harcus, Y., McSorley, H. J., McKenzie, A. N., & Maizels, R. M. (2018). Concerted IL-25R and IL-4Rα signaling drive innate type 2 effector immunity for optimal helminth expulsion. *eLife*, 7, e38269. <https://doi.org/10.7554/eLife.38269>
- Smith, M. J., Teel, L. D., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., & O'Brien, A. D. (2006). Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine*, 24(19), 4122–4129. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.035>
- Somayajulu, M., McClellan, S. A., Bessert, D., Pitchaikannu, A., Angoa-Perez, A., Zagorac, B., Kuhn, D., Suvas, S., & Hazlett, L. D. C57BL/6 and BALB/c mice: Microbiome

composition and colonic cell population analysis. (2021). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8).

Spolski, R., & Leonard, W. J. (2010). IL-21 and T follicular helper cells. *International immunology*, 22(1), 7–12. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp112>

Sreerohini, S., Balakrishna, K., & Parida, M. (2019). Oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing Shiga toxin truncate confers enhanced protection against Shiga toxins of *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae*. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 127(10), 671–680. <https://doi.org/10.1111/apm.12983>

Ståhl, A. L., Arvidsson, I., Johansson, K. E., Chromek, M., Rebetz, J., Loos, S., Kristoffersson, A. C., Békássy, Z. D., Mörgelin, M., & Karpman, D. (2015). A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004619. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004619>

Staley, C., Weingarden, A. R., Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6>

Stebegg, M., Silva-Cayetano, A., Innocentin, S., Jenkins, T. P., Cantacessi, C., Gilbert, C., & Linterman, M. A. (2019). Heterochronic faecal transplantation boosts gut germinal centres in aged mice. *Nature communications*, 10(1), 2443. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10430-7>

Steimle, A., Menz, S., Bender, A., Ball, B., Weber, A. N. R., Hagemann, T., Lange, A., Maerz, J. K., Parusel, R., Michaelis, L., Schäfer, A., Yao, H., Löw, H. C., Beier, S., Tesfazgi Mebrhatu, M., Gronbach, K., Wagner, S., Voehringer, D., Schaller, M., Fehrenbacher, B., ... Frick, J. S. (2019). Flagellin hypervariable region determines symbiotic properties of commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS biology*, 17(6), e3000334. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000334>

Sugaya M. (2020). The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1314. <https://doi.org/10.3390/ijms21041314>

Symowski, C., & Voehringer, D. (2019). Th2 cell-derived IL-4/IL-13 promote ILC2 accumulation in the lung by ILC2-intrinsic STAT6 signaling in mice. *European journal of immunology*, 49(9), 1421–1432. <https://doi.org/10.1002/eji.201948161>

Tahoun, A., Jensen, K., Corripio-Miyar, Y., McAteer, S. P., Corbishley, A., Mahajan, A., Brown, H., Frew, D., Aumeunier, A., Smith, D. G., McNeilly, T. N., Glass, E. J., & Gally, D. L. (2015). Functional analysis of bovine TLR5 and association with IgA responses of cattle following systemic immunisation with H7 flagella. *Veterinary research*, 46, 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0135-2>

Tanoue, T., Atarashi, K., & Honda, K. (2016). Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology*, 16(5), 295–309. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.36>

Tarlinton D. M. (2008). Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunology and cell biology*, 86(2), 133–138. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100148>

Tarr P. I. (2009). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: distinct mechanisms of pathogenesis. *Kidney international. Supplement*, (112), S29–S32. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.615>

Tarr, P. I., & Freedman, S. B. (2022). Why antibiotics should not be used to treat Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Current opinion in gastroenterology*, 38(1), 30–38. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000798>

Tarr, P. I., Gordon, C. A., & Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet (London, England)*, 365(9464), 1073–1086. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2)

Telen M. J. (2014). Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. *Hematology/oncology clinics of North America*, 28(2), 341–354. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.11.010>

Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., & Ohnishi, M. (2017). Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food safety (Tokyo, Japan)*, 5(2), 35–53. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016029>

Tesh, V. L., Ramegowda, B., & Samuel, J. E. (1994). Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, 62(11), 5085–5094. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.5085-5094.1994>

Theriot, C. M., Koenigsnecht, M. J., Carlson, P. E., Jr, Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., Huffnagle, G. B., Z Li, J., & Young, V. B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature communications*, 5, 3114. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>

Thiemann, S., Smit, N., & Strowig, T. (2016). Antibiotics and the Intestinal Microbiome : Individual Responses, Resilience of the Ecosystem, and the Susceptibility to Infections. *Current topics in microbiology and immunology*, 398, 123–146. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_504](https://doi.org/10.1007/82_2016_504)

Thompson, J. A., Oliveira, R. A., & Xavier, K. B. (2016). Chemical conversations in the gut microbiota. *Gut microbes*, 7(2), 163–170. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1145374>

Thomson, D. U., Loneragan, G. H., Thornton, A. B., Lechtenberg, K. F., Emery, D. A., Burkhardt, D. T., & Nagaraja, T. G. (2009). Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Foodborne pathogens and disease*, 6(7), 871–877. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0290>

Thornton, A. B., Thomson, D. U., Loneragan, G. H., Fox, J. T., Burkhardt, D. T., Emery, D. A., & Nagaraja, T. G. (2009). Effects of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccination on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated cattle. *Journal of food protection*, 72(4), 866–869. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.4.866>

Thurman J. M. (2020). Complement and the Kidney: An Overview. *Advances in chronic kidney disease*, 27(2), 86–94. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.10.003>

Tidmas, V., Brazier, J., Bottoms, L., Muniz, D., Desai, T., Hawkins, J., Sridharan, S., & Farrington, K. (2022). Ultra-Endurance Participation and Acute Kidney Injury: A Narrative

Review. *International journal of environmental research and public health*, 19(24), 16887. <https://doi.org/10.3390/ijerph192416887>

Tiffin, P., & Inouye, B. D. (2000). Measuring tolerance to herbivory: accuracy and precision of estimates made using natural versus imposed damage. *Evolution; international journal of organic evolution*, 54(3), 1024–1029. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00101.x>

Tordesillas, L., & Berin, M. C. (2018). Mechanisms of Oral Tolerance. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 55(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8680-5>

Torres, A. G., Amaral, M. M., Bentancor, L., Galli, L., Goldstein, J., Krüger, A., & Rojas-Lopez, M. (2018). Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. *Microorganisms*, 6(4), 100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040100>

Trier, N. H., & Houen, G. (2023). Antibody Cross-Reactivity in Auto-Immune Diseases. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13609. <https://doi.org/10.3390/ijms241713609>

Trück, J., Lazarus, R., Clutterbuck, E. A., Bowman, J., Kibwana, E., Bateman, E. A., & Pollard, A. J. (2013). The zwitterionic type I *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide does not induce memory B cell formation in humans. *Immunobiology*, 218(3), 368–372. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.008>

Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Shimizu, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Sugiyama, S., Taniguchi, K., Neri, P., & Mori, H. (2008). Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine*, 26(4), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.038>

Tzipori, S., Sheoran, A., Akiyoshi, D., Donohue-Rolfe, A., & Trachtman, H. (2004). Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 926–941. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.926-941.2004>

Uematsu, S., & Akira, S. (2009). Immune responses of TLR5(+) lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection. *Journal of gastroenterology*, 44(8), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0094-y>

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., & Akira, S. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology*, 9(7), 769–776. <https://doi.org/10.1038/ni.1622>

van Diemen, P. M., Dziva, F., Abu-Median, A., Wallis, T. S., van den Bosch, H., Dougan, G., Chanter, N., Frankel, G., & Stevens, M. P. (2007). Subunit vaccines based on intimin and Efa-1 polypeptides induce humoral immunity in cattle but do not protect against intestinal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 or O26:H-. *Veterinary immunology and immunopathology*, 116(1-2), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.009>

van Setten, P. A., van Hinsbergh, V. W., van der Velden, T. J., van de Kar, N. C., Vermeer, M., Mahan, J. D., Assmann, K. J., van den Heuvel, L. P., & Monnens, L. A. (1997). Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular

endothelial cells. *Kidney international*, 51(4), 1245–1256.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1997.170>

Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., & Schoofs, L. (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular immunology*, 280(1), 22–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.009>

Vélez, M. V., Colello, R., Etcheverría, A. I., Vidal, R. M., Montero, D. A., Acuña, P., Guillén Fretes, R. M., Toro, M., & Padola, N. L. (2020). Distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation and *hes* Gene in STEC Strains from Countries of Latin America. *Current microbiology*, 77(9), 2111–2117. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02062-8>

Vicente-Suarez, I., Brayer, J., Villagra, A., Cheng, F., & Sotomayor, E. M. (2009). TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses. *Immunology letters*, 125(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.007>

Vieira, P., & Cumano, A. (2004). Differentiation of B lymphocytes from hematopoietic stem cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 271, 67–76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-796-3:067>

Vieira, P., & Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *European journal of immunology*, 18(2), 313–316. <https://doi.org/10.1002/eji.1830180221>

Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C., & Sirard, J. C. (2018). Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends in microbiology*, 26(5), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.008>

Vijay-Kumar, M., Carvalho, F. A., Aitken, J. D., Fifadara, N. H., & Gewirtz, A. T. (2010). TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *European journal of immunology*, 40(12), 3528–3534. <https://doi.org/10.1002/eji.201040421>

Vilte, D. A., Larzábal, M., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B. C., Elizondo, A. M., Cantet, R. J., Delgado, F., Meikle, V., Cataldi, A., & Mercado, E. C. (2011). Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with  $\gamma$ -intimin C<sub>280</sub> and EspB proteins. *Vaccine*, 29(23), 3962–3968. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.079>

Vinuesa, C. G., & Chang, P. P. (2013). Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nature immunology*, 14(2), 119–126. <https://doi.org/10.1038/ni.2511>

Vlisidou, I., Lyte, M., van Diemen, P. M., Hawes, P., Monaghan, P., Wallis, T. S., & Stevens, M. P. (2004). The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. *Infection and immunity*, 72(9), 5446–5451. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5446-5451.2004>

Wagner, P. L., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and immunity*, 70(8), 3985–3993. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.3985-3993.2002>

Wang, J., Zhao, X., & Wan, Y. Y. (2023). Intricacies of TGF- $\beta$  signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cellular & molecular immunology*, 20(9), 1002–1022. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01036-7>

- Węgrzyn, G., & Muniesa, M. (2021). Editorial: Shiga Toxin-Converting Bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 12, 680816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.680816>
- Wei, H., & Wang, J. Y. (2021). Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM Transcytosis. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2284. <https://doi.org/10.3390/ijms22052284>
- Weis, A. M., & Round, J. L. (2021). Microbiota-antibody interactions that regulate gut homeostasis. *Cell host & microbe*, 29(3), 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.009>
- Wen, S. X., Teel, L. D., Judge, N. A., & O'Brien, A. D. (2006). A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7082–7087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510843103>
- Wickham, M. E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B. K., Brown, N. F., Coburn, B. A., Deng, W., Puente, J. L., Karmali, M. A., & Finlay, B. B. (2006). Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *The Journal of infectious diseases*, 194(6), 819–827. <https://doi.org/10.1086/506620>
- Wijburg, O. L., Uren, T. K., Simpfendorfer, K., Johansen, F. E., Brandtzaeg, P., & Strugnell, R. A. (2006). Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *The Journal of experimental medicine*, 203(1), 21–26. <https://doi.org/10.1084/jem.20052093>
- Willing, B. P., Vacharaksa, A., Croxen, M., Thanachayanont, T., & Finlay, B. B. (2011). Altering host resistance to infections through microbial transplantation. *PloS one*, 6(10), e26988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026988>
- Woolhouse, M. E., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., & Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature genetics*, 32(4), 569–577. <https://doi.org/10.1038/ng1202-569>
- Woting, A., & Blaut, M. (2016). The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*, 8(4), 202. <https://doi.org/10.3390/nu8040202>
- Yamagami, S., Motoki, M., Kimura, T., Izumi, H., Takeda, T., Katsuura, Y., & Matsumoto, Y. (2001). Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*, 184(6), 738–742. <https://doi.org/10.1086/323082>
- Yamashita, T., Iwakura, T., Matsui, K., Kawaguchi, H., Obana, M., Hayama, A., Maeda, M., Izumi, Y., Komuro, I., Ohsugi, Y., Fujimoto, M., Naka, T., Kishimoto, T., Nakayama, H., & Fujio, Y. (2011). IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR $\gamma$ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovascular research*, 91(4), 640–648. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr148>
- Yang, L., Zheng, Y., Miao, Y. M., Yan, W. X., Geng, Y. Z., Dai, Y., & Wei, Z. F. (2022). Bergenin, a PPAR $\gamma$  agonist, inhibits Th17 differentiation and subsequent neutrophilic asthma by preventing GLS1-dependent glutaminolysis. *Acta pharmacologica Sinica*, 43(4), 963–976. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00717-1>

Ye, Y. S., Pan, A. Z., Zhen, Y., Kang, M. R., Zhang, B., & Yi, W. M. (2019). Antipruritic effects of electroacupuncture on morphine-induced pruritus model mice through the TLR2/4-MyD88-NF- $\kappa$ B pathway. *Neuroreport*, 30(5), 331–337. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001203>

Ylinen, E., Salmenlinna, S., Halkilahti, J., Jahnuainen, T., Korhonen, L., Virkkala, T., Rimhanen-Finne, R., Nuutinen, M., Kataja, J., Arikoski, P., Linkosalo, L., Bai, X., Matussek, A., Jalanko, H., & Saxén, H. (2020). Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: incidence, risk factors, and clinical outcome. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 35(9), 1749–1759. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04560-0>

Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2008). All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of veterinary science*, 9(3), 219–231. <https://doi.org/10.4142/jvs.2008.9.3.219>

Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., & Hoyer, B. F. (2010). Memory B and memory plasma cells. *Immunological reviews*, 237(1), 117–139. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x>

Zhao, T., Tkalcic, S., Doyle, M. P., Harmon, B. G., Brown, C. A., & Zhao, P. (2003). Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 66(6), 924–930. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.6.924>

Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J., & Littman, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*, 8(9), 967–974. <https://doi.org/10.1038/ni1488>

Zoja, C., Buelli, S., & Morigi, M. (2019). Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(3), 379–388. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3850-x>

Zou, Y., Zhang, H., Li, H., Chen, H., Song, W., & Wang, Y. (2012). Strain-dependent production of interleukin-17/interferon- $\gamma$  and matrix remodeling-associated genes in experimental *Candida albicans* keratitis. *Molecular vision*, 18, 1215–1225.

Zubler R. H. (2001). Naive and memory B cells in T-cell-dependent and T-independent responses. *Springer seminars in immunopathology*, 23(4), 405–419. <https://doi.org/10.1007/s281-001-8167-7>