

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE ALGUNOS MECANISMOS DE LA RESPUESTA
INMUNOLÓGICA EN NIÑOS CON INFECCIONES GRAVES DE TIPO
BACTERIANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

M. en C. Monika Palacios Martínez

CO-DIRECTORAS

**Dra. Oralia Nájera Medina
Dra. María cristina González Torres**

ASESORES

**Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Dr. Rubén Darío Martínez Pérez**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2012

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 47905.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Evaluación de algunos mecanismos de la respuesta inmunológica en niños con infecciones graves de tipo bacteriano“, que presentó:

M. en C. Monika Palacios Martínez

El día 07 de diciembre del año 2012

Sinodales

Presidente: Dr. Rubén Darío Martínez Pérez. Facultad de Medicina, UNAM.

Secretario: Dr. Francisco Raúl Chávez Sánchez. Facultad de Medicina UNAM.

Vocal 1: Dra. Leonor Rodríguez Cruz. Ciencias de la Salud. UAM-I.

Vocal 2: Dr. Daniel Martínez Gómez. Producción Agrícola y Animal. UAM-X

COMITE TUTORAL

CO-DIRECTORAS

Dra. Oralia Nájera Medina
Departamento de Atención a la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
onajera@correo.xoc.uam.mx

Dra. María Cristina González Torres
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mcgt@xanum.uam.mx

ASESORES

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
leor@xanum.uam.mx

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México,
mapr@unam.mx

DEDICATORIA

A mis padres Ana María Martínez Hernández y Manuel Palacios Ceballos, por todo su apoyo, confianza, consejos y tantas cosas que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi hermano Oscar Palacios Martínez por toda su tolerancia y apoyo a lo largo de este camino.

A Mario y Alicia por compartir sus vidas conmigo durante este proceso.

A Tobías por su amor incondicional.

A mis abuelitos María de Jesús y Guillermo por todo su apoyo.

A mis tías María Luisa y Norma y a mi prima Selene por siempre estar ahí en el momento en que las necesité.

A mis abuelitos Antonio y Antonia, a Charly y a Javier por ser los ángeles que nos cuidan desde donde quiera que están.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo que soy y por haberme dado la fortaleza de superar obstáculos y poner gente increíble a mí alrededor cuando más lo necesité.

Al Posgrado en Biología Experimental y a la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme abierto sus puertas.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a lo largo de estos cuatro años.

A la Dra Oralia Nájera Medina por haber confiado en mí, por todas sus enseñanzas y por todo este tiempo compartido.

A la Dra María Cristina González Torres por todo el apoyo y por todas sus sabias y oportunas palabras.

A la Dra Leonor Rodríguez Cruz por todos sus consejos.

Al Dr. Rubén Martínez Pérez por todas sus acertadas correcciones.

A la Dra Consuelo del Carmen Cortés Bejar, Dr. Fernando Valencia Chavarria, Dr. Miranda y al Dr. Lara por su valiosa colaboración, ya que sin ustedes no se hubiera podido realizar este trabajo.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez y a Estelita por aceptarme en su laboratorio, compartirme sus conocimientos y brindarme su amistad.

A toda la gente de UAM Iztapalapa que participó de alguna u otra forma en este trabajo.

A Haydeé por brindarme su amistad y por compartir tantas cosas.

A la Dra Torres, a la Dra Angélica, a la Dra Graciela por hacer increíble mi estancia en la UAM Xochimilco y haberme brindado su valiosa amistad.

A Paty, Julia, César, Arely, Marita, Paulina, Luis Alberto, Sergio, Mónica, Isis y Juan Carlos por todos los momentos vividos.

A Santi, Ingrid, Irán, Aleida, Roberto y Alejandro por brindarme su amistad y ayuda durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología.

A Lupita por su amistad al paso de los años

A todos los pacientes de Hospital Materno Pediátrico-Xochimilco.

RESUMEN

Las infecciones en México son un problema de Salud Pública, principalmente en la población infantil, donde son la principal causa de mortalidad y morbilidad. Entre los principales agentes infecciosos están las bacterias, las más comunes en México en el tracto gastrointestinal son *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*.

Las bacterias que causan con mayor frecuencia infecciones en el tracto respiratorio son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, en el organismo existen mecanismos para proteger de la presencia de estos agentes infecciosos, estos pueden ser de dos tipos, la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. En ambas, se desencadenan una gran variedad de mecanismos efectores para contrarrestar la infección como son células, citocinas y moléculas efectoras. En la inmunidad adquirida la presencia de células efectoras, de memoria, anticuerpos y las citocinas que secretan estas células juegan un papel importante en el control de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue evaluar en niños con infecciones gastrointestinales o respiratorias graves de tipo bacteriano, algunos mecanismos de la respuesta inmunológica analizando las poblaciones de leucocitos y las subpoblaciones de linfocitos circulantes, así como el patrón de citocinas (Th1/Th2). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que en los niños infectados existe un aumento de monocitos y granulocitos en porcentajes y números absolutos, así como, de los porcentajes y números absolutos de linfocitos B, linfocitos T efectores (CD4+CD62L- y CD8+CD28-) y células T de memoria (CD45RO+). Los linfocitos B y las células CD4+CD62L- se les ha relacionado con la respuesta de tipo humoral,

en cambio los linfocitos T citotóxicos han sido relacionados con la respuesta de tipo celular.

Respecto al análisis de las diferentes subpoblaciones linfocitarias por tipo de infección, se observó que en niños con infección respiratoria había un mayor porcentaje de linfocitos B y linfocitos T citotóxicos (CD8+CD28-) con relación a niños con infecciones gastrointestinales. Los niños con infección gastrointestinal presentaron mayor porcentaje en el total de linfocitos T y células efectoras (CD4+CD62L-), con respecto a los niños con infecciones respiratorias. Los linfocitos T citotóxicos están relacionados con la inmunidad de tipo celular, pero el fenotipo CD4+CD62L- y los linfocitos B se relacionan más con la inmunidad de tipo humoral. Por lo que estos resultados sugieren que las respuestas humoral y celular están interactuando en ambos tipos de infecciones, en el momento de la toma de la muestra sanguínea. El análisis del patrón de citocinas mostró un incremento en la concentración de IL-2, IFN- γ e IL-4, en los niños infectados con relación a los niños sin infección; mientras que en los niños no infectados hubo un aumento del TNF- α , IL-5 e IL-6. Al hacer el análisis por tipo de infección se encontró en los niños con infecciones gastrointestinales el TNF- α elevado en comparación a los pacientes con infecciones respiratorias. En los niños con infección respiratoria se observó la presencia de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, sin que en los niños de infección gástrica hubiera trazas de ellas. Esto indica que en los niños con infección gastrointestinal se está desarrollando una respuesta inmune de tipo celular (Th1); en cambio en los niños con infección respiratoria al encontrar que están presentes ambos patrones de citocinas, se considera que ambas respuestas celular y humoral (Th1/Th2) están presentes durante la fase aguda de la infección.

El aspecto novedoso de los resultados aquí reportados es que en las enfermedades respiratorias se producen ambos tipos de respuesta inmune (humoral y celular; Th1/h2). Esto no había sido previamente reportado en la literatura, ya que solamente se mencionaba que estaba presente la respuesta Th2. Sin embargo, en el caso de infecciones gastrointestinales sólo encontramos la respuesta celular (Th1), como se ha reportado previamente en la literatura.

Por último, hay que destacar que las respuestas inmunes celular y humoral, que contribuyen a la eliminación de los agentes causales de infecciones trabajar de una manera dinámica y complementaria.

ABSTRACT

Infections in Mexico are a public health problem, especially in children, which are the leading cause of mortality and morbidity. The bacteria represent the main infectious agent. The most common bacteria in the gastrointestinal tract are as follows: *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella*, among others. Among the respiratory tract bacteria are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella*.

In the human body there are mechanisms to counter the presence of infectious agents. These mechanisms can be of two types, innate immunity and acquired immunity. In both types trigger a variety of effector mechanisms to counter infection, either through cells, cytokines and effector molecules. Acquired immunity consist on the presence of effector cells, and memory and cytokines produced by these cells, which play an important role in controlling the disease. The objective of this study was to evaluate some mechanisms of immune response through the leukocyte populations and subpopulations of lymphocytes, and the cytokine pattern (Th1/Th2) in children with severe respiratory or gastrointestinal infections of bacterial type. The results obtained in this study showed that there was an increase in the absolute and relative amount of monocytes and granulocytes. Likewise, there was an increase in the percentage and absolute number of B cells, effector lymphocytes (CD4+CD62L- and CD8+CD28-) and memory cells (CD45RO+) in infected children, compared with the control group. B lymphocytes and CD4+CD62L- related have been humoral response; instead cytotoxic T lymphocytes have been implicated in cellular response type.

Regarding the analysis of lymphocyte subpopulations by the different type of infection was observed that, in children with respiratory infection had a higher percentage of B cells and cytotoxic T lymphocytes (CD8+CD28-) in relation to children with gastrointestinal infections. Children with gastrointestinal infection had a higher percentage of lymphocytes T and effector cells (CD4+CD62L-), with respect to children with respiratory infections. Cytotoxic T lymphocytes are immune-related cell type, but the phenotype CD4+CD62L- and B lymphocytes are more related to humoral immunity. This set of results suggests that the humoral and cellular immunity are interacting in both infections at the time of the taking of the blood sample.

However, when performing the cytokine pattern analysis results showed an increase in IL-2, IFN- γ and IL-4 in infected children compared to uninfected children, whereas in uninfected children was a increased TNF- α , IL-5 and IL-6. When results were analyzed by type of infection we found that children with gastrointestinal infections the TNF- α was found higher compared to the values reported in patients with respiratory infections. The children with respiratory infection showed the presence of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10, while children with gastric infection had only traces of them. These results indicate that children with gastrointestinal infection were developing a cellular type immune response (Th1), whereas children with respiratory infections exhibit both patterns of cytokines, which is interpreted as a simultaneous cellular and humoral response (Th1/Th2) occurring in the acute phase of infection.

The novel aspect of the results here reported is that in respiratory diseases both types of immune response (humoral and cellular; Th1/Th2) occurs. This had not

been previously reported in the literature. However in the case of gastrointestinal infections we only found the cellular response (Th1), as has been reported previously in the literature. Finally, it is noteworthy that the cellular and humoral immune responses, contributing to the elimination of causal agents of infections work in a dynamic and complementary way.

INDICE

	Página
Indice de tablas.....	xiv
Indice de figuras.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las células del sistema inmunológico en la respuesta adaptativa.....	6
1.2 Citocinas.....	9
1.2.1 Interleucina 2.....	9
1.2.2 Interferon- γ	11
1.2.3 Factor de necrosis tumoral- α	12
1.2.4 Interleucina 4.....	13
1.2.5 Interleucina 5.....	14
1.2.6 Interleucina 6.....	14
1.2.7 Interleucina 10.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVO GENERAL.....	18
4.1 Objetivos particulares.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Sujetos y toma de muestras.....	19
5.2 Análisis de subpoblaciones celulares.....	21
5.3 Análisis de citocinas plasmáticas.....	24
5.4 Determinación de la presencia de anticuerpos contra agentes infecciosos por medio de ELISA.....	26

5.5 Análisis estadístico.....	29
6. RESULTADOS.....	29
6.1 Subpoblaciones linfocitarias.....	30
6.2 Células efectoras.....	31
6.3 Células de memoria.....	33
6.4 Citocinas.....	35
6.5 Análisis de los inmunofenotipos celulares y citocinas entre los niños con infección gastrointestinal e infección respiratoria.....	36
6.6 Identificación de agentes infecciosos.....	40
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIONES.....	51
9. BIBLIOGRAFIA.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los pacientes pediátricos.....	21
Tabla 2. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de leucocitos, linfocitos T, linfocitos B y células NK de niños con infección y sin infección.....	31
Tabla 3. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de células ayudadoras (CD4+CD62L-) y citotóxicas (CD8+CD28L-) de niños infectados y niños no infectados.....	32
Tabla 4. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de células vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) en niños infectados y no infectados.....	34
Tabla 5. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de células vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) en niños infectados y no infectados.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráficas y Regiones de puntos.....	24
Figura 2. Concentración de citocinas Th1 y TNF- α en sangre periférica de los niños infectados y no infectados.....	35
Figura 3. Concentración de citocinas Th2 sangre periférica de los niños infectados y no infectados.....	36
Figura 4. Porcentajes de linfocitos T, B y NK en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de infección.....	37
Figura 5. Porcentajes de células ayudadoras (CD4+CD62L-) y citotóxicas (CD8+CD28-) en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de infección.....	38
Figura 6. Porcentajes de célulasCD4+ vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de Infección.....	39
Figura 7. Concentración de citocinas Th1/Th2 y TNF- α en pacientes con infecciones bacterianas por tipo de infección.....	40

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones en México han sido y siguen siendo un problema de Salud Pública, debido a que causan altos índices de morbilidad y mortalidad entre la población infantil menor de 5 años, siendo las infecciones gastrointestinales y respiratorias las que presentan las tasas de mayor incidencia [INEGI, 2005].

Entre los principales agentes infecciosos se encuentran las bacterias, que al entrar en contacto con el huésped, inducen la activación del sistema inmunológico innato y adaptativo, con la finalidad de eliminar a estos microorganismos [Turvey & Broide, 2010]. Entre los agentes infecciosos más comunes del tracto gastrointestinal están *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* entre otros. Entre los agentes que infectan el tracto respiratorio se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae*.

La *E. coli*, es una de las causas más frecuentes de diversas infecciones bacterianas comunes, incluidos colecistitis, bacteriemia, colangitis, infecciones del tracto urinario (ITU), la diarrea del viajero, meningitis y la neumonía neonatal. La *E. coli* son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, con un tipo de metabolismo fermentativo. Son móviles por flagelos peritricos y es el habitante facultativo que se encuentra en mayor cantidad en el intestino grueso, principalmente en la mucosa del colon y típicamente coloniza el tracto intestinal de infantes a pocas horas de haber nacido. Las colonias de este comensal inusualmente causan enfermedad excepto en

huéspedes inmunocomprometidos o donde las barreras gastrointestinales han sido dañadas [Sweeney *et al.*, 1996].

Los atributos de virulencia de *E. coli*, están frecuentemente relacionados con elementos genéticos, creando nuevos factores de virulencia. Sólo las mejores combinaciones de factores de virulencia han persistido para convertirse en patotipos específicos, los cuales son capaces de causar enfermedad en individuos sanos. Tres síndromes clínicos pueden ser resultado de la infección con alguno de los patotipos: enfermedad diarrea/entérica, infecciones en el tracto urinario (UTIs) y meningitis/sepsis. Entre los patógenos intestinales existen seis categorías bien descritas: *E. coli enteropatógena* (EPEC) causa de la diarrea infantil, *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) causa de colitis-hemorrágica, *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) causante de la diarrea del viajero, *E. coli enteroagregativa* (EAEC) se asocia principalmente con diarrea persistente en los niños en los países en desarrollo, *E. coli enteroinvasiva* (EIEC) produce disentería y *E. coli disulfasemnet adherente* (DAEC) es una causa de la diarrea infantil y la diarrea del viajero en México y África del Norte [Nataro & Kaper, 1998].

Los pacientes con diarrea de la infancia producida por *E. coli* (es decir, EHEC, EAEC, DAEC, CEEA, o EPEC) presentan fiebre, diarrea con sangre y deshidratación, donde la mucosa intestinal produce una respuesta inflamatoria significativa [Nataro & Kaper, 1998].

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos gram-negativos anaerobios facultativos, fermentadores de la glucosa, catalasa positivos, oxidasa negativo y suelen ser móviles [Le Minor & Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989].

Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura. Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína-lipopolisacárido. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Los antígenos capsulares (Vi) o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin). Debido a su naturaleza química, el polisacárido Vi no induce memoria inmunológica por lo cual se requieren refuerzos cada 3 años y es poco inmunogénico en niños menores de 2 años y en adultos mayores [Salazar- González *et al.*, 2004].

La salmonelosis se considera un problema de salud pública mundial. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos [Mussaret *et al.*, 2006].

La neumonía (la lesión inflamatoria infecciosa del parénquima pulmonar con extensión y compromiso variable de los espacios alveolares, vía aérea central y el intersticio circundante) es una importante causa de hospitalización y existen diversos

factores de riesgo para contraerlas, entre las cuales se encuentran: hacinamiento, madre fumadora, contaminantes intradomiciliarios por uso de combustibles para calefacción y cocina, bajo peso de nacimiento, desnutrición, madre adolescente, baja escolaridad materna, sexo masculino y ciertas condiciones basales del paciente como inmunodeficiencia y enfermedades crónicas [Sillau, 2000].

Sin embargo, entre los principales agentes que infectan el tracto respiratorio se encuentra el *Staphylococcus aureus*, el cual es un microorganismo de gran importancia médica, ya que es reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el ser humano. Es habitante natural de piel y de membranas mucosas del hombre. Es un coco gram-positivo, no móvil, no forma esporas y es anaerobio facultativo [Velazquez-Meza, 2005; Kanafani & Floer, 2006]. Esta bacteria afecta piel, sistema nervioso central hueso, corazón, así como infecciones respiratorias y del tracto urinario [Shopsin & Kreiswirth, 2001; Velazquez-Meza, 2005].

Casi todas las cepas de *S. aureus* producen diferentes enzimas que le sirven a su colonización como hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas es la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina [Dinges *et al.*, 2000].

La toxina 1 del síndrome del shock tóxico suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial. La toxina actúa como superantígeno estimulando la liberación de varias citocinas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales producen los signos y síntomas del síndrome [Dinges *et al.*, 2000; Herzer, 2001]

La leucocidina de Panton-Valentine (PVL) la producen menos del 5% de las cepas de *S. aureus*, es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares formando poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula, así como la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave [Dinges *et al.*, 2000; Said-Salim *et al.*, 2005].

El género *Klebsiella* fue dividido en 3 principales especies sobre la base de las reacciones bioquímicas, hoy en día han demostrado 7 especies con similitudes en la homología del ADN. Estas son: (1) *Klebsiella pneumoniae*, (2) *Klebsiella ozaenae*, (3) *Klebsiella rhinoscleromatis*, (4) *Klebsiella oxytoca*, (5) *Klebsiella*, (6) *Klebsiella terrigena*, y (7) *Klebsiella ornithinolytica*. *Klebsiella pneumoniae* es la especie medicamente más importante del grupo [Nordmann *et al.*, 2009].

Klebsiellae en los seres humanos, puede colonizar la piel, la faringe o el tubo digestivo, así como heridas y la orina. Sin embargo, puede considerarse como flora normal en muchas partes del tracto intestinal, colon y tracto biliar. *K. pneumoniae* y

K. oxytoca son los 2 miembros de este género responsables de la mayoría de las infecciones humanas. Son patógenos oportunistas que se encuentran en el medio ambiente y en las superficies mucosas. La infección con *Klebsiella* se produce en los pulmones, donde provocan cambios destructivos. La necrosis, inflamación y hemorragias se producen dentro del tejido pulmonar, a veces produciendo esputo con sangre. *K. pneumoniae* característicamente afecta a uno de los lóbulos superiores del pulmón, aunque la infección de los lóbulos inferiores no es infrecuente [Won *et al.*, 2011].

1.1 Las células del sistema inmunológico en la respuesta adaptativa

Para que los linfocitos T puedan ser activados, necesitan la presentación de antígenos a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras del antígeno (APC) al receptor TCR, lo cual resulta en activación, proliferación y diferenciación de las células linfoides, adquiriendo una gran variedad de funciones tanto efectoras como de memoria. Entre los diferentes tipos celulares se encuentran los linfocitos TCR⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ y los TCR⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁺ [Woodland & Dutton, 2003]. Estas subpoblaciones presentan el antígeno de superficie CD45, también conocido como antígeno leucocitario común, una glicoproteína de membrana la cual se presenta en dos isoformas: la proteína CD45RA que es característica de células vírgenes, es decir, células que no han tenido contacto con algún agente infeccioso; y el marcador CD45RO presente en las células de memoria o activados, o sea linfocitos que ya tuvieron contacto con algún agente infeccioso [Hermiston *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2007]. La respuesta mediada

por células CD4+ y CD8+ de memoria, es más rápida y específica, además de que pueden controlar infecciones secundarias eliminando de forma más eficiente y totalmente al agente patógeno [Kaech *et al.*, 2002].

Los linfocitos T CD4+ de memoria tienen la facultad de fortalecer la respuesta inmunológica, al tener la capacidad de activar y reclutar las células de la inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas y NK) y adaptativa (linfocitos T y B), que en conjunto potencializan la eliminación de agentes infecciosos como bacterias y virus [Booth *et al.*, 2010; McKinsty *et al.*, 2010].

Adicionalmente, los linfocitos T también expresan otros fenotipos relacionados con funciones efectoras, que se pueden reconocer con el marcador de superficie CD28 y el CD62L (L-selectina); la pérdida de estos marcadores resulta en la diferenciación a células CD28- o CD62L- [Roman *et al.*, 2002; Gaddi *et al.*, 2005; Alvater *et al.*, 2006]. Las células CD8+CD28- tienen funciones citotóxicas y son productoras de perforinas y granzimas, las cuales propician la eliminación de células blanco; así como de citocinas, principalmente IFN- γ y TNF- α . A este tipo celular se le ha relacionado con la eliminación de bacterias intracelulares, así como con la respuesta de tipo Th1 [Uda *et al.*, 2001; Mertens *et al.*, 2009].

La diferenciación de células T CD8+ vírgenes hacia células efectoras está altamente relacionada con la expansión clonal, ya que las células vírgenes están programadas para expandirse y diferenciarse a células citotóxicas después del contacto con el

antígeno y de recibir las señales de las moléculas coestimuladoras y citocinas. Sin embargo, las propiedades de células efectoras son adquiridas después de 2-24 h de la estimulación; este desarrollo consta de varias ventajas, ya que evita que las células citotóxicas queden atrapadas en los órganos linfoides y puedan migrar hacia el sitio de infección y/o inflamación, eliminando a las células infectadas. Además las células T CD8+ de memoria, están directamente correlacionadas con el tamaño de la población de células efectoras [Hou *et al.*, 1994; Bousso *et al.*, 1997; Busch *et al.*, 1998].

En lo que respecta a la diferenciación de las células T CD4+ efectoras, se ha observado que influyen varios factores extrínsecos a comparación de la diferenciación de las células T CD8+ efectoras, como la duración de la exposición a antígenos y el tipo de citocinas presentes [Kundig *et al.*, 1996; lezzi *et al.*, 1998; lezzi *et al.*, 1999; Jelley-Gibbs *et al.*, 2000; Langenkamp *et al.*, 2000]. A diferencia de las células CD8+ vírgenes, las células CD4+ requieren más de 48 horas de un estímulo antigénico continuo para orientar hacia un tipo de fenotipos efectores Th1 o Th2 *in vitro* [Langenkamp *et al.*, 2000; lezzi *et al.*, 2001; Bajenoff *et al.*, 2002].

En general, las células efectoras CD4+CD62L- para orientar hacia una respuesta inmunológica de tipo celular o de tipo humoral, lo hacen con base al tipo de citocinas que produzcan. Específicamente en la respuesta T1, se produce la IL-2, el IFN- γ y el TNF- β , mientras que en la respuesta T2, las células principalmente producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 [Jankovic *et al.*, 2001].

También las células CD4+CD62L- migran hacia los sitios de inflamación y de daño donde ponen en evidencia sus funciones efectoras con la producción de citocinas dependiendo del tipo de respuesta T1 o T2 [Hengel *et al.*, 2003; Sallusto *et al.*, 2004; Unsoeld & Pircher, 2005].

1.2 Citocinas

Las citocinas son factores solubles no antígeno específicos, que son producidos mayoritariamente por leucocitos e intervienen en la regulación de las células del sistema inmunológico y procesos inflamatorios. Estas moléculas, están implicadas en las respuestas frente a agentes infecciosos, pero en ocasiones pueden ser responsables de procesos patológicos. Dichas moléculas, ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana contribuyendo en la activación de células linfoides, en la diferenciación hacia células efectoras y de memoria, así como, regulando también otros procesos como la apoptosis [Pinto *et al.*, 2006].

1.2.1 Interleucina 2

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina helicoidal, con peso molecular de 15 kD, formada por 153 aminoácidos, posee actividad autócrina y parácrina, es producida principalmente por células T CD4+ activadas, además de células dendríticas activadas, NK y NKT, después de un periodo de hasta 12 h de recibido el estímulo. La secreción transitoria de IL-2 depende de la inducción transcripcional por el TCR y la estabilización del RNAm de IL-2 por señales coestimuladoras, seguidas de una

pausa en la transcripción del gene de la IL-2 y una rápida degradación del RNAm de la IL-2 [Rikert *et al.*, 2005].

El receptor de IL-2 (IL-R) consiste en tres subunidades, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122), y la cadena gamma común o γ c (CD132). La estructura de la IL-2 unida a su receptor revela que cada subunidad del receptor se pone en contacto con la IL-2 originando un complejo cuaternario, el cual induce la señalización que depende de CD122 y CD132 [Rikert *et al.*, 2005].

Los linfocitos T y B en reposo no expresan el receptor de IL-2, éste solamente se expresa cuando existe un estímulo antigénico. La principal acción es estimular la proliferación, activación y diferenciación de linfocitos T, B y macrófagos, así como estimular la citotoxicidad de los linfocitos Tc y de las células NK [Trotta, 1991]. Promueve la expresión de receptores de membrana para otros factores de crecimiento y la expresión de MHC II [Arai, 1990].

Las células NK expresan el receptor para IL-2 cuando se encuentran en reposo, lo cual da lugar a su proliferación y a un aumento de su capacidad citotóxica. En el caso de los monocitos, la expresión del receptor también se da cuando las células se encuentran en reposo, y su activación da lugar a la producción de otras citocinas como IL-1 y TNF (Voss 1992).

1.2.2 Interferon- γ

El interferón- γ (IFN- γ) es una proteína que forma parte de la inmunidad celular, así como de la respuesta inflamatoria, el gen que la codifica se localiza en el cromosoma humano 12q15 [Bureau *et al.*, 1995]. Es producido por linfocitos T y células NK en respuesta a estimulación de lectinas o antígenos [Perussia *et al.*, 1980; Khabar & Young, 2007]. Se considera como una citocina pleiotrópica y dentro de sus funciones se sabe que activa a los macrófagos potencializando la eliminación del agente patógeno, así como aumentando su actividad antitumoral con la producción de TNF- α . La producción por células T, se vuelve la mayor fuente de dicha citocina en la respuesta inmune adaptativa [Frucht *et al.*, 2001; Sen, 2001].

El IFN- γ induce la diferenciación de las células T CD4+ a células Th1 [Smeltz *et al.*, 2002], colaborando de manera eficaz con la eliminación de patógenos intracelulares, además de que inhibe la proliferación de células B, induce la diferenciación de células con alta afinidad al receptor IgG llamado Fc-g-RI, activa la maduración de granulocitos, incrementa la expresión de MHC, promueve la síntesis de enzimas, las cuales promueven la destrucción de mRNA y rRNA, impidiendo la síntesis viral intracelular [Schroeder *et al.*, 2004].

El receptor funcional del IFN (IFNGR), comprende dos tipos de ligandos, cadenas IFNGR1, asociadas con la transducción de dos señales y cadenas IFNGR2, asociadas con la vía de señalización. Las cadenas IFNGR1 e IFNGR2 pertenecen a

la familia de receptores de citocinas tipo II, el cual es una clase de receptores que se une al ligando en un pequeño ángulo V formado por dos Ig [Schroeder *et al.*, 2004].

1.2.3 Factor de necrosis tumoral- α

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una glicoproteína de 185 aminoácidos, la cual puede diferenciarse en dos formas: TNF- α (idéntica a la caquexina) y TNF- β (idéntica a la linfoxina). Es una citocina proinflamatoria y participa en las reacciones agudas, tiene efectos pleiotrópicos en varios tipos celulares y juega un rol muy importante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas [Feldmann & Maini, 2001; Bradley, 2008].

El TNF- α es producido por numerosas células, incluyendo monocitos, macrófagos en respuesta a lipopolisacáridos, fibroblastos y células epiteliales. Otras células que lo producen al ser estimuladas son, células T, granulocitos, células musculares lisas, queratinocitos, fibroblastos y células del glioblastoma [Tracey & Cerami, 1993; Campbell *et al.*, 2003].

Las funciones del TNF- α incluyen su papel en la respuesta inmune contra diversos patógenos, así como su papel en la necrosis de tumores específicos. El TNF- α aumenta la permeabilidad vascular, estimulando la quimiotaxis, ya que se da el reclutamiento de los macrófagos y neutrófilos al sitio de la infección. TNF- α secretada por los macrófagos causa coagulación de la sangre que sirve para contener la infección [Garcia & Kaski, 2000].

Se conocen dos receptores para el TNF- α : TNF-R1 y TNF-R2. El TNF-1 se encuentra en la porción extracelular y está estructuralmente relacionado con el NGF (factor de crecimiento neuronal) y con el antígeno humano CD-40. La porción intracelular del TNF-R1 contiene el llamado "dominio" de muerte que está implicado en los procesos que llevan a la muerte celular programada [Campbell *et al.*, 2003].

Por el contrario, el TNF-R2 carece de dominio de muerte. Sin embargo, también puede iniciar la muerte celular estimulando el TNF-R1. Los dos receptores pueden activar las vías de transducción de señales permitiendo al TNF el promover la proliferación celular, o la movilización de los leucocitos. Los TNF-R se encuentran en las células mononucleares, la membrana sinovial, la sangre periférica y el líquido sinovial aunque también existen receptores libres en solución que han sido excretados por los mononucleares [Campbell *et al.*, 2003].

1.2.4 Interleucina 4

La interleucina 4 (IL-4) es producida principalmente por linfocitos Th2, pero también por mastocitos, basófilos, NKT y células de la médula ósea. Es una citocina pleiotrópica que modula diferentes acciones de la respuesta Th2: por una parte estimula la diferenciación de linfocitos B [Abelsira-Amar O *et al.*, 1992]; inhibe a las células Th1 para que dejen de producir las citocinas proinflamatorias IFN- γ e IL-2; posee una acción inmunosupresora ya que inhibe la actividad de los linfocitos NK y los macrófagos; induce la producción de IL-1Ra con lo que inactiva a la IL-1 y finalmente induce el crecimiento y proliferación de los linfocitos B [Swain *et al.*, 1990].

1.2.5 Interleucina 5

La interleucina 5 (IL-5) es producida por los linfocitos Th2 después de la estimulación con antígenos. Sus funciones son estimular el crecimiento de las células B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Actúa también como mediador en la activación de los eosinófilos. La IL-5 es una glicoproteína en forma de homodímero formado por 134 aminoácidos con una peso molecular de 12.5 kDa [Azuma *et al.*, 1986; Yokota *et al.*, 1987]

El gen de la IL-5 está localizado en el cromosoma 11 próximo a los genes que codifican la IL-3, la IL-4 y el factor estimulante de crecimiento de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) que son frecuentemente co-expresados en las células Th2. Se une a su receptor IL-5R que consta de dos polipéptidos heteroméricos, la IL-5 (IL-5R α) y la IL-5R β 10 [Wong *et al.*, 1995; Schrader *et al.*, 1986; Verschelde, 1998].

La IL-5 es conocida por su principal actividad en las células B y eosinófilos, ya que en las células B induce la diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de IgA [Bracke, 1997].

1.2.6 Interleucina 6

La IL-6 es una glicoproteína conformada por 184 aminoácidos, codificada por un gen ubicado en el brazo corto del cromosoma 7 [Scheller *et al.*, 2006]. Es pleiotrópica secretada por monocitos/macrófagos, células T, células B, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, y neuronas [Jones, 2005].

El receptor humano de la IL-6 (IL-6R) es una glicoproteína de membrana tipo I que no posee un dominio intracelular de transducción de señales; por lo tanto, la unión de la IL-6 con su receptor no promueve la activación celular [Papanicolau *et al.*, 1998].

La IL-6 es la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda, como: proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina, ferritina, algunas proteínas del sistema del complemento, diferentes proteínas de la cascada de la coagulación y del sistema fibrinolítico. La IL-6 es, junto con IL-1, TNF- α e IFN- γ , un regulador importante de la termogénesis corporal y su papel como pirógeno endógeno está ampliamente demostrado [Saavedra Ramírez *et al.*, 2010].

La IL-6 coestimula el crecimiento de diferentes colonias de precursores hematopoyéticos; promueve el crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos e interviene en la proliferación y maduración de la serie megacariocítica [Florensa *et al.*, 2006]. También, promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B [Choy, 2004]. En los huesos la IL-6 promueve la diferenciación de monocitos/macrófagos en osteoclastos, induciendo la expresión de RANKL (receptor activator for nuclear factor κ B ligand) [De Jongh *et al.*, 2003].

En las células del endotelio vascular, la IL-6 promueve la activación mediante el aumento en la expresión de selectina-E, moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1,

del inglés “intercellular adhesion molecules”), moléculas de adhesión de las células vasculares VCAM-1 (vascular cells adhesion molecules) [Gentileti *et al.*, 2003].

1.2.7 Interleucina 10

La interleucina-10 (IL-10) pesa 18.5 kD, parece funcionar como un homodímero. Sus subunidades tienen una longitud de 160 aminoácidos. Es una pequeña proteína producida por los linfocitos Th2, así como, por APCs cuando son estimuladas por organismos bacterianos. Es conocida como una citocina que funciona como un regulador importante del sistema inmunológico [Moore *et al.*, 2001].

Al igual que otras citocinas la IL-10 tiene muchos efectos sobre las funciones de las células, como los linfocitos, monocitos, células NK, y las células dendríticas. Específicamente la IL-10 es una citocina que regula la inmunidad mediada por la inflamación. En los linfocitos T tiene efectos inhibitorios en la proliferación, supervivencia y producción de citocinas, a causa de promover una alteración en la presentación del antígeno por los macrófagos, ya que se disminuye la expresión de moléculas MHC II, Inhibe la síntesis de IFN- γ por linfocitos T CD8+, inhibe la apoptosis de célula dependientes de IL-2 debido a la sobreexpresión de Bcl-2. Sus efectos directos en los macrófagos muestran que es capaz de bloquear B7 y la expresión de ICAM-1 en respuesta a IFN- γ ; inhibe la producción de células T al disminuir la expresión de IL-12 proveniente de los monocitos, inhibe su propia producción por los monocitos, actuando de esta manera como un autoregulador e inhibe la activación de los macrófagos por el IFN- γ . En las células NK inhibe la

producción de IFN- γ y por último en los linfocitos B, induce la expresión de MHC II, estimula la diferenciación de células B a células productoras de anticuerpos, lo cual ocurre cuando la IL-10 actúa con la IL-2 y se incrementa la afinidad de las células B a el receptor de IL-2 [Itoh & Hirohata, 1995].

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones son un problema de Salud Pública en México, que afectan principalmente a niños menores de cinco años, ocupando los primeros lugares de causas de mortalidad infantil en el país. En infecciones producidas por patógenos bacterianos específicos, ya se han realizado diversos estudios y se han señalado cambios en las diferentes subpoblaciones de linfocitos o en los diversos patrones de citocinas, evidenciando los mecanismos que desencadena la inmunidad innata e inmunidad adaptativa para la eliminación de ellos. Sin embargo, no se han hecho estudios que correlacionen una gran variedad de subpoblaciones linfocitarias (que incluyan células con funciones de memoria y efectoras), con las diferentes citocinas que se sintetizan durante el momento específico de la toma de una muestra sanguínea en infecciones bacterianas respiratorias y digestivas. Por lo cual, se planteó esta investigación la que podría ayudar a establecer qué tipo de respuesta inmunológica está presente en una infección bacteriana de tipo gastrointestinal y de tipo respiratorio, ya sea la respuesta de tipo celular, la respuesta de tipo humoral o ambos tipos de respuesta al mismo tiempo.

3. HIPÓTESIS

Las infecciones bacterianas de tipo respiratorio o gastrointestinal inducen cambios en la proporción de las poblaciones de leucocitos y diferentes subpoblaciones de linfocitos, así como, en el patrón de citocinas presentes en sangre periférica de niños infectados, determinando el predominio de algún tipo de respuesta inmunológica, ya sea Th1 o Th2.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar el tipo de respuesta inmunológica predominante (Tipo 1/Tipo 2) en niños con infecciones gastrointestinales y respiratorias graves de tipo bacteriano, en función de las diferencias en la proporción de los diversos inmunofenotipos identificados a través de marcadores de membrana, así como, al patrón de citocinas en plasma.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer la proporción de las poblaciones de leucocitos y distintas subpoblaciones de linfocitos T, B y NK en niños no infectados y niños infectados, y correlacionarla con el tipo de infección.
- 2) Analizar la proporción de distintas subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria, en niños no infectados y niños infectados, y correlacionarla con el tipo de infección.

- 3) Evaluar la proporción de las subpoblaciones de linfocitos T con funciones ayudadoras y citotóxicas, en niños no infectados y niños infectados, y correlacionarla con el tipo de infección.
- 4) Determinar el patrón de citocinas en niños no infectados y niños infectados, y correlacionarla con el tipo de infección.
- 5) Identificación del agente etiológico a través de la presencia de anticuerpos específicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sujetos y toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (3 ml) de pacientes pediátricos del Hospital Materno-Pediátrico Xochimilco del Gobierno del Distrito Federal (GDF). Se colectaron 30 muestras de niños sin infección, de los cuales 9 fueron niñas y 21 fueron niños y 30 muestras de niños con infecciones gastrointestinales y respiratorias bacterianas. De los niños infectados 9 presentaron infección gastrointestinal y 21 infección respiratoria, 12 fueron niñas y 18 niños (Tabla 1).

El procedimiento médico en torno al paciente siguió los siguientes pasos:

1. Selección de los pacientes.
2. Elaboración del diagnóstico de los pacientes de acuerdo a la sintomatología y los primeros análisis de estudio.

3. Explicación y petición de la autorización de los padres.
4. Llenado de una ficha con los datos clínicos del paciente.
5. Toma de la muestra de sangre durante los exámenes de rutina, al ingreso del paciente en el hospital.

Criterios de inclusión para el grupo testigo: niños sin ninguna infección, entre 6 meses y 5 años de edad, sexo indistinto con peso y talla de acuerdo a su edad cronológica [Ramos-Galván, 1975].

Criterios de inclusión para niños infectados: infección de tipo bacteriano, enfermedad predominante respiratoria y gastrointestinal, edad entre 6 meses y 5 años de edad, sexo indistinto con peso y talla de acuerdo a su edad cronológica.

Criterios de exclusión para todos los niños: enfermedades virales, tuberculosis, malformaciones congénitas, autoinmunes, cardiopatías, complicaciones en el parto, niños prematuros. Transfusiones y la administración prolongada (más de tres días) de medicamentos previos a la hospitalización.

Con los pacientes seleccionados, se formaron los siguientes grupos de estudio.

Grupo 1: Integrado por niños sin infección.

Grupo 2: Integrado por niños con infección, con este grupo de pacientes se formaron grupos de estudio de acuerdo al tipo de infección:

Grupo a: Integrado por niños con infección gastrointestinal grave de tipo bacteriano.

Grupo b: Integrado por niños con infección respiratoria grave de tipo bacteriano.

Tabla 1. Características de los pacientes pediátricos.

Grupo	Sexo	Edad (Intervalo)	Tipo de infección
Niños no infectados (n= 30)	Femenino n=9	Femenino (8m – 5a)	Sin infección
	Masculino n=21	Masculino (7m – 5a)	
Niños infectados (n= 30)	Femenino n=12	Femenino (9m – 5a)	Gastrointestinal (9) (Femenino n= 6; Masculino n= 3)
	Masculino n=18	Masculino (8m – 5a)	Respiratoria (21) (Femenino n= 6; Masculino n=15)

n: número de muestra, a: años, m: meses

El estudio fue aprobado por el Comité Médico de Ética de la Dirección General de Servicios Médicos del GDF, Ciudad de México.

5.2 Análisis de subpoblaciones celulares por medio de Citometría de flujo

La sangre fue colectada en tubos Vacoutainer™ con anticoagulante EDTA y procesada el mismo día de su obtención. Para identificar los diferentes tipos

celulares, se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales de diferente especificidad conjugados con fluorocromos. Los fluorocromos que se emplearon fueron: fluoresceína (FITC verde), ficoeritrina (PE naranja), proteína piridina cloridina (PerCP rojo) y afidil colina (APC rojo). La combinación de anticuerpos conjugados utilizados fueron: FITC-anti-CD45/PE-anti-CD14; FITC-anti-CD3/PE-anti-CD16+CD56/PerCP-anti-CD19; FITC-anti-CD45RA/PE-anti-CD45RO/PerCP-anti-CD3/APC-anti-CD4; FITC-anti-CD45RA/PE-anti-CD45RO/PerCP-anti-CD3/ APC-anti-CD8; FITC-anti-CD4/PE-anti-CD62/PerCP-anti-CD3 y FITC-anti-CD8/PE-anti-CD28/PerCP-anti-CD3 (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*).

Para hacer la tinción de células, la adquisición de los datos y el análisis se procedió de la siguiente manera [Landay & Muirhead, 1989; Nicholson *et al.*, 1994]:

- 1) Se colocaron en tubos de polipropileno de 12x75 mm, 100 μ L de sangre y 20 μ L de la mezcla de anticuerpos, posteriormente se agitaron 3 segundos en un vortex a baja velocidad, para después incubarlos durante 20 min a temperatura ambiente, sin exponerlos a la luz directa.
- 2) Después se trató la muestra con solución de lisis para eliminar los eritrocitos. Se agregaron 3 ml de solución de lisis a cada tubo, se mezclaron por 3 segundos en el vortex y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente sin exponer a la luz directa. Se centrifugaron a 300 xg (1342 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente.

- 3) Después se aspiró el sobrenadante y se añadió 2 ml de PBS a cada tubo, se agitaron en el vortex 3 seg y se centrifugó a 200 xg (1096 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente.
- 4) Finalmente se aspiró el sobrenadante y se añadió 0.5 ml de paraformaldehído al 1 % con NaN_3 al 0.1 %. Las muestras fueron analizadas en el citómetro inmediatamente o durante las primeras 24 h, guardándolas en refrigeración y oscuridad.
- 5) El análisis de las muestras se realizó en un Citómetro de flujo modelo FACScalibur (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems; San Jose, CA*), con el software CELL Quest II.
- 6) En cada evento se analizaron 10,000 células. La región para el análisis de las proporciones de leucocitos y las diferentes subpoblaciones de linfocitos se realizó en base a forward-scatter, FL-3-scatter o FL-4-scatter para obtener la subpoblación deseada, y se realizaron gráficas de puntos de dos fluorescencias como se muestra en la Figura 1.
- 7) Los números absolutos se obtuvieron multiplicando el % de la subpoblación buscada/100 * número de linfocitos de la Biometría Hemática (BH)/100 * número de leucocitos de la BH.

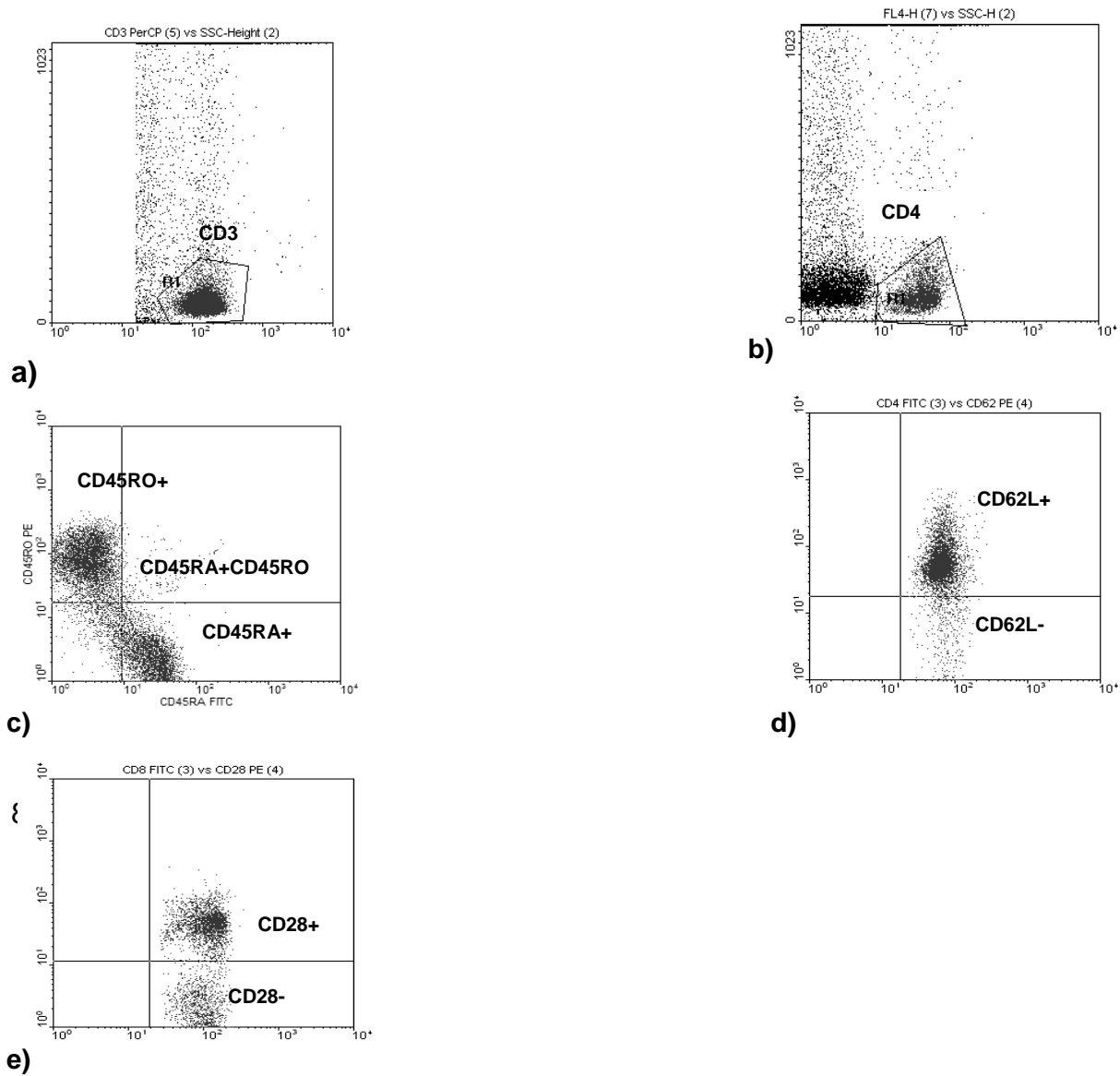


Figura 1. Gráficas y Regiones de puntos. a) y b) Regiones en FL-3-SSC, y FL-4 para las subpoblaciones CD3+, CD4+ o CD8+. c) Dot Plot FL-1-FL-2 para definir células vírgenes y de memoria (CD45RA+ y CD45RO+); d) Dot Plot FL-1, FL-2 para definir células ayudadoras (CD4+CD62L-); e) Dot Plot FL-1-FL-2 para definir células citotóxicas

5.3 Análisis de citocinas plasmáticas por medio de ELISA

Para la detección de citocinas en el plasma de los niños, se tomó 1 ml de las muestras de sangre y se centrifugó a 335 xg (1500 rpm) durante 5 min para obtener

el plasma. Posteriormente para determinar las concentraciones de citocinas tipo 1: IL-2 e IFN- γ ; citocinas tipo 2: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y TNF- α , se utilizó un kit comercial para la realización de la prueba de ELISA (*Peprotech*), empleando la siguiente metodología [Palacios, 2002] con algunas modificaciones:

- 1) Se agregó el anticuerpo de captura para la citocina correspondiente a cada placa y se dejó incubar toda la noche. Después las placas fueron bloqueadas con 300 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) en amortiguador de fosfatos (PBS).
- 2) Posteriormente se adicionaron 100 μ l de muestra (plasma) en cada pozo, y se incubaron 2 h a temperatura ambiente.
- 3) A la par se realizó la Curva Patrón, utilizando diluciones seriales a partir de cada citocina pura, para obtener diferentes concentraciones dependiendo de la interleucina a estudiar:
- 4) Se agregaron 100 μ l de cada dilución en los pozos e incubaron 2 h a temperatura ambiente.
- 5) Posteriormente se agregaron 100 μ l del anticuerpo secundario y se incubó durante 2 h.

6) Se añadieron 100 µl del sustrato (ABTS) a cada pozo y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

7) Finalmente se tomó lectura en un lector de ELISA a 450 nm.

5.4 Determinación de la presencia de anticuerpos contra agentes infecciosos por medio de ELISA

Para determinar el tipo de bacteria causante de la infección y debido a que no se pudo realizar un análisis microbiológico de las muestras de los pacientes por problemas éticos y metodológicos, se decidió establecer la presencia de anticuerpos contra algunos agentes infecciosos por medio de la técnica de ELISA empleando el plasma de los niños infectados.

Para las muestras de los niños con infecciones gastrointestinales, se utilizaron como antígenos, proteínas de la membrana externa de dos cepas de *E. coli*, EHEC y EPEC, y *Salmonella Typhi*. Para las muestras de pacientes con infecciones respiratorias se emplearon como antígenos extractos proteicos de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los agentes infecciosos gastrointestinales y *K. pneumoniae*, se sembraron por separado en agar nutritivo para la obtención de los antígenos que los identifican, una colonia de cada agente se inoculó en 50 ml de medio LB (Luria Bertain) y se incubó a 37 °C durante 24 hrs. La técnica para la extracción de las proteínas de membrana fue la siguiente con algunas modificaciones [Boissinot *et al.*, 1987].

- 1) Transcurrido el tiempo los cultivos se centrifugaron a 2682 xg (12000 rpm) por 10 minutos y el paquete celular fue resuspendido en 5 ml de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2. Esta suspensión bacteriana fue lisada hasta su clarificación por medio de sonicación en ciclos con 9 segundos de descanso a una amplitud del 21%.
- 2) El lisado bacteriano fue centrifugado a 2682 xg (12000 rpm) durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante (membranas celulares), el cual fue sometido nuevamente a centrifugación a 2682 xg (12000 rpm) durante 15 min.
- 3) El botón obtenido fue resuspendido con 2 ml de Na₂HPO₄ 10 mM, con 2% de tritón X-100 y se incubó a 37°C por 30 min para posteriormente centrifugarse a 2682 xg (12000 rpm) xg por 30 min.
- 4) Las proteínas recuperadas fueron suspendidas en 200 ul de PBS y analizadas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.
- 5) Estas proteínas fueron también cuantificadas por medio de espectrofotometría en un ensayo colorimétrico (Bradford).
- 6) Para la prueba de ELISA se fijaron 2 ug de proteína por pozo para todos los agentes. Previo a su colocación en las microplacas, el antígeno fue tratado con SDS y EDTA.

- 7) Finalmente las placas fueron bloqueadas con 150 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS y se utilizaron para evaluar la presencia de anticuerpos en el plasma de los pacientes.
- 8) Para la evaluación de anticuerpos se hicieron dos diluciones del plasma 1:150 y 1:450, 100 μ l de estas diluciones se adicionaron a pozos diferentes.
- 9) La placa se incubó a 37°C durante 2 h.
- 10) Finalizado este periodo, se añadieron 100 μ l de una dilución 1/1000 de antiIgG humano conjugado con peroxidasa, nuevamente se incubó a 37°C, 2 h) y finalmente se agregaron 100 μ l de solución Sustrato- Cromógeno (1.9 mM ABTS y 0.1 mM H₂O₂) para realizar lecturas a los 20 minutos en un lector de ELISA a longitud de onda de 405 nm.

En el caso de *Staphylococcus aureus* para la extracción de proteínas presentes en las toxinas secretadas por dicha bacteria, del medio de cultivo se tomó una colonia y fue inoculada en 10 ml de caldo tripticasa de soya e incubada toda la noche a 37 °C en agitación. Posteriormente 1 ml de este cultivo fue adicionado a 1 L de caldo tripticasa soya el cual se dejó incubar a 37°C durante 12 h con agitación 22 xg (110 rpm). El cultivo fue centrifugado a 6000 xg (26840 rpm) por 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado y las proteínas disueltas en él fueron precipitadas con ácido tricloro acético al 10%. Los paquetes obtenidos se lavaron con etanol al 70%

seis veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las proteínas fueron resuspendidas en 50 ul de PBS, cuantificadas y colocadas en placas de ELISA con el procedimiento antes señalado.

5.5 Análisis estadístico

Para el análisis de las subpoblaciones se determinaron por grupo de estudio la media de los porcentajes y de los números absolutos, así como el error estándar de cada población celular. Para hacer el análisis de varianza entre los grupos de estudio se utilizó el programa JMP y las diferencias estadísticas se definieron con la prueba t student, la significancia fue establecida cuando $p < 0.05$. Para el análisis estadístico de las citocinas se utilizó una prueba no paramétrica (U de Mann-withney) [Karlsson *et al*, 2004]. Para el análisis del agente infeccioso se utilizó la prueba de la teoría del límite central [Kurstak, 1985].

6. RESULTADOS

Se analizaron muestras sanguíneas de pacientes pediátricos sin infección, los cuales acudieron al Hospital Materno-Pediátrico Xochimilco para la realización de cirugías ambulatorias (en el caso de los niños fue por procesos de fimosis y en el de las niñas por presencia de hernias) y pacientes pediátricos con infecciones gastrointestinales y respiratorias. Los pacientes con infección respiratoria en el momento de su admisión al hospital presentaban fiebre, tos y diferentes grados de insuficiencia respiratoria. Los niños con infección gastrointestinal manifestaron diarrea, fiebre y diversos niveles de deshidratación.

En el momento de la hospitalización las pruebas de biometría hemática mostraron en los niños infectados un porcentaje promedio de hemoglobina (Hb) de 13.4 ± 0.3 g/dL, leucocitos $13,000$ células/mm³, de los cuales el $30.2 \pm 3.2\%$ fueron linfocitos y el $58.9 \pm 3.8\%$ neutrófilos. Para los niños sin infección se observó un porcentaje promedio de Hb de 13.2 ± 0.5 g/dL, leucocitos $8,200$ células/mm³, $47.7 \pm 2.9\%$ de linfocitos y $37.6 \pm 2.7\%$ de neutrófilos.

6.1. Subpoblaciones linfocitarias

El análisis con citometría de flujo de los distintos tipos de leucocitos, mostraron que el porcentaje promedio de los linfocitos totales fue menor en los niños infectados que en los niños sanos (43.1 ± 3.3 vs $57.5 \pm 3.6\%$, $p < 0.006$, respectivamente). Por otro lado, los granulocitos (47.1 ± 3.2 vs $35.4 \pm 3.6\%$, $p < 0.02$) y los monocitos (9.4 ± 1.3 vs $4.0 \pm 1.4\%$, $p < 0.008$) se encontraron significativamente incrementados en los niños infectados, comparados con los niños sin infección. Con relación a los números absolutos se encontró la misma tendencia, células linfoides disminuidas, mientras que los granulocitos y monocitos aumentados en los pacientes infectados con relación a los no infectados ($p < 0.05$) (Tabla 2).

Los linfocitos T (CD3+) y NK (CD16+CD56+) no mostraron diferencias estadísticas ni en el porcentaje ni en los números absolutos entre los grupos de estudio. Por otro lado, los linfocitos B (CD19+) se observaron en mayor porcentaje en los niños infectados en comparación con los niños sin infección (24.2 ± 2.2 vs $16.6 \pm 2.7\%$,

p<0.03, respectivamente), observándose el mismo comportamiento en los números absolutos (p<0.05) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de leucocitos, linfocitos T, linfocitos B y células NK de niños con infección y sin infección.

Tipo celular	Niños no infectados	Niños infectados
Linfocitos	57.5 ± 3.6 2512 ± 2015	43.1 ± 3.3* 1924 ± 460*
Granulocitos	35.4 ± 3.6 1520 ± 111	47.1 ± 3.2* 2022 ± 241*
Monocitos	4.0 ± 1.4 154 ± 16	9.4 ± 1.3* 362 ± 33*
Linfocitos T (CD3+)	53.9 ± 2.5 2674 ± 246	52.3 ± 2.8 2594 ± 422
Linfocitos B (CD19+)	16.6 ± 2.7 699 ± 135	24.2 ± 2.2* 1019 ± 129*
NK (CD16+CD56+)	11.6 ± 1.9 487 ± 191	12.1 ± 1.5 606 ± 185

Números absolutos (10⁶/L) indicados en negritas

Datos expresados como media ± error estándar

n: 30 Niños no infectados; n: 30 Niños infectados

* Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: linfocitos p<0.006 para relativos **y números absolutos p<0.05**; granulocitos p<0.02 para relativos **y números absolutos p<0.05**; monocitos para relativos p<0.008 **y números absolutos p<0.05** y linfocitos B p<0.03 para relativos **y números absolutos p<0.05**.

6.2 Células efectoras

Con respecto a las células efectoras, se encontró que los niños infectados mostraron un aumento en el total de los linfocitos T CD3+CD62L- con relación a los niños sin

infección (35.7 ± 5.5 vs $24.5 \pm 3.6\%$, $p < 0.02$) y de igual manera en los números absolutos ($p < 0.01$). Lo que respecta a las células ayudadoras CD4+CD62L-, también se observó incremento en los porcentajes en los niños con infecciones (23.8 ± 3.5 vs $11.3 \pm 3.3\%$, $p < 0.01$) y en los números absolutos ($p < 0.02$) con relación a los niños sin infección. Del mismo modo, se encontró mayor porcentaje de células citotóxicas CD8+CD28- en los niños infectados con respecto a los niños no infectados (30.2 ± 3.1 vs $20.0 \pm 3.1\%$, $p < 0.02$), y también se observó ésta tendencia en los números absolutos ($p < 0.04$) (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de células ayudadoras (CD4+CD62L-) y citotóxicas (CD8+CD28L-) de niños infectados y niños no infectados.

Tipo celular	Niños no infectados	Niños infectados
CD3+	56.6 ± 6.1 2993 ± 261	54.0 ± 6.7 2856 ± 558
CD3+CD62L-	24.5 ± 5 2259 ± 154	$35.7 \pm 5.5^*$ 3292 ± 267*
CD3+CD28-	24.0 ± 4.3 1124 ± 174	28.9 ± 5.2 1354 ± 327
CD4+	33.3 ± 3.0 1416 ± 152	21.4 ± 3.1 910 ± 254
CD4+CD62L-	11.3 ± 3.3 486 ± 205	$23.8 \pm 3.5^*$ 1023 ± 294*
CD8+	19.6 ± 2.2 952 ± 105	21.0 ± 2.2 1020 ± 164
CD8+CD28-	20.0 ± 3.1 854 ± 94	$30.2 \pm 2.1^*$ 1284 ± 165*

Números absolutos ($10^6/L$) indicados en negritas

Datos expresados como media \pm error estándar

n: 30 Niños no infectados; n: 30 Niños infectados

* Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: CD3+CD62L- $p < 0.02$ para relativos y **números absolutos $p < 0.01$** ; CD4+CD62L- $p < 0.01$ para relativos y **números absolutos $p < 0.02$** ; CD8+CD28- $p < 0.02$ para relativos y **números absolutos $p < 0.04$** .

6.3 Células de memoria

El análisis de los linfocitos vírgenes y de memoria mostró que los linfocitos T CD3+ se encontraron disminuidos en los niños infectados con respecto a los no infectados (49.1 ± 4.5 vs $70.1 \pm 4.5\%$, $p < 0.001$, respectivamente); encontrando el mismo comportamiento en los números absolutos ($p < 0.0001$). En el total de las células vírgenes (CD3+CD45RA+) no se mostraron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio. Con respecto a las células de memoria (CD3+CD45RO+; CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+), se observó un mayor porcentaje en los niños infectados comparados al grupo control (25.4 ± 1.9 vs $17.1 \pm 1.9\%$; 35.5 ± 1.9 vs $16.7 \pm 1.8\%$ y 34.0 ± 2.1 vs $11.3 \pm 2.0\%$, $p < 0.0001$, respectivamente); de igual forma se encontraron diferencias significativas en los números absolutos ($p < 0.01$, $p < 0.002$ y $p < 0.04$, respectivamente). Con relación a las células vírgenes, estas se encontraron significativamente disminuidas en las subpoblaciones CD4+CD45RA+ (53.6 ± 2.5 vs $69.9 \pm 2.4\%$, $p < 0.0001$) y CD8+CD45RA+ (54 ± 3.1 vs $73.6 \pm 3.0\%$, $p < 0.001$) en los niños con infección en comparación con los niños sin infección, (y los números absolutos mostraron la misma tendencia; $p < 0.007$ y $p < 0.01$) (Tabla 4).

Por otra parte, los linfocitos T CD8+ se encontraron en mayor porcentaje en los niños infectados con relación a los niños sin infección (31.9 ± 2.1 vs $20.1 \pm 2.0\%$, $p < 0.003$); también se observó un mayor número absoluto de estas células en los niños infectados ($p < 0.05$). Sólo el porcentaje y números absolutos ($p < 0.05$) de linfocitos T CD4+ dobles positivas (CD4+CD45RA+CD45RO+) fue mayor en los niños infectados con relación a los niños sin infección (11.0 ± 0.7 vs $8.2 \pm 0.7\%$, $p < 0.01$) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes y números absolutos en sangre periférica de células vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) en niños infectados y no infectados.

Tipo celular	Niños no infectados	Niños infectados
CD3+	70.1 ± 4.5 2995 ± 364	49.1 ± 4.5* 2098 ± 625*
CD3+CD45RA+	68.0 ± 2.6 3056 ± 235	63.1 ± 2.6 2791 ± 466
CD3+CD45RO+	17.1 ± 1.9 685 ± 118	25.4 ± 1.9* 1023 ± 153*
CD3+CD45RA+CD45RO+	10.9 ± 1.2 447 ± 42	10.6 ± 1.2 435 ± 90
CD4+	43.4 ± 2.8 1921 ± 176	38.5 ± 2.9 1704 ± 318
CD4+CD45RA+	69.9 ± 1.9 3317 ± 335	53.6 ± 3.2* 2543 ± 560*
CD4+CD45RO+	16.7 ± 1.8 726 ± 81	35.5 ± 1.9* 1543 ± 167*
CD4+CD45RA+CD45RO+	8.2 ± 0.7 321 ± 32	11.0 ± 0.7* 423 ± 62*
CD8+	20.1 ± 2.0 982 ± 114	31.9 ± 2.1* 1566 ± 214*
CD8+CD45RA+	73.6 ± 3.0 2327 ± 250	54.3 ± 3.1* 1715 ± 441*
CD8+CD45RO+	11.3 ± 2.0 495 ± 162	34.0 ± 2.1* 1070 ± 180*
CD8+CD45RA+CD45RO+	10.8 ± 1.4 249 ± 53	11.3 ± 1.5 260 ± 98

Números absolutos (10⁶/L) indicados en negritas

Datos expresados como media ± error estándar

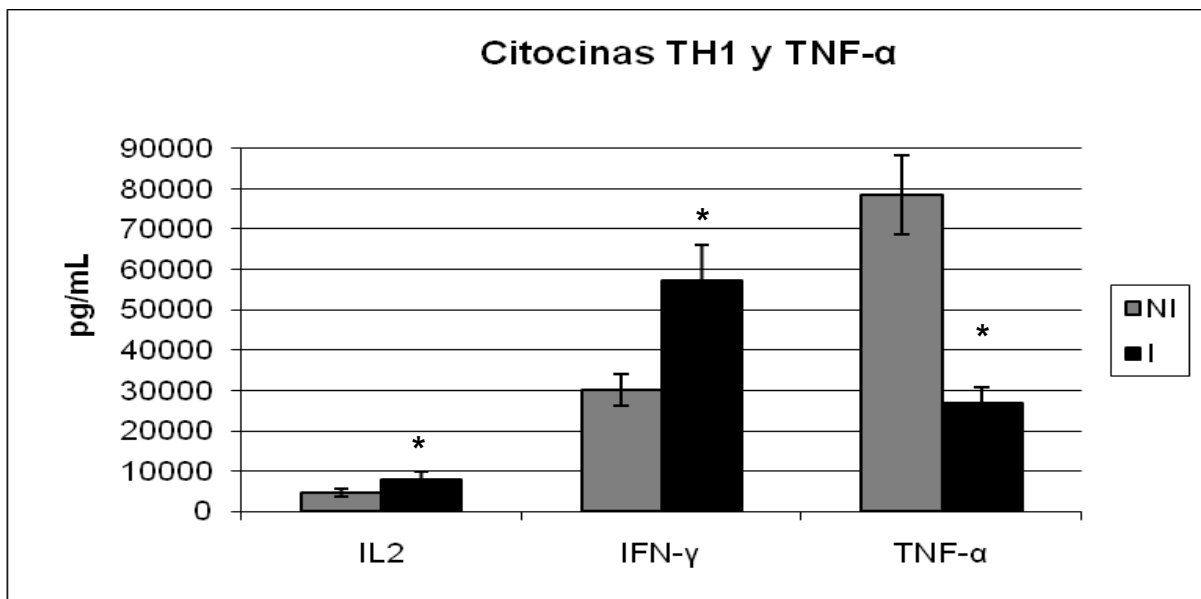
n: 30 Niños no infectados; n: 30 Niños infectados

*Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: CD3+ p<0.001 para relativos; CD3+CD45RO+ p<0.0001 para relativos y **números absolutos p<0.01**; CD4+CD45RA+ p<0.0001 para relativos y **números absolutos p<0.007**; CD4+CD45RO+ p<0.0001 para relativos y **números absolutos p<0.002**; CD4+CD45RA+RO+ P<0.01 para relativos y **números absolutos p<0.04**; CD8+ p<0.006 para relativos y **números absolutos p<0.05**; CD8+CD45RA+ p<0.001 para relativos y **números absolutos p<0.01**; CD8+CD45RO+ p<0.0001 para relativos y **números absolutos p<0.04**.

6.4. Citocinas

Al realizar el análisis de citocinas en los grupos de estudio se encontró que en los niños infectados, las concentraciones de IL-2, IFN- γ e IL-4 estaban significativamente aumentadas en sangre periférica con respecto a los niños no infectados (4759.7 ± 1981.8 vs 7940 ± 977.7 pg/ml; 30020.5 ± 4013.8 vs 57061 ± 8922.2 pg/ml; 498.9 ± 62.8 vs 870.1 ± 209.1 pg/ml; $p < 0.05$, respectivamente) (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Concentración de citocinas Th1 y TNF- α en sangre periférica de los niños infectados y no infectados.



Datos expresados como media \pm error estándar

n: 30 Niños no infectados; n: 30 Niños infectados

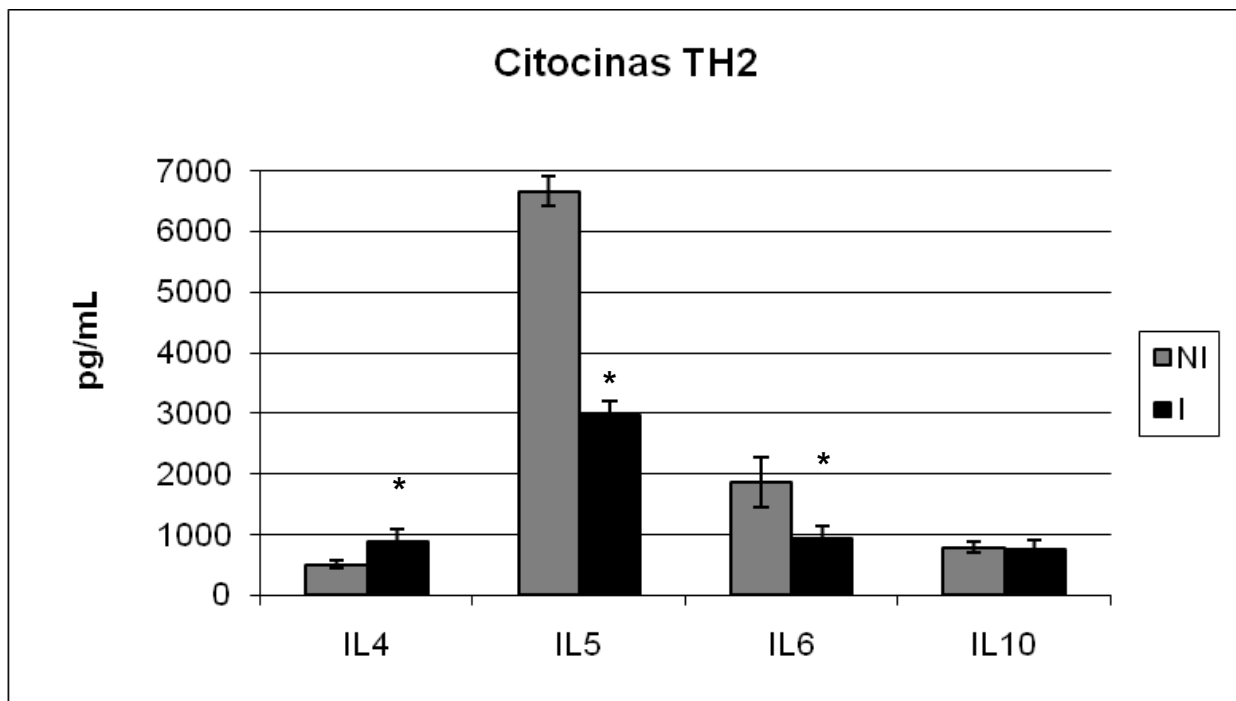
NI: No infectados; I: Infectados

*Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: IL-2 $p < 0.02$; IFN- γ $p < 0.01$; TNF $p < 0.05$.

Por su parte, en los pacientes no infectados el TNF- α , IL-5 e IL-6 mostraron una alta concentración con relación a los niños infectados (78495.7 ± 9918.5 vs 26720.0 ± 3880 pg/ml; 6654.2 ± 812.1 vs 2967.8 ± 665.9 pg/ml; 1850.2 ± 418.2 vs 919.5 ± 221.4 pg/ml,

p<0.05, respectivamente). La IL-10 no mostró diferencias entre los dos grupos de estudio (Figura 2 y 3)

Figura 3. Concentración de citocinas Th2 sangre periférica de los niños infectados y no infectados.



Datos expresados como media \pm error estándar
n: 30 Niños no infectados; n: 30 Niños infectados
NI: No infectados; I: Infectados

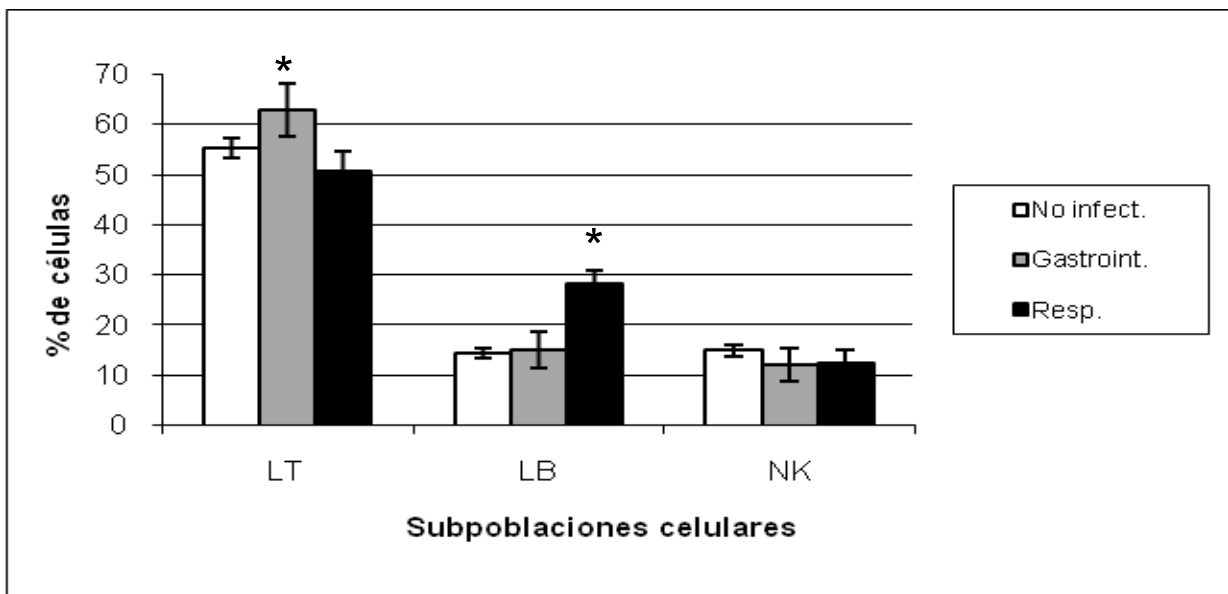
*Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: IL-4 p<0.02; IL-5 p<0.02; IL-6 p<0.05

6.5 Análisis de los inmunofenotipos celulares y citocinas entre los niños con infección gastrointestinal e infección respiratoria.

Respecto al análisis por el tipo de infección no se encontraron diferencias estadísticas en la proporción de los leucocitos. En el caso de las subpoblaciones de linfocitos, se observó un mayor porcentaje promedio de linfocitos T CD3+ en niños con infección gastrointestinal con relación a los niños con infección respiratoria

(62.8 ± 5.4 vs $49.8 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$). En contraste, se observó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos B en niños con infecciones de vías respiratorias ($28.3 \pm 2.4\%$) en comparación a los niños con infección gastrointestinal ($14.9 \pm 3.6\%$, $p < 0.0001$) (Figura 4).

Figura 4. Porcentajes de linfocitos T, B y NK en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de infección.



Datos expresados como media \pm error estándar.

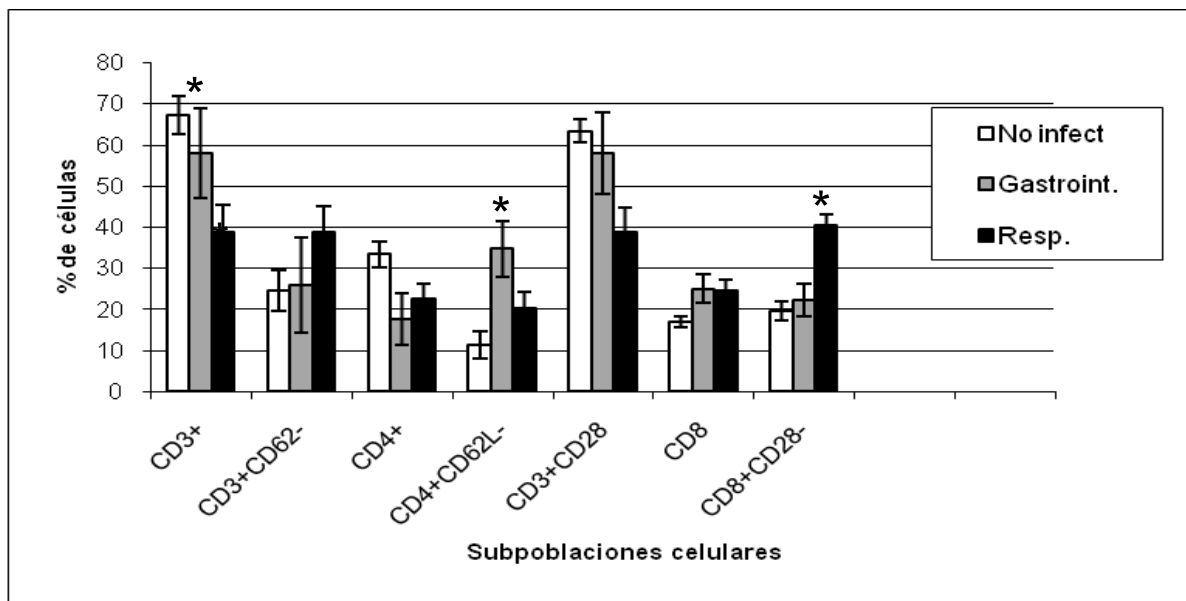
n: 30 no infectados; n: 9 infección gastrointestinal; n: 21 infección respiratoria

* Diferencia significativa entre niños no infectados, infección gastrointestinal e infección respiratoria: Linfocitos T $p < 0.05$; linfocitos B $p < 0.0001$.

En el caso de las células con funciones efectoras, los niños con infección gastrointestinal presentaron un mayor porcentaje de linfocitos CD3+ ($61.8 \pm 7.1\%$, $p < 0.0008$) y CD4+CD62L- ($34.6 \pm 6.8\%$, $p < 0.002$) con relación a los niños con infecciones respiratorias (41.7 ± 5.4 y $20.3 \pm 3.1\%$, respectivamente) (Figura 4). Del mismo modo, se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ y

CD8+CD28- en los niños con infecciones respiratorias con relación a los niños con infecciones gastrointestinales (37.7 ± 3.8 vs $29.1\pm 3.1\%$, $p<0.05$ y 33.6 ± 3 vs $23\pm 5.4\%$, $p<0.04$, respectivamente) (Figura 5).

Figura 5. Porcentajes de células ayudadoras (CD4+CD62L-) y citotóxicas (CD8+CD28-) en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de infección.



Datos expresados como media \pm error estándar.

n: 30 no infectados

n: 9 infección gastrointestinal

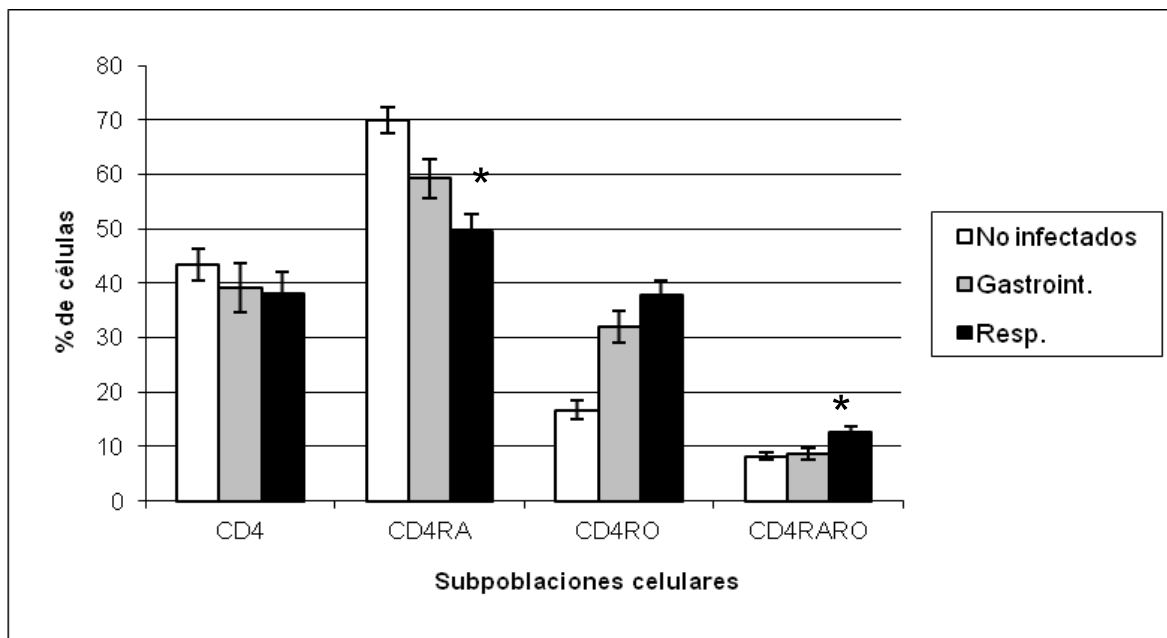
n: 21 infección respiratoria

* Diferencia significativa entre niños no infectados, infección gastrointestinal e infección respiratoria: CD3+ $p<0.0008$; CD4+CD62L- $p<0.0002$; CD8+CD28- $p<0.04$.

Con relación a los linfocitos T vírgenes y de memoria, se encontró que los niños con infección de vías respiratorias presentaron una disminución de células vírgenes (CD4+CD45RA+) con relación a los niños con infecciones gastrointestinales (48.5 ± 4.2 vs 59 ± 3.9 ; $p<0.001$). Del mismo modo, se observó mayor porcentaje de los linfocitos dobles positivos CD4+CD45RA+CD45RO+ en los niños con infección

respiratoria en comparación a los niños con infecciones gastrointestinales (12.7 ± 0.9 vs $8.7 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$) como se muestra en la Figura 6.

Figura 6. Porcentajes de células CD4+ vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+) en sangre periférica de los niños infectados por el tipo de infección.



Datos expresados como media \pm error estándar.

n: 30 no infectados

n: 9 infección gastrointestinal

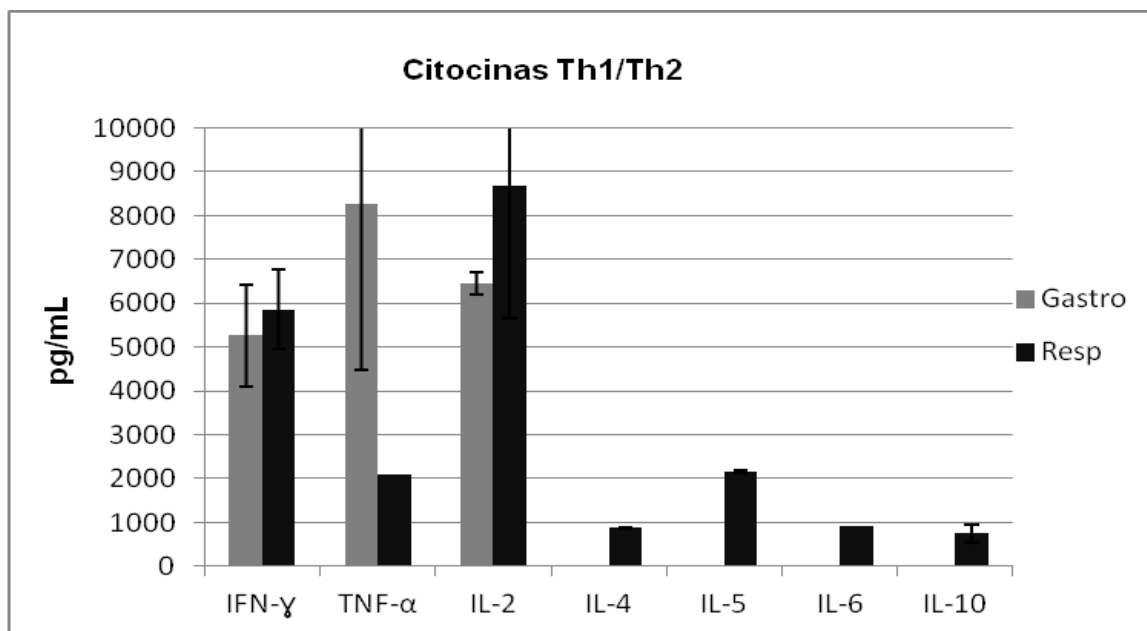
n: 21 infección respiratoria

* Diferencia significativa entre niños no infectados, infección gastrointestinal e infección respiratoria: $CD4+CD45RA+$ $p < 0.001$; $CD4+CD45RA+RO+$ $p < 0.001$.

Cuando se buscaron diferencias en los patrones de citocinas por tipo de infección, se observó que en los niños con infecciones gastrointestinales la concentración de TNF- α (8258.8 ± 3792.3 vs 2100 ± 0 pg/ml; $P < 0.05$) fue mayor con respecto a los niños con infecciones respiratorias; mientras que para los niños con infección respiratoria se encontraron elevadas concentraciones de IL-4 (870 ± 209.1 pg/ml), IL-5 (2160 ± 30 pg/ml), IL-6 (919.5 ± 221.4 pg/ml) e IL-10 (754.7 ± 132.4 pg/ml) ya que los niños con

infecciones gastrointestinales no mostraron concentraciones para dichas citocinas. La IL-2 e IFN- γ no mostraron diferencia estadística por tipo de infección (Figura 7).

Figura 7. Concentración de citocinas Th1/Th2 y TNF- α en pacientes con infecciones bacterianas por tipo de infección.



Datos expresados como media \pm error estándar

n: 30 Niños infectados; n: 21 infección respiratoria; n: 9 infección gastrointestinal

*Diferencia significativa entre niños no infectados y niños infectados: TNF $p < 0.05$.

6.6 Identificación de agentes infecciosos

El análisis de ELISA para la detección de anticuerpos contra patógenos específicos mostró que de los 9 pacientes con síntomas de infección gastrointestinal, 5 de ellos fueron positivos para antígenos de *E. coli*, 3 fueron positivos para antígenos de la variedad enterohemorrágica (EHEC 0157: H7) (0.453 ± 0.139 vs 0.052 ± 0.300 , $p < 0,05$) y 2 para antígenos de EPEC (0.400 ± 0.111 vs 0.286 ± 0.05 , $p < 0.05$), en comparación con los individuos que no muestran ninguna infección. Ninguno de los 9

pacientes con infección gastrointestinal mostró valores de absorbancia para indicar la presencia de anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de *Salmonella Typhi* (Tabla 5).

De los 21 pacientes que tenían síntomas de infección respiratoria, 14 mostraron anticuerpos contra antígenos de *Staphylococcus aureus* en relación a los pacientes no infectados (0.969 ± 0.228 vs 0.510 ± 0.05 , $p < 0.05$), 4 pacientes fueron positivos para antígenos de *Klebsiella pneumoniae* (0.632 ± 0.249 vs 0.310 ± 0.05 , $p < 0.05$), y sólo 3 pacientes no mostraron anticuerpos contra ninguno de los tipos de bacterias analizadas en este estudio. Cuando se buscaron diferencias en los inmunofenotipos celulares y en las citocinas entre los agentes infecciosos del mismo tracto no se encontraron diferencias.

Tabla 5. Valores de concentraciones de anticuerpos específicos contra diversas bacterias.

	EHEC	EPEC	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Número de pacientes	3	2	14	3
Concentración infectados	0.453 ± 0.139	0.400 ± 0.111	0.969 ± 0.228	0.632 ± 0.249
Concentración no infectados	0.052 ± 0.300	0.286 ± 0.05	0.510 ± 0.05	0.310 ± 0.05

7. DISCUSIÓN

Este estudio estuvo encaminado a dilucidar los cambios que se presentan en la proporción de células de la respuesta inmunológica como son leucocitos, células de memoria y células efectoras, así como en el patrón de citocinas producidas durante la fase aguda de la infección. Los datos obtenidos en el presente trabajo tienen la intención de contribuir a conocer los cambios que ocurren en el sistema inmunológico en niños ante infecciones graves de tipo bacteriano (respiratorias y gastrointestinales) y que puedan orientar a definir el tipo de respuesta que predomina en cada tipo de infección para la eliminación del agente causal.

Los resultados aquí obtenidos mostraron que existe un mayor porcentaje y números absolutos de granulocitos, monocitos y linfocitos B a nivel de sangre periférica en los niños infectados en comparación con los niños sin infección. Lo que podría indicar que en el momento en que se tomó la muestra sanguínea se estaba dando proliferación de estas células, sugiriendo que el sistema inmunológico del huésped estaba respondiendo en contra del agente infeccioso [Bonilla *et al.*, 2010].

Los neutrófilos y los monocitos actúan como células fagocíticas, y son las primeras que llegan al sitio de infección, además de que participan en los procesos inflamatorios. Por su parte, los monocitos además de tener como función la fagocitosis su actividad como APC es de suma importancia [Mayer, 2000; Segal, 2005]. Los linfocitos B forman parte de la inmunidad adaptativa, y son células que pueden actuar como productoras de anticuerpos y como células presentadoras de

antígeno [Kruetzmann *et al.*, 2003]. Por su parte, en trabajos con pacientes infectados por bacterias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* se ha observado que los linfocitos B se encuentran elevados a nivel periférico [Pepper *et al.*, 2010].

En el presente trabajo los porcentajes y los números absolutos de las células con funciones efectoras (CD3+CD62L-, CD4+CD62L- y CD8+CD28-) se encontraron aumentados en los niños con infecciones en comparación a los niños sin infección, aunque no se encontraron diferencias relacionadas con el tipo de agente infeccioso. Las células T CD8+ de memoria y las células que tienen funciones efectoras (CD28-) son células productoras de citocinas, como IFN- γ e IL-2. Estas citocinas hacen más eficiente la eliminación del agente causante de la infección, ya que promueven la activación de macrófagos y células NK, así como la activación y proliferación de células T. Además las células de memoria cumplen un papel muy importante en infecciones subsecuentes para la eliminación más rápida y eficiente del agente patógeno causante de la infección [Cui & Kaech, 2010; Wong & Parmer, 2010].

El aumento de células citotóxicas (CD8+CD28-), se ha relacionado con la estimulación de sus receptores a IL-2 e IL-6, lo cual hace que estas células proliferen y se activen, para producir perforinas y granzimas que inducen daño en la membrana bacteriana, lo cual provoca la muerte de la bacteria por choque osmótico o apoptosis [Wong & Parmer, 2010]. Por otra parte, el aumento de células efectoras (CD62L-) se ha relacionado con la migración de estas células efectoras a través del torrente

sanguíneo hacia los sitios de inflamación, para la posterior producción de citocinas como el IFN- γ , IL-4 e IL-5. Aspecto importante, porque el predominio de IFN- γ o IL-4 dirige hacia un tipo de respuesta adaptativa, ya sea de tipo celular (T1) o de tipo humoral (T2), siendo esto indicativo, en cualquiera de ambos casos, que se está llevando a cabo una respuesta del sistema inmunológico contra el agente patógeno [Nakagome *et al.*, 2005]. En estudios previos se ha visto que las células ayudadoras (CD4+CD62L-) y citotóxicas (CD8+CD28-) aumentan en niños con infecciones gastrointestinales y respiratorias bacterianas con relación a niños sin infecciones y desnutridos [Nájera *et al.*, 2007].

En infecciones respiratorias ocasionadas por bacterias extracelulares como el *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1, se ha observado que la presencia de sus polisacáridos capsulares estimula la producción de células citotóxicas [Harty *et al.*, 2000; Uda *et al.*, 2002]. Por otra parte, en otro estudio se observó que las células efectoras se alojan en los tejidos donde se está llevando a cabo el proceso infeccioso, garantizando así una respuesta inmediata en contra de la infección [Masopoust *et al.*, 2001].

Por otra parte, en otro estudio se observó que las células efectoras se alojan en los tejidos donde se está llevando a cabo el proceso infeccioso, garantizando así una respuesta inmediata en contra de la infección [Masopoust *et al.*, 2001].

Un aspecto importante del presente trabajo es que el porcentaje y los números absolutos de células de memoria (CD45RO+) fue mayor en los niños con infecciones bacterianas, tanto en el total de los linfocitos CD3+, como en las subpoblaciones T CD4+ y T CD8+. La presencia de mayores porcentajes de células efectoras y de memoria en los niños infectados, indica que ha ocurrido el proceso de diferenciación ocasionado por la presencia del agente patógeno, el cual al entrar en contacto con los linfocitos hace que cambien su fenotipo de células vírgenes a células efectoras y de memoria [Hermiston *et al*, 2003]. Es importante señalar que no se encontraron diferencias en las células efectoras y de memoria, relacionadas con el tipo de agente infeccioso presente.

En estudios con pacientes que estaban infectados por *Listeria monocytogenes*, se observó que durante el proceso infeccioso hubo un aumento de células de memoria, las cuales tuvieron una vida media aproximada de tres meses post infección [Segal, 2005]. Previamente, un trabajo realizado en pacientes pediátricos con infecciones bacterianas, también mostró que el porcentaje de las células de memoria (CD4+CD45RO+) aumenta [Nájera *et al.*, 2001]. Recientemente los últimos hallazgos en pacientes que presentan infecciones por *Helicobacter pylori* se ha observado que los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria se encuentran aumentadas de forma significativa [Helmin-Bassa *et al.*, 2011].

El incremento de los linfocitos T CD4+ de memoria es relevante tanto para la inmunidad innata como la adaptativa, estas células tienen la facultad de fortalecer la

respuesta inmunológica, al tener la capacidad de activar y reclutar las células de la inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas y NK) y adaptativa (linfocitos T y B), que en conjunto potencializan la eliminación de agentes infecciosos como bacterias y virus [Booth *et al.*, 2010; McKinstry *et al.*, 2010].

Respecto al análisis por tipo de infección, en este estudio se encontró que en los niños con infección respiratoria existe un mayor porcentaje de linfocitos B, mientras que en los niños con infecciones gastrointestinales se observó un mayor porcentaje de linfocitos T. Estos datos parecen indicar que en las infecciones respiratorias están presentes a nivel periférico de manera predominante células de la respuesta de tipo humoral y en las infecciones gastrointestinales células de respuesta de tipo celular, como ya ha sido señalado por otro autor [Janeway *et al.*, 2001] No obstante, en el presente trabajo encontramos un mayor porcentaje de células ayudadoras (CD4+CD62L-) en las infecciones gastrointestinales que en las respiratorias y un mayor porcentaje de células citotóxicas (CD8+CD28-) en las infecciones respiratorias con relación a las gastrointestinales. Se ha documentado que la eliminación de las bacterias intracelulares y gram negativas está dada principalmente por la respuesta Th1 y fenotipos como el de las células CD8+CD28-, mientras que la eliminación de las bacterias extracelulares o gram positivas, se ha relacionado con la respuesta Th2, y fenotipos como el de las células CD4+CD62L-, es decir, que las características de los agentes infecciosos tienen una fuerte influencia en la naturaleza del tipo de respuesta inmunológica que predomina durante su proceso de erradicación [Kidd, 2003]. Por lo que en este estudio, de acuerdo a los fenotipos

encontrados, una primera impresión fue que durante el momento de la toma de muestra ambas respuestas inmunológicas Th1/Th2 estaban presentes.

Sin embargo, cuando se realizó el análisis de las citocinas se encontró que los niños que presentaban infecciones bacterianas mostraron un aumento de IFN- γ , IL-2 e IL-4 a diferencia de los niños que no presentaron algún tipo de infección. Por otra parte, en los pacientes no infectados, hubo un predominio de IL-5, IL-6 y TNF- α , lo cual podría estar relacionado con procesos de estrés. En la IL-10 no hubo diferencia estadística entre los niños infectados y los no infectados.

De las citocinas que se observaron aumentadas en los niños con infección, se puede señalar que el IFN- γ induce mecanismos directos antimicrobianos (activación de macrófagos y opsonización), además de regular la presentación y procesamiento de los antígenos, dirigir la atracción de leucocitos, crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares e induce la respuesta Th1 [Decker *et al.*; 2002; Schroeder *et al.*; 2004]. Por su parte la IL-2 estimula la proliferación de células NK, CD4+ y CD8+, además de aumentar la actividad citolítica de las células; también estimula la producción de IFN- γ y es un factor de crecimiento y diferenciación [Ehlers & Smith, 1991]. La IL-2 es capaz de incrementar la síntesis de IgM, IgG e IgA por células plasmáticas productoras de anticuerpos y posee una importante influencia en el balance Th1/Th2, de tipo autócrino en las células Th1 y parácrino en las células Th2 [Guzmán *et al.*, 2004].

La IL-4 es un factor de proliferación y diferenciación de los linfocitos Th2, estimula la expresión de ciertas moléculas como el VCAM-1 sobre las células endoteliales y promueve la secreción de IgE por las células B [Guzmán *et al.*, 2004]. Los efectos pleiotrópicos revelan el rol importante que tiene esta interleucina durante una respuesta inmune normal [Zamorano *et al.*, 2003].

Sin embargo, al realizar el análisis de las citocinas por tipo de infección se observó que los niños con infección gastrointestinal presentaron mayor concentración de TNF- α . Para la IL-2 y el IFN- γ no se encontraron diferencias estadísticas en los niños por tipo de infección. Lo que si fue un hecho contundente es que en los niños con infección gastrointestinal no se encontraron citocinas de la respuesta Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) lo cual orienta a que en estos niños predominó una respuesta inmunológica de tipo celular (Th1).

Por otro lado, el TNF- α es una citocina que posee propiedades proinflamatorias y efectos pleiotrópicos en diversos tipos celulares. La presencia de lipopolisacáridos es un estímulo para la producción de esta citocina, por lo que se le considera como un importante mediador de la respuesta contra las bacterias gram negativas. Además esta citocina están fuertemente asociadas con la resolución de infecciones por EPEC, ya que activan macrófagos e incrementan su actividad fagocítica [Long *et al.*, 2010]. En un estudio se ha señalado que ante las infecciones gastrointestinales la respuesta inmune es la Th1 [Jankovich *et al.*, 2001].

En cambio, en los niños con infección respiratoria se encontraron concentraciones de citocinas de la respuesta Th1 (IL-2 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) y TNF- α , que aunado al aumento de linfocitos B y de células citotóxicas (CD8+CD28-), se podría permitir concluir que en estos pacientes se encuentran interactuando tanto la respuesta inmune celular como la respuesta inmune humoral (Th1/Th2), lo cual es de importancia señalar ya que hasta la actualidad se había mencionado que la respuesta inmunológica humoral era la encargada de contrarrestar las infecciones en tracto respiratorio.

En dichos pacientes cabe mencionar, que el agente causal principalmente encontrado fue el *Staphylococcus aureus*, por lo que para su eliminación era necesaria la respuesta humoral, ya que los anticuerpos contribuyen en la defensa en tres formas distintas: Primero, uniéndose al patógeno, toxinas y factores de virulencia y neutralizando sus efectos sobre el huésped, se ha observado que la IgA e IgM poseen una fuerte capacidad neutralizante. Segundo, actuando como opsoninas, los anticuerpos (principalmente IgG1 e IgG3) se adhieren a la superficie bacteriana y facilitan la fagocitosis. Tercero, desencadenando el complemento por la unión de IgM, IgG1 e IgG3 a la superficie bacteriana, iniciándose de ésta manera la activación de la vía clásica del complemento (Holfreter *et al.*, 2010). Aunque en este estudio no se determinaron la presencia de anticuerpos, el haber encontrado el patrón de citocinas Th2 y linfocitos B elevados nos orientan a que la respuesta humoral está presente. La presencia de citocinas Th1 y las células citotóxicas (CD8+CD28-) aumentadas nos orienta a la presencia de la respuesta celular.

Un aspecto que llamó la atención en el presente estudio fue la presencia de citocinas en niños no infectados, los que presentaron incremento de TNF- α , IL-5 e IL6. El aumento de TNF- α , en pacientes no infectados, podría ser debido a que esta citocina, juega un papel crítico en la patogénesis de enfermedades crónicas y cabe mencionar que estos sujetos eran pacientes que en su mayoría serían intervenidos quirúrgicamente por procesos de hernias o fimosis. También se ha señalado que el estrés que se presenta en pacientes ante la situación de una cirugía, altera al sistema inmunológico a través del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal mediante la producción de hormonas y neurotransmisores; produciendo un desbalance de interleucinas [Spinedi *et al.*, 2002].

Investigaciones realizadas en humanos y en animales de experimentación han revelado que el estrés puede afectar la respuesta inmune tanto humoral como celular [Ring *et al.*, 2002]. Las condiciones estresoras pueden suprimir profundamente la respuesta inmune de los linfocitos sanguíneos, incluyendo la respuesta a mitógenos de las células T, actividad de las NK, producción de IL-2 e IFN- γ ; sin embargo, condiciones de moderada intensidad pueden incrementar dicha respuesta [Sanchez *et al.*, 2007].

Al revisar modelos humanos de estrés mental para comprender su efecto sobre el sistema neuroendocrino e inmune, se comprobó que el estrés de corto tiempo, induce la producción de citocinas proinflamatorias, las cuales están relacionadas con respuesta Th1. Sin embargo, el estrés mental prolongado (de varios días), causó un

cambio de la respuesta de citocinas Th2 [Matalka, 2003]. En el presente estudio se observó en los pacientes pediátricos no infectados, aumento de citocinas de respuesta Th2 (IL-5 e IL-6) y TNF- α .

Se ha señalado que la predominancia de la respuesta Th1 o Th2 está determinada principalmente por el patrón de citocinas secretadas por las células del sistema inmunológico, es decir, si predomina la respuesta de tipo celular o Th1 las citocinas presentes en mayor proporción son IFN- γ , TNF- β e IL-2; en cambio, en la respuesta de tipo humoral o Th2, las citocinas secretadas en mayor cantidad son IL-4, IL-5 e IL-10 [Szabo *et al.*, 2003]. Es necesario hacer hincapié que estos tipos de respuestas se presentan de forma dinámica durante el periodo de la enfermedad. Se puede concluir, que la respuesta inmunológica se define de manera multifactorial, donde interaccionan varios factores siendo los principales, el tipo de antígeno, la variedad de células y el patrón de citocinas que interactúan para eliminar el agente patógeno y mantener el estado homeostático del individuo [Berger, 2000; Kidd, 2003].

8. CONCLUSIONES

En este trabajo, se muestra que las infecciones respiratorias y gastrointestinales de tipo bacteriano, en pacientes pediátricos mexicanos, provocan una serie de cambios en los porcentajes de las células del sistema inmunológico del huésped, principalmente un aumento en el porcentaje de linfocitos B, células de memoria y células efectoras. El aumento en los linfocitos B, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, de células CD8+CD28- en niños con infección respiratoria están sugiriendo que en este tipo de

padecimiento se presentan ambos tipos de respuestas inmunes Th1/Th2. El aspecto novedoso de los resultados aquí reportados es que en las enfermedades respiratorias se producen ambos tipos de respuesta inmune (celular y humoral), lo cual no había sido previamente reportado en la literatura, ya que solamente se mencionaba que estaba presente la respuesta Th2. Por su parte, el aumento de linfocitos T, la presencia de citocinas tipo 1 y TNF- α , en los niños con infección gastrointestinal indican que la respuesta Th1 fue la predominante en estos pacientes.

Lo cual nos lleva a concluir que las respuestas inmunológicas celular y humoral contribuyen a la eliminación de los agentes causales de las infecciones de una manera dinámica y complementaria, logrando así eficientizar la protección de los organismos conservando el estado de homeostasis.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abehsira-Amar O, Gilbert M, Joily M, Theze J, Jankovic DL. IL-4 play in a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J Immunol*. 1992; 12: 3820-3829.
- Altvater B, Pscherer S, Landmeier S, Niggemeier V, Juergens H, Vormoor J, Rossig C. CD28 co-stimulation via tumour-specific chimaeric receptors induces an incomplete activation response in Epstein-Barr virus-specific effector memory T cells. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 447-57.
- Azuma C, Tanabe T, Konishi M, Kinashi T, Noma T, Matsuda F, Yaoita Y, Takatsu K, Hammarström L, Smith CI, et al. Cloning of cDNA for human T-cell

replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res.* 1986. 25; 14: 9149–9158.

- Bajenoff M, Wurtz O, Guerder S. Repeated antigen exposure is necessary for the differentiation, but not the initial proliferation, of naive CD4(+) T cells. *J Immunol* 2002; 168: 1723–1729.
- Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000; 321:424.
- Boissinot M, Ramsay D, Barthe C, Joly JR. Antigenic variability of the outer membrane antigens of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* 1987; 33: 607-13.
- Bonilla FA, Oettgen HC, Adaptive Immunity, *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: S33-40.
- Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, Salmon M, Falciani F, Yong K, Rustin MH, Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M . Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 2010; 8: 4317-4326.
- Bousso M, Vlijh, S, Pamer EG. Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 1997; 158: 3366–3371.
- Bracke M, Dubois GR, Bolt K, Bruijnzeel PL, Vaerman JP, Lammers JW. Differential effects of the T helper cell type 2-derived cytokines IL-4 and IL-5 on ligand binding to IgG and IgA receptors expressed by human eosinophils *J Immunol.* 1997; 159: 1459-1465.

- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214: 149–60.
- Bureau JF, Bihl F, Brahic M, Le Paslier D. The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. *Genomics* 1995; 28: 109-112.
- Busch DH, Pilip IM, Vijn S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T-cell populations responding to bacterial infection. *Immunol* 1998; 8: 353–362.
- Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP. Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumor necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol* 2003; 81:354–366.
- Cui W, Kaech SM, Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 2010; 236: 151–166.
- Choy E. Interleukin 6 receptor as a target for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003. 62 Suppl 2ii68-9.
- Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* 2002; 109: 1271–1277.
- De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LHDJ, De Deyne CS, Heylen RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg.* 2003; 96:1096-103.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:16-34.
- Ehlers S, Smith KA. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. *J. Exp Med* 1991; 173: 25– 36.

- Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001; 19:163–96.
- Florensa L, Col I MT, Woessner S. Hematopoyesis, morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. *Hematol Clin*. Madrid: Elsevier España; 2006. 1-35.
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O’Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; 22: 556–560.
- Gaddi E, Quiroz H, Balbaryski, Barboni G, Castisano C, Candi M, Raiden S, Giraudi V. L-selectin expression on T lymphocytes and neutrophils in HIV infected children. *Med* 2005; 65: 131-7.
- García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Cubana Med* 2000; 39: 120-40.
- Gentiletti J, Fava RA. Does vascular endothelial growth factor play a role in interleukin-6 receptor antagonist therapy for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1471-4.
- Guzmán CB, Correa BD, Caballese UE, Carlos C. Citocinas y otras moléculas involucradas en la sepsis y enpacientes con sepsis y complicaciones de neutropenia. *Aler, Asma e Immunol Pediatr* 2004; 13: 15-23.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW, CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual Review of Immunology*. 2000; 18: 275–308.

- Helmin-Basa A, Michalkiewicz J, Gackowska L. Pediatric *Helicobacter pylori* Infection and Circulating T-Lymphocyte Activation and Differentiation. *Helicobacter*. 2011; 16: 27-35.
- Hengel RL, Thaker V, Pavlick MV. Cutting Edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen. *J Immunol* 2003; 170: 28-32.
- Hermiston M, Xu Z, Weiss A, CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 15: 107–137.
- Herzer CM. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. *J Am Board Fam Pract* 2001; 14: 131-6.
- Holtfreter S, Kolata J, Broker BM. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus*. The anti-*S. aureus* antibody response International. *J Med Microbiol* 2010; 300: 176–192.
- Hou S, Hyland G, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nat* 1994; 369: 652–654.
- Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunol* 1998; 8: 89–95.
- Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia, A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T-cell polarization. *Eur. J Immunol* 1999; 29: 4092–4101.
- Instituto Nacional de Geografía y estadística (INEGI). 2005. Infant Mortality web site]. Available at: <http://www.inegi.gob.mx> Accessed June 03, 2011.

- Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; 154: 4341-4350.
- Jackson SM, Harp N, Patel D, *et. al.* CD45RO enriches for activated, highly mutated human germinal center B cells. *Blood*. 2007; 110:3917-3925.
- Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology. 5th ed. 2001. New york, USA.
- Jankovic D, Zhugong L, Gause WC. Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001; 22: 250-257.
- Jelley-Gibbs, D. M., Lepak, N. M., Yen, M. & Swain, S. L. Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation. *Immunol* 2000; 165: 5017–5026.
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005, 175: 3463-8.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R, Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 251-262.
- Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2006; 24: 182-93.
- Karlsson H, Larsson P, Wold AE, Rudin A. Pattern of Cytokine Responses to Dendritic Cells Changed when Monocytes Differentiate into Commensal Bacteria Is Profoundly Gram Positive and Gram-Negative Infect. *Immun.* 2004, 72 :2671.

- Khabar K, Young H. Post-transcriptional control of the interferon system. *Biochimie* 2007; 89: 761-769.
- Kidd P, Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003; 3: 223-246.
- Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human Immunoglobulin M Memory B Cells Controlling *Streptococcus pneumoniae* Infections Are Generated in the Spleen. *J Exp Med* 2003; 7: 939-945.
- Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrücker H, Sebzda E, Bachmann MF, Mak TW, Ohashi PS. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunol* 1996; 5: 41–52.
- Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull World Health Organ* 1985; 63:793–811.
- Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopath* 1989; 52: 48-60.
- Langenkamp A, Messi M., Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic-cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000; 1: 311–316.
- Le Minor L, Popoff MY: Request for an opinion. Designation of *Salmonella enteric* sp. nov. nom., rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37: 465 – 468.

- Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, HL DuPont, Nanthakumar NN, Estrada-García TE. Associations between Mucosal Innate and Adaptive Immune Responses and Resolution of Diarrheal Pathogen Infections. *Infect Immunol* 2010; 3: 1221–1228.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AM, Lefrancois L. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Sci* 2001; 291: 2413-2417.
- Matalaka KZ. Neuroendocrine and cytokines-induced responses to minutes, hours and days of mental stress. *Neuroendocrinol Lett* 2003; 24: 283-92.
- Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 Suppl: 54-12.
- McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL, The potential of CD4 T-cell memory. *Immunol* 2010; 130:1–9.
- Mertens J, Fabri M, Zingarelli A, Kubacki T, Meemboor S, Groneck L, Seeger J, Bessler M, Hafke H, Odenthal M, Bieler JG, Kalka C, Schneck JP, Kashkar H, Kalka-Moll WM. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 capsular polysaccharide induces CD8+CD28- regulatory T lymphocytes by TCR crosslinking. *PLoS Pathog* 2009; 5: 1-15.
- Moore KW, de Waal RM, Coffman RL, Garra AO. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765
- Mussaret BZ, López MC, Calva E. Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Lat Microbiol* 2006; 48: 121-125.

- Nájera O, González C, Toledo G, López L, Cortés E, Betancourt M, Ortiz R. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. *Clin Exp Immunol.* 2001; 126: 461-465.
- Nájera O, González C, Cortés E, Toledo G, Ortiz R, Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. *Clin Exp Immuno* 2007; 148: 501-506.
- Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, To Y, Sato A, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Yamamoto K. Antigen-sensitized CD4+CD62Llow memory/effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting. *Resp Res* 2005; 6: 461-466.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev* 1998; 11: 142–201.
- Nicholson JKA, Rao PE, Calvelli T. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. *Cytom* 1994; 18: 140-146.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228-36
- Palacios A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3038-9.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med.* 1998; 128: 2127–2137.

- Pepper M, Linehan J, Pagán A, Zell T, Dileepan T, Cleary PP, Jenkins MK. Different routes of bacterial infection induce long-lived T_H1 memory cells and short-lived T_H17 cells. *Nat Immunol*. 2010; 11: 83-89.
- Perussia, B., Mangoni L., Engers H, Trinchieri. Interferon production by human and murine lymphocytes in response to alloantigens. *J Immunol* 1980; 125: 1589-1595.
- Pinto R, Arredondo S, Bono M, Gaggero A, Diaz P. T Helper 1/T Helper 2 Cytokine Imbalance In Respiratory Syncytial Virus Infection Is Associated With Increased Endogenous Plasma Cortisol. *Pedi* 2006; 117: 878-886.
- Ramos-Galván R, Pediatric somatometry: a semi-longitudinal study on children in Mexico City. *Arch Invest Med*. 1975; 6: 83-396.
- Reeves MW, Evins Gm, Heiba AA, Plikaytis BD Farmer JJ 3rd. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 313–320.
- Rickert M, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N, García KC. The structure of interleukine-2 complexed with its alpha receptor. *Sci* 2005; 308: 1477-1480.
- Ring C, Drayson M, Walkey DG, Darel S, Carroll D. Secretory immunoglobulin A reactions to prolonged mental arithmetic stress: Intersession reliability. *Biol Psychol* 2002; 59:1-13.
- Roman E, Miller E, Harmsen A, Wiley J, Adrian UHV, Huston G, Swain SL. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J Exp Med* 2002; 196: 957-68

- Saïd-Salim B, Mathema B, Braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, Likhoshvay Y, Deleo FR, Kreiswirth BN. Differential distribution and expression of Pantón-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3373-9.
- Salazar-González, RM, Maldonado-Bernal C, Ramírez-Cruz NE, Ríos-Sarabia N, Beltrán-Nava J, Castañón- González J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera- Camargo M, Lopez-Macias C, Isibasi A. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett* 2004; 93: 115-122.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745–763.
- Sánchez SM, González GRM, Cos PY, Macías AC. Stress and immune system. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2007; 23.
- Saavedra-R PG, Vásquez-Duque GM, González-Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *IATREIA* 2011; 24: 157-166.
- Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S. Updating interleukin- 6 classic- and trans-signaling. *Signal Trans* 2006; 6: 240-259.
- Schrader JW. The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 205–230.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leuko Biol* 2004, 75: 163-189.

- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.
- Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 255–281.
- Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis* 2001; 7:323-6.
- Sillau GJA. Neumonías en niños menores de 5 años. *Enf Torax* 2000. 43
- Smeltz R, Chen J, Ehrhard R, Shevach E. Role of IFN- γ in Th1 Differentiation: IFN- γ Regulates IL-18R α Expression by preventing the negative effects of IL-4 and inducing/maintaining IL-12 receptor β expression. *J Immunol* 2002; 168: 6165.
- Spenedi E, Chiasari A, Gaillard RC. Neuroendocrine-immune interactions. *Front Horm Res* 2002; 29: 91-107.
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145: 3796–3806.
- Sweeney NJ, [Klemm P](#), [McCormick BA](#), [Moller-Nielsen E](#), [Utley M](#), [Schembri MA](#), [Laux DC](#), Cohen PC. The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect. Immun* 1996; 64: 3497–3503.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH, Molecular Mechanisms Regulating TH1 Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:713–758.
- Tracey K, Cerami A. Tumor Necrosis Factor: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Ann Rev Med* 1994; 45: 491-503.

- Trotta PP. Cytokines: An Overview. *Am J Repro*. 1991; 3:137 -141.
- Turvey SE, Broide DH, Innate immunity, *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: S24-32.
- Uda H, Mima T, Yamaguchi N, Katada Y, Fukuda M, Fujii N, Nakamura K, Saiki O.. Expansion of a CD28 intermediate subset among CD8 T Cells in Patients with Infectious Mononucleosis. *J Virol* 2002; 76: 6602-6608.
- Unsoeld H, Pircher H, Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *J Virol* 2005; 79: 4510-4513.
- Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx* 2005; 47: 381-7.
- Vershelde JL, Ampe C, Guisez Y, Oefner C, Vandekerckhove J, Tavernier J. Analysis of three human interleukin 5 structures suggest a possible receptor binding mechanism. *FEBS Letters* 1998; 424: 121-126.
- Voss S, Sondel P, Robb R. Characterization of interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2 association of the p64 chain with the IL-2 chain functional intermediate affinity IL-2R. *J Exp Med* 1992; 176: 531-541.
- Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 532-540.

- Wong GG, Witek JS, Temple PA, Wilkens KM, Leary AC, Luxenberg DP, Jones SS, Brown EL, Kay RM, Orr EC. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Sci* 1985; 228:810-815.
- Wong P, Parmer E. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2010; 21: 29-70.
- Woodland LD, Dutton WR, Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells, *Curr Opin Immunol*. 2003; 15:336-342.
- Yokota T, Coffman R L, Hagiwara H, Rennick D M, Takebe Y, Yokota K, Gemmell L, Shrader B, Yang G, Meyerson P, Luh J, Hoy P, Pene J, Briere F, Spits H. Banchereau J, de Vries J, Lee FD. Arai N, Arai K. Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulating factor activities: relationship to interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 7388-7392.
- Zamorano J, Rivas MD, Pérez-G M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Immunol*. 2003; 22: 215-224.

Memory and effector cells in children with bacterial infections of the gastrointestinal and respiratory tracts

Palacios-Martínez Monika ^{1*}, González-Torres María Cristina¹, Rodríguez-Cruz Leonor ¹, Martínez-Pérez Rubén D.³, Cortés-Bejar Consuelo del Carmen⁴, Valencia-Chavarria Fernando⁴, Martínez-Gómez Daniel⁵, Nájera-Medina Oralia ^{2#}

¹Healthy Science Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México city, mexico

^{2#}Healthy Attention Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico
onajera@correo.xoc.uam.mx

³Medicine Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁴Pediatric-Maternal Hospital of the Mexico City Government, Mexico City Mexico.

⁵Agricultural and Animal Production Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco Mexico City, Mexico.,

^{1*} Experimental Biology PhD student, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico.

Received 28-09-2012.

ABSTRACT

Infections in infants and children under five years of age are a public health in México and are one of the major causes of death. **Methods** In this study, lymphocyte immunophenotyping for CD3+ (T-cells), CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD19+, CD3+CD16/56+, CD45RA+, CD45RO+, CD62L- and CD28- were determined in the whole blood of gastrointestinal and respiratory bacterial infected children, using a four-color flow cytometry technique. **Results** Our data showed that the percentages and the absolute numbers of monocytes and granulocytes are increased in infected children, when compared to the control group. Similarly, we observed increases in the percentages of B lymphocytes, CD8+ cells, memory T cells (CD4+CD45RO+ and CD8+CD45RO+) and effector lymphocytes (CD4+CD62L- and CD8+CD28-) in infected children compared with the control group. In contrast, naïve T cells were decreased in the bacterial infected children relative to the control group. Additionally, we used ELISA assays to identify the pathogen agent in gastrointestinal and respiratory infection. Comparing different types of infection, we found that the children with respiratory bacterial infections had higher percentages of B lymphocytes, and cytotoxic

lymphocytes (CD8+CD28-); and the children with gastrointestinal infections had higher percentages of CD3+ lymphocytes and effector cells (CD4+CD62L-). **Conclusions** The increase in B lymphocytes and CD8+CD28- cells in the children with respiratory infections and the increase of T lymphocytes and CD4+CD62L- cells in the children with gastrointestinal bacterial infections indicate that both cellular and humoral responses coincide, and both responses are necessary for eliminating the pathogen.

Keywords: Memory cells, effector cells, bacterial infection, immune response

1. INTRODUCTION

Gastrointestinal and respiratory infections are a public health problem in Mexico because of their high incidence rates and high morbidity and mortality in infants and children under five years of age [1].

Bacterial infections are common, and the resolution of these infections requires the activation of the innate and adaptive immune systems [2]. The adaptive immune system is composed of multiple, functionally distinct cell types, including CD3+CD4+CD8- and CD3+CD4-CD8+ lymphocytes [3]. The cellular subpopulations express the common lymphocyte antigen CD45 on their cell surface. The CD45 antigen is a membrane glycoprotein with two

isoforms, CD45RA and CD45RO. CD45RA is expressed in naïve cells that have not encountered an infectious agent, whereas CD45RO is expressed in memory cells that have previously responded to an infectious agent [4,5].

T lymphocytes also express phenotypic markers that are related to their effector functions, such as the surface markers CD28 and CD62L (L-selectin). The loss of these markers denotes the differentiation process into CD28- and CD62L- cells. CD28- cells exhibit cytotoxic functions and produce cytokines (IFN- γ and TNF α) [6,7]. CD62L- cells are effector memory cells that migrate towards sites of inflammation and are rapidly stimulated by pathogens to execute effector functions, including the production of cytokines, such as IFN- γ , IL-4 and IL-5. CD62L- cells are particularly abundant in the lung, liver and intestine [8-10].

CD62L is expressed on lymphocytes and is involved in regulating cellular trafficking by binding to its ligands on the vascular endothelium [8-10]. CD28 is a costimulatory molecule that binds to its ligand, CD86, on antigen-presenting cells (APCs) and provides the second signal required for T cell activation [11]. The enumeration of lymphocyte subsets provides important information for the diagnosis and monitoring of a variety of conditions affecting the immune system.

In this study, we evaluated the changes in leukocyte, naïve and memory (CD45RA+ and CD45RO+, respectively) and effector (CD4+CD62L- and CD8+CD28-) cell populations due to serious respiratory or gastrointestinal bacterial infection.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients and blood samples

Peripheral blood samples were obtained from pediatric patients at the Xochimilco Maternal-Pediatric Government Hospital of Mexico City. The samples were collected from 30 uninfected children and 30 children with serious bacterial infection that required hospitalization. The exclusion criteria for all children were: viral diseases, tuberculosis, congenital diseases, autoimmune and heart diseases, birth complications, preterm births and recent blood transfusions. The bacterial infections were diagnosed rigorously based on clinical data and routine laboratory tests. In the infected group comprising 12 girls and 18 boys, 9 children presented with gastrointestinal bacterial infections and 21 presented with respiratory bacterial infections. The ages of the children ranged from 6 months to 5 years, and the weights and heights of the children were within

the normal range for their age based on the values established for Mexican children [12]. In the uninfected group of children, there were 9 girls and 21 boys.

The uninfected children had sought medical attention for outpatient surgeries for the treatment of phimosis in the boys and hernias in the girls. The children with bacterial infection of the respiratory tract presented with fever, cough and varying degrees of respiratory failure. The children with bacterial infection of the gastrointestinal tract presented with diarrhea, fever and different degrees of dehydration.

The Medical Committee on Ethics of the General Direction of Medical Services of the GDF, Mexico City, approved this study.

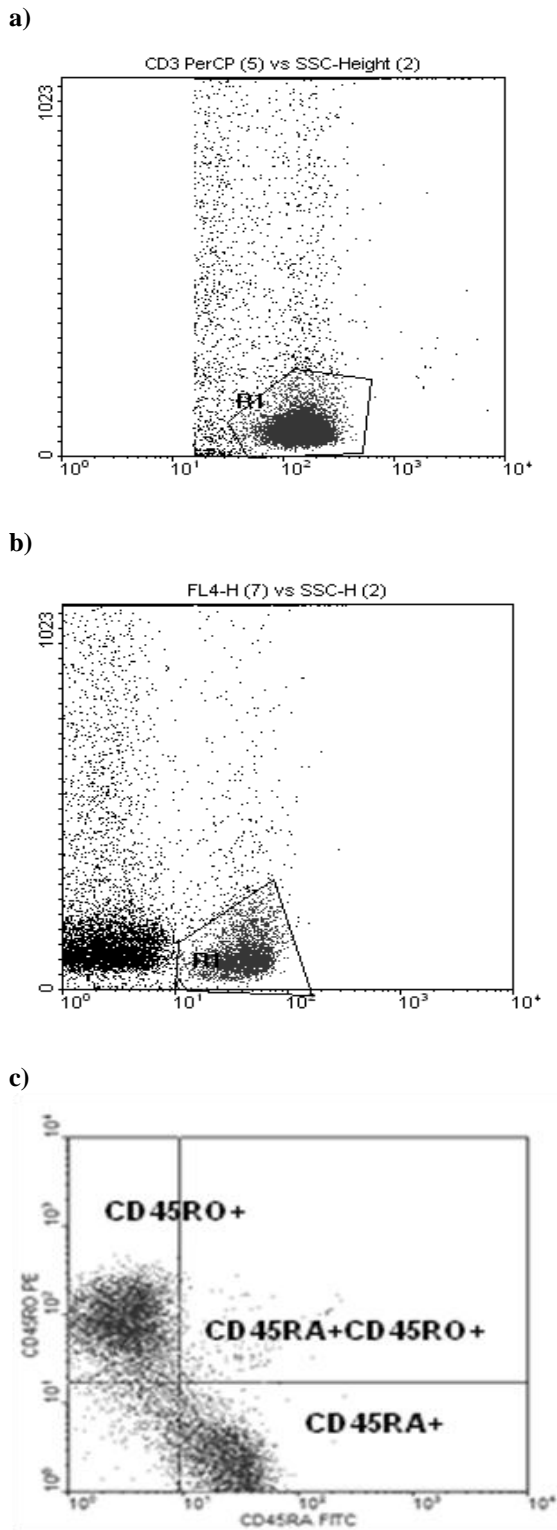
2.2 Phenotypic staining of cells from whole blood

The blood samples were collected in tubes (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J.) with anti-coagulant EDTA and processed the same day. The following combinations of conjugated antibodies were used in this study: FITC-anti-CD45/PE-anti-CD14; FITC-anti-CD3/PE-anti-CD16+anti-CD56/PerCP-anti-CD19; FITC-anti-CD45RA/PE-anti-CD45RO/ PerCP-anti-CD3/APC-anti-CD4; FITC-anti-CD45RA/PerCP-anti-CD45RO/PE-anti-CD3/APC-anti-CD8; FITC-anti-CD4/PE-anti-CD62L/PerCP-anti-CD3; and FITC-anti-CD8/PE-anti-CD28/PerCP-anti-CD3 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Each antibody combination (20 μ l) was incubated with 100 μ l of whole blood for 20 minutes in the dark at room temperature. After incubation, a lysis solution was added to each tube to eliminate the erythrocytes, and the cells were washed with PBS. The cells were fixed using 1% paraformaldehyde.

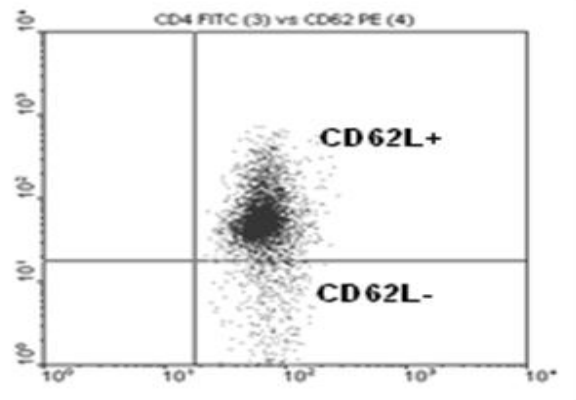
2.3 Flow cytometry analysis

The data were obtained and analyzed using the CellQuest II software and a FACSCalibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) calibrated using CaliBRITE beads. For each sample, 10,000 cells were analyzed. The assessment of the leukocyte proportions and different lymphocyte subpopulations was performed based on forward-scatter and FL-1-, FL-3- and FL-4-scatter fluorescence parameters, depending on the specific subpopulation. The data were analyzed using dual fluorescence dot plots (FL-1 vs. FL-2) (Figure 1). The absolute numbers of cells in the different populations were calculated by multiplying the percentage of the selected subpopulation/100 by the total lymphocyte count of the hematic biometry/100 by the leukocyte number of the hematic biometry.

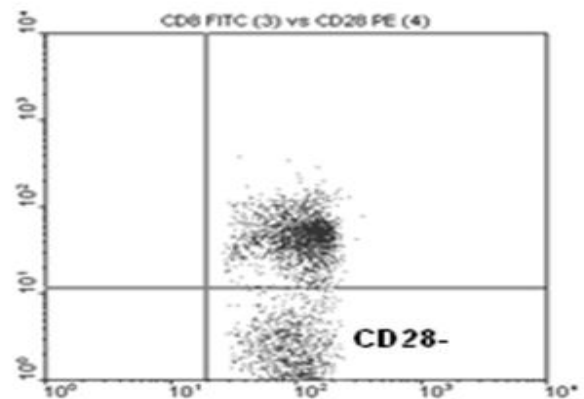
Figure 1. Dotplots



d)



e)



a) and b) The lymphocyte gate set in the FL-1-SSC, FL-3 or FL-4-SSC distribution (R1), the gates were selected to restrict the analysis of CD3+, CD4+ and CD8+ positive cells. c) Dot plot FL-1-FL-2 distribution to define naive (CD45RA+), memory (CD45RO+) and Ddull (CD45RA+CD45RO+) cells. d) and e) Dot plot FL-1-FL-2 distribution, showed CD4+CD62L- and CD8+CD28- effector cells in lower right quadrant.

2.4 Determination of the presence of antibodies against infectious agents by ELISA

Using plasma from the pediatric patients, we determined the presence of antibodies against five infectious agents by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This method is sensitive, extremely versatile and easy to handle in research and diagnostic laboratories. The samples from the patients with gastrointestinal infections were tested to determine the presence of antibodies against antigens in the outer membrane proteins of the *Escherichia coli* strains EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*) and EPEC (enteropathogenic *E. coli*) and *Salmonella typhi*. The samples from the patients with respiratory infections were tested to determine the

presence of antibodies against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

2.5 Statistical analysis

The mean percentages, mean absolute numbers and standard errors were determined for each group and each cell population using the JMP software, and the statistical significance between groups was determined using the Student's t-test. A p value of 0.05 or less was considered significant. To determine the bacterial antigens, a cutoff was established based on a method described by Kurstak [13] in which the mean and standard deviation of both subsets (infected and uninfected children) were used to establish a range of minimum and maximum values for uninfected children. The patients above the maximum value of the range were considered positive for the ELISA test.

3. RESULTS

3.1 Lymphocyte subpopulations

The flow cytometry analysis of the different types of leukocytes demonstrated that the average percentage of total lymphocytes in the peripheral blood was lower in the bacteria-infected children than in the uninfected children (43.1±3.3 vs. 57.5±3.6%, $p<0.006$). In contrast, the percentage of granulocytes (47.1±3.2 vs. 35.4±3.6%, $p<0.02$) and monocytes (9.4±1.3 vs. 4.0±1.4%, $p<0.008$) was significantly higher in the bacteria-infected children compared with the uninfected children. A significant difference was also observed between the uninfected and bacteria-infected children in the absolute numbers of lymphocytes, granulocytes and monocytes in the peripheral blood ($p<0.05$); fewer lymphoid cells but more granulocytes and monocytes were observed in the bacteria-infected patients compared with the uninfected patients (Table 1).

Statistically significant differences were not observed between the study groups in either the percentage or the absolute numbers of T lymphocytes (CD3+) or NK cells (CD16+CD56+). A higher percentage of B lymphocytes (CD19+) was observed in the infected children compared with the uninfected children (24.2±2.2 vs. 16.6±2.7%, $p<0.03$), and a similar trend was observed for the absolute number of B lymphocytes ($p<0.05$) (Table 1).

3.2 Effector cells

In the bacteria-infected children, we observed a higher percentage of CD3+CD62L- effector cells in the total lymphocyte population compared with the uninfected children (35.7±5.5 vs. 24.5±3.6%, $p<0.02$). Higher percentages of helper cells and cytotoxic cells were also observed in the infected children compared with the uninfected children; increases were observed in both the

Table 1. Percentages and absolute numbers of peripheral blood leukocytes, lymphocytes subsets, helper lymphocytes (CD4+CD62L-) and cytotoxic cells (CD8+CD28L-) in uninfected and infected children.

Cell type	Uninfected children	Infected children	p<0.05
Lymphocytes	57.5 ± 3.6	43.1 ± 3.3*	0.006
	2512 ± 2015	1924 ± 460*	0.05
Granulocytes	35.4 ± 3.6	47.1 ± 3.2*	0.02
	1520 ± 111	2022 ± 241*	0.05
Monocytes	4.0 ± 1.4	9.4 ± 1.3*	0.008
	154 ± 16	362 ± 33*	0.05
T Lymphocytes (CD3+)	53.9 ± 2.5	52.3 ± 2.8	
	2674 ± 246	2594 ± 422	
B Lymphocytes (CD19+)	16.6 ± 2.7	24.2 ± 2.2*	0.03
	699 ± 135	1019 ± 129*	0.05
NK (CD16+CD56+)	11.6 ± 1.9	12.1 ± 1.5	
	487 ± 191	606 ± 185	
CD3+	56.6 ± 6.1	54.0 ± 6.7	
	2993 ± 261	2856 ± 558	
CD3+CD62L-	24.5 ± 5	35.7 ± 5.5*	0.02
	2259 ± 154	3292 ± 267*	0.01
CD4+	33.3 ± 3.0	21.4 ± 3.1	
	1416 ± 152	910 ± 254	
CD4+CD62L-	11.3 ± 3.3	23.8 ± 3.5*	0.01
	486 ± 205	1023 ± 294*	0.02
CD3+CD28-	24.0 ± 4.3	28.9 ± 5.2	
	1124 ± 174	1354 ± 327	
CD8+	19.6 ± 2.2	21.0 ± 2.2	
	952 ± 105	1020 ± 164	
CD8+CD28-	20.0 ± 3.1	30.2 ± 2.1*	0.02
	854 ± 94	1284 ± 165*	0.04

Absolute numbers (10⁹/L) are indicated in bold type

Dates are expressed as mean ± standard error.

n: 30 uninfected children and 30 infected children

CD4+CD62L- (23.8±3.5 vs. 11.3±3.3%, $p<0.01$) and CD8+CD28- subsets (30.2±3.1 vs. 20.0±3.1%, $p<0.02$). With respect to the latter two subsets, the differences in the absolute cell numbers between the infected and uninfected children demonstrated similar trends as the cell percentages and were statistically significant ($p<0.02$ and $p<0.04$, respectively) (Table 1).

3.3 Memory cells

The percentage of CD3+ T lymphocytes was lower in the bacteria-infected children than in the uninfected children (49.1±4.5 vs. 70.1±4.5%, $p<0.001$), and a similar trend was observed for the absolute numbers of CD3+ T lymphocytes ($p<0.0001$). Statistically significant differences in the percentage and absolute numbers of naïve T cells (CD3+CD45RA+) were not observed between the bacteria-infected and uninfected groups. In contrast, a higher percentage of memory T cells (CD3+CD45RO+) was observed in the bacteria-infected children compared with the control group (25.4±1.9 vs. 17.1±1.9%, $p<0.0001$), and the absolute

number of cells was higher ($p < 0.01$). There were significantly lower percentages of naïve cells in the infected children compared with the uninfected children (53.6 ± 2.5 vs. $69.9 \pm 2.4\%$ for the CD4+CD45RA+ cells, $p < 0.0001$, and 54 ± 3.1 vs. $73.6 \pm 3.0\%$ for the CD8+CD45RA+ cells, $p < 0.001$). A similar trend was observed for the absolute numbers of these two subpopulations, and the differences between the bacteria-infected and uninfected children were statistically significant ($p < 0.007$ and $p < 0.01$, respectively) (Table 2).

A higher percentage of CD8+ T lymphocytes was observed in the peripheral blood of the bacteria-infected children compared with the uninfected children (31.9 ± 2.1 vs. $20.1 \pm 2.0\%$, $p < 0.003$), and the absolute numbers of CD8+ T lymphocytes demonstrated a similar trend ($p < 0.05$).

Table 2. Percentages and absolute numbers of peripheral blood naïve (CD45RA+), memory (CD45RO+) and Ddull lymphocyte subsets (CD45RA+CD45RO+) in uninfected and infected children.

Cell type	Uninfected children	Infected children	P<0.05
CD3+	70.1 ± 4.5 2995 ± 364	49.1 ± 4.5* 2098 ± 625*	0.001 0.05
CD3+CD45RA+	68.0 ± 2.6 3056 ± 235	63.1 ± 2.6 2791 ± 466	
CD3+CD45RO+	17.1 ± 1.9 685 ± 118	25.4 ± 1.9* 1023 ± 153*	0.0001 0.01
CD3+CD45RA+CD45RO+	10.9 ± 1.2 447 ± 42	10.6 ± 1.2 435 ± 90	
CD4+	43.4 ± 2.8 1921 ± 176	38.5 ± 2.9 1704 ± 318	
CD4+CD45RA+	69.9 ± 1.9 3317 ± 335	53.6 ± 3.2* 2543 ± 560*	0.0001 0.007
CD4+CD45RO+	16.7 ± 1.8 726 ± 81	35.5 ± 1.9* 1543 ± 167*	0.0001 0.002
CD4+CD45RA+CD45RO+	8.2 ± 0.7 321 ± 32	11.0 ± 0.7* 423 ± 62*	0.01 0.01
CD8+	20.1 ± 2.0 982 ± 114	31.9 ± 2.1* 1566 ± 214*	0.006 0.05
CD8+CD45RA+	73.6 ± 3.0 2327 ± 250	54.3 ± 3.1* 1715 ± 441*	0.001 0.01
CD8+CD45RO+	11.3 ± 2.0 495 ± 162	34.0 ± 2.1* 1070 ± 180*	0.0001 0.04
CD8+CD45RA+CD45RO+	10.8 ± 1.4 249 ± 53	11.3 ± 1.5 260 ± 98	

Absolute numbers ($10^6/L$) are indicated in bold type

Dates are expressed as mean ± standard error.

n: 30 uninfected children and 30 infected children

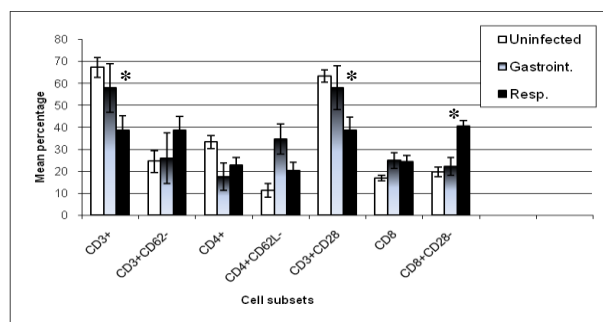
The percentages of CD4+CD45RO+ and CD8+CD45RO+ memory cells were also higher in the infected children compared with the uninfected children (35.5 ± 1.9 vs. $16.7 \pm 1.8\%$ for the CD4+CD45RO+ cells, $p < 0.0001$, and 34.0 ± 2.1 vs. $11.3 \pm 2.0\%$ for the CD8+CD45RO+ cells, $p < 0.0001$). The absolute numbers of these two subsets of cells demonstrated a similar trend in the infected and uninfected children and were significantly different ($p < 0.002$ and $p < 0.05$, respectively). In addition, the percentage of double-positive cells (CD4+CD45RA+CD45RO+) was higher in the bacteria-infected children than in the uninfected children (11.0 ± 0.7 vs. $8 \pm 0.7\%$, $p < 0.01$), and the absolute number of these cells showed a similar trend ($p < 0.01$) (Table 2).

3.4 Analysis of children with gastrointestinal infection vs. children with respiratory infection

Comparisons between the children with bacterial infections of the gastrointestinal tract and of the respiratory tract did not demonstrate statistically significant differences in the proportions of the different leukocyte cell types. We observed a higher mean percentage of B lymphocytes in the children with respiratory infections ($28.3 \pm 2.4\%$) compared with the children with gastrointestinal infections ($14.9 \pm 3.6\%$) ($p < 0.0001$). In contrast, a higher percentage of T lymphocytes was observed in the children with gastrointestinal bacterial infections compared with the children with respiratory bacterial infections (62.8 ± 5.4 vs. $49.8 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$).

Additionally, the children with gastrointestinal bacterial infections showed higher percentages of CD4+CD62L-cells compared with the children with respiratory bacterial infections (34.6 ± 6.8 vs. $20.3 \pm 3.1\%$, $p < 0.002$). In contrast, the children with respiratory bacterial infections exhibited a higher percentage of CD8+CD28-cells compared with the children with gastrointestinal bacterial infections ($33.6 \pm 3\%$ vs. $23 \pm 5.4\%$, $p < 0.04$) (Figure 2). When we compared the subpopulations of naïve and memory T lymphocytes, we found that the children with respiratory bacterial infections demonstrated a higher percentage of double-positive CD4+CD45RA+CD45RO+ lymphocytes than the children with gastrointestinal bacterial infections (12.7 ± 0.9 vs. $8.7 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$). The percentage of CD4+CD45RA+ cells was lower in the children with respiratory bacterial infections than in the children with gastrointestinal infections (48.5 ± 4.2 vs. $59.0 \pm 3.9\%$, $p < 0.001$) (Figure 3).

Figure 2. Percentages of peripheral blood effectors lymphocytes according to infection type.



Dates are expressed as mean \pm standard error.

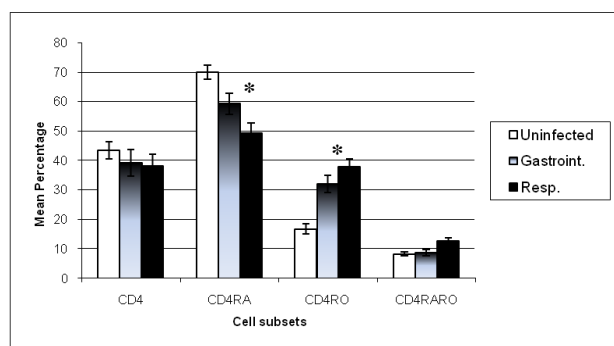
n: 30 uninfected

n: 9 gastrointestinal infection

n: 21 respiratory infection

* Significant difference between gastrointestinal and respiratory infection: CD3+ $p < 0.0008$; CD4+CD62L- $p < 0.0002$; CD8+CD28- $p < 0.04$.

Figure 3. Percentages of peripheral blood naïve (CD45RA+), memory (CD45RO+) and Ddull (CD45RA+CD45RO+) lymphocytes subset according to infection type.



Dates are expressed as mean \pm standard error.

n: 30 uninfected;

n: 9 gastrointestinal infection;

n: 21 respiratory infection.

*Significant difference between gastrointestinal and respiratory infection: CD4+CD45RA+ $p < 0.001$; CD4+CD45RA+RO+ $p < 0.001$.

The ELISA analysis to detect antibodies against specific pathogens demonstrated that 5 of the 9 patients with symptoms of a gastrointestinal infection were positive for *E. coli* antigens. Of these 5 patients, 3 were positive for the *E. coli* enterohemorrhagic antigen (EHEC O157: H7) (0.453 ± 0.139 vs. 0.052 ± 0.300 g/dl, $p < 0.05$), and 2 were positive for the EPEC antigens (0.400 ± 0.111 vs. 0.286 ± 0.05 g/dl, $p < 0.05$) compared with the individuals who did not exhibit symptoms of infection. None of the 9 patients with gastrointestinal infections was positive for antibodies against the *Salmonella Typhi* outer

membrane proteins.

The results of the ELISA demonstrated that of the 21 patients exhibiting symptoms of a respiratory infection, 14 were positive for *Staphylococcus aureus* antigens (0.969 ± 0.228 vs. 0.510 ± 0.05 g/dl, $p < 0.05$) and 4 were positive for *Klebsiella* antigens (0.632 ± 0.249 vs. 0.310 ± 0.05 g/dl, $p < 0.05$) compared with uninfected patients. Only 3 patients were negative for the bacterial antigens analyzed in this study.

We did not observe differences in the proportion of leukocytes, memory cells and effectors cells associated with the type of infectious agent.

4. DISCUSSION

Respiratory and gastrointestinal bacterial infections are public health problems that affect children under five years of age in developing countries. Thus, the goal of our study was to evaluate the changes in the proportions of leukocytes, effector cells and naïve and memory cells caused by the common pathogens responsible for severe respiratory and gastrointestinal bacterial infections in Mexican children.

This study is important because bacterial infections were considered as disease entities. Indeed, a number of papers have evaluated the immunological response against specific bacterial agents, such as *E. coli* and *Coxiella burnetii* [14,15]. In the current study, we detected *E. coli* in a number of patients with gastrointestinal infections, and *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* were found in patients with respiratory infections. The latter pathogens have not been widely studied.

We observed higher percentages and absolute numbers of granulocytes, monocytes and B lymphocytes in the peripheral blood from the bacteria-infected children compared with the uninfected children. This finding suggests that these cells were proliferating at the time of the sample collection. Granulocytes and monocytes participate in the innate immune response, a critical component of the response early in infection, and act as phagocytic cells and mediators of the inflammatory response [2,16]. In contrast, B lymphocytes, which are part of the adaptive immune system, produce antibodies and under certain circumstances, act as APCs [17]. In addition, because they produce large amounts of secretory IgA, B lymphocytes play an important role in intestinal mucosal immunity [18]. In patients infected with encapsulated bacteria, such as *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, it has been

observed that the absolute numbers of peripheral B lymphocytes are increased; the bacterial capsule is a potent immunogenic component that stimulates the synthesis of IgM and other Ig isotypes in B lymphocytes [19].

The percentages and absolute numbers of cells with effector functions (CD3+CD62L-, CD3+CD28-, CD4+CD62L- and CD8+CD28-) were higher in the bacteria-infected children compared with the uninfected children. Effector cells play an important role in controlling infections because they produce many proteins that eliminate pathogens. The functional cytotoxic T lymphocytes (CTLs) produce cytokines and granzymes that kill pathogen-infected cells and control the infection [20]. However, these effector T cells have a short lifespan and die following infection, whereas a smaller subset of cells differentiates into memory cells [21,22].

An increase in CD4+CD62L- cells has been linked to the migration of such cells out of the blood stream and into inflammatory sites, as well as to the subsequent production of cytokines, such as IFN- γ , IL-4 and IL-5. This event is important because a predominance of IFN- γ or IL-4 can direct the immune response towards either a cellular or a humoral response, respectively [23]. Moreover, CD4+ helper T cells can influence effector and memory CD8+ T cell development [20]. Previous studies have shown that the levels of helper (CD4+CD62L-) and cytotoxic (CD8+CD28-) cells are increased in children with gastrointestinal and respiratory bacterial infections compared with uninfected and malnourished children [24]. The increased number of cytotoxic CD8+CD28- cells has been linked to the stimulation of the IL-2 and IL-6 receptors, resulting in the activation and proliferation of the cells and the production of perforin and granzymes, which damage the bacterial membranes and ultimately kill the bacteria by osmotic shock or apoptosis [25,26]. The present study shows the changes in the lymphocyte subpopulations that are associated with the respiratory and gastrointestinal bacterial infections observed most frequently in Mexican children.

Previous studies have demonstrated the changes in the proportion of effector or memory cells in children during bacterial infections; *Mycobacterium tuberculosis* induces a significant increase in the proportion of effector T cells (CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁻CD28⁻CD27⁻) [27], and *Helicobacter pylori* produces an increased percentage of memory/effector CD4+ T cells [28].

In contrast, in the current study, the percentages and absolute numbers of CD45RO+ T cells (CD3+, CD4+ and CD8+) in patients with bacterial infections were higher. The memory T cell population is heterogeneous and consists of multiple subsets exhibiting different characteristics, including effector and proliferative functions. These cells can persist for very long periods of time in the absence of antigen, and their response to reinfections is faster [20]. CD4+ memory T cells recruit and activate both innate (dendritic and NK cells) and adaptive (T and B lymphocytes) immune cells. Together, these cells promote the elimination of infectious organisms, such as bacteria and viruses [29,30]. Memory CD8+ T cells produce cytokines, such as IFN- γ and IL-2. These cytokines contribute to the efficient elimination of infectious pathogens by activating macrophages and NK cells. The cytokines also promote the activation and proliferation of T cells and memory cells, which play an important role in the enhanced response against pathogens that occurs during subsequent infections [20,31].

In the children with respiratory infections, a higher percentage of B lymphocytes and a lower percentage of T lymphocytes were observed in comparison with the children with gastrointestinal bacterial infections. This observation may indicate that respiratory infections trigger a humoral response, whereas gastrointestinal infections trigger a cellular response. Microorganisms exhibit marked structural differences in the cell wall, and these differences are the basis for classifying the bacteria into two main groups, Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria contain a thick peptidoglycan wall, whereas Gram-negative bacteria have an outer membrane composed of lipopolysaccharides and lipoproteins [32].

Additionally, we observed a higher percentage of helper (CD4+CD62L-) cells in the children with gastrointestinal bacterial infection than in the children with respiratory bacterial infection; these cells are associated with a Th2-type humoral response [8,33]. In contrast, we observed a higher percentage of cytotoxic cells (CD8+CD28-) in the patients with respiratory bacterial infections; these cells are closely related to a Th1-type cellular immune response [34]. These data indicate that gastrointestinal and respiratory bacterial infections induce a systemic cellular and humoral (Th1/Th2) immune response. The cellular and humoral immune responses are multifactorial and result from the interactions of a large number of cells and cytokine patterns that collaborate to maintain an organism in a homeostatic state [35,36].

It is known that the pattern of cytokines secreted by immune cells determines whether a Th1 or Th2 phenotype predominates in the response. Specifically, the cytokines that predominate in a cellular or Th1 response are IFN- γ , TNF- α and IL-2. In contrast, the cytokines that predominate in a humoral or Th2 response are IL-4, IL-6 and IL-10 [35,36]. It should be emphasized that these types of responses are not mutually exclusive. In this study, according to the cell types observed, the humoral and cellular immune responses coexist. It will be important for future studies to characterize the patterns of cytokines and other cells and molecules to understand the mechanisms that govern the response to bacterial infections.

We observed that the different pathogens identified in this study were not associated with specific changes in the proportion of leukocytes, effector cells, naïve cells and memory cells, likely because the number of samples evaluated was small.

5. CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrates the importance of utilizing a sensitive four-color immunophenotyping method to assess the changes in lymphocyte subpopulations in bacteria-infected children. Our data demonstrate that in Mexican children, respiratory and gastrointestinal bacterial infections modify the percentages of the host immune cells. A higher percentage of effector and memory cells were found in the infected children. In particular, the respiratory bacterial infections induced an increase in the percentage of B lymphocytes and cytotoxic cells, indicating that the humoral and cellular responses cooperate to eliminate the etiological agent. We observed a similar pattern in the gastrointestinal infections; the data demonstrated an increase in T lymphocytes and CD4+CD62- in the infected children. The results indicate that in the respiratory and gastrointestinal infections, the cellular and humoral responses coincide, and both responses are necessary for eliminating the pathogen and for reducing the severity of the disease.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by CONACyT, Mexico grants 311030 and 47905 (for Monika Palacios Martínez). PhD. E. C. B. thanks by mounting the cytometry technique.

REFERENCES

- [1] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2005) Infant Mortality <http://www.inegi.gob.mx>
- [2] Turvey, S.E. and Broide, D.H. (2010) Innate immunity. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, **125**, S24-32.
- [3] Koretzky, G. (2010) Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Journal of Immunology*, **185**, 2643-2644.
- [4] Dawes, R., Petrova, S., Liu, Z., Wraith, D., Beverley, P.C.L. and Tchilian, E.Z. (2006) Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *Journal of Immunology*, **176**, 3417-3425.
- [5] Jackson, S.M., Harp, N., Patel, D., Zhang, J., Willson, S., Kim, Y.J., Clanton, C. and Capra, J.D. (2007) CD45RO enriches for activated, highly mutated human germinal center B cells. *Blood*, **110**, 3917-3925.
- [6] Mertens, J., Fabri, M., Zingarelli, A., Kubacki, T., Meemboor, S., Groneck, L., Seeger, J., Bessler, M., Hafke, H., Odenthal, M., Bieler, J.G., Kalka, C., Schneck, J.P., Kashkar, H., and Kalka-Moll, W.M. (2009) Streptococcus pneumoniae serotype 1 capsular polysaccharide induces CD8+CD28-regulatory T lymphocytes by TCR crosslinking. *PLoS Pathology*, **5**, 1-15.
- [7] Uda, H., Mima, T., Yamaguchi, N., Katada, Y., Fukuda, M., Fujii, N., Nakamura, K. and Saiki, O. (2002) Expansion of a CD28 intermediate subset among CD8 T Cells in patients with Infectious mononucleosis. *Journal of Virology*, **76**, 6602-6608.
- [8] Pepper, M. and Jenjins, M.K. (2011) Origins of CD4+ effector and central memory T cells. *Nature Immunology*, **12**, 467-471.
- [9] Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review Immunology*, **22**, 745-763.
- [10] Unsoeld, H. and Pircher, H. (2005) Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *Journal of virology*, **79**, 4510-4513.
- [11] Weng, N., Akbar, A.N. and Goronzy, J. (2009) CD28 T cells: their role in the age associated decline of immune function. *Trends in immunology*, **30**, 306-312.
- [12] Ramos-Galván, R. (1975) Pediatric somatometry: a semi-longitudinal study on children in Mexico City. *Archivos de Investigación Médica*, **6**, 83-396.
- [13] Kurstak, E. (1985) Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull World Health Organ*, **63**, 793-811.
- [14] Li, Y., Frey, E. and Mackenzie, A.M.R. (2000) Finlay BB. Human response to Escherichia coli O157:H7 infection: Antibodies to secreted virulence factors. *Infection and Immunology*, **68**, 5090-5095.
- [15] Honstetter, A., Meghari, S., Nune's, J.A., Lepidi, H., Raoult, D., Olive, D. and Mege, J.L. (2006) Role for the CD28 Molecule in the Control of *Coxiella burnetii* Infection.

Infection and Immunology, **74**, 1800-1808.

[16] Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Review Immunology*, **23**, 97-223.

[17] Bonilla, F.A. and Oettgen, H.C. (2010) Adaptive immunity. *Journal of allergy and Clinical Immunology*, **125**, S33-40.

[18] Wershil, B.K. and Furuta, G.T. (2008) Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **121**, S380-3.

[19] Cook, J., Hepler, R., Pancari, G., Kuklin, N., Fan, H., Wang, X.M., Cope, L., Tan, C., Joyce, J., Onishi, J., Montgomery, D., Anderson, A. and McNeely, T. (2009) Staphylococcus aureus capsule type 8 antibodies provide inconsistent efficacy in murine models of staphylococcal infection. *Human Vaccine*, **5**, 254-263.

[20] Cui, W. and Kaech, S.M. (2010) Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunology Review*, **236**, 151-166.

[21] Joshi, N.S. (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunology*, **27**, 281-295.

[22] Rutishauser, R.L. (2009) Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunology*, **31**, 296-308.

[23] Jambo, K.C., Sepako, E., Heyderman, R.S. and Gordon, S.B. (2010) Potential role for mucosally active vaccines against pneumococcal pneumonia. *Trends of Microbiology*, **18**, 81-89.

[24] Nájera, O., González, C., Cortés, E., Toledo, G. and Ortiz, R. (2007) Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. *Clinical Experimental Immunology*, **48**, 501-506.

[25] Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C. and Trapani, J.A. (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunology Review*, **235**, 35-54.

[26] Waterhouse, N.J., Sutton, V.R., Sedelies, K.A., Ciccone, A., Jenkins, M., Turne, S.J., Bird, P.I. and Trapani, J.A. (2006) Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *Journal of Cellular Biology*, **173**, 133-144.

[27] Jacobsen, M., Detjen, A.K., Mueller, H., Gutschmidt, A., Leitner, S., Wahn, U., Magdorf, K. and Kaufmann, S.H.E. (2007) Clonal Expansion of CD8+ Effector T Cells in Childhood Tuberculosis. *Journal of Immunology*, **179**, 1331-

1339.

[28] Helmin-Basa, A., Michalkiewicz, J. and Gackowska, L. (2011) Pediatric Helicobacter pylori infection and circulating T-Lymphocyte activation and differentiation. *Helicobacter*, **16**, 27-35.

[29] McKinstry, K.K., Strutt, T.M. and Swain, S.L. (2010) The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology*, **130**, 1-9.

[30] Booth, N.J., McQuaid, A.J., Soband, T., Kissane, S., Agius, E., Jackson, S.E., Salmon, M., Falciani, F., Yong, K., Rustin, M.H., Akbar, A.N. and Vukmanovic-Stejic, M. (2010) Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *Journal of Immunology*, **8**, 4317-4326.

[31] Wong, P. and Parmer, E. (2019) CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual Review Immunology*, **21**, 29-70.

[32] Cisternas, O. (2007) La tinción de gram como herramienta de uso diario en el diagnóstico precoz de algunos patógenos. *Revista de Hospital del Niño*, **23**, 140-146.

[33] Hill, D.A. and Artis, D. (2010) Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual Review Immunology*, **28**, 623-67.

[34] D'Elios, M.M., Benagiano, M., Bella, Ch.D. and Amedei, A. (2011) T-cell response to bacterial agents. *Journal of Infection in Developing Countries*, **5**, 640-645.

[35] MacDonald, A.S., Straw, A.D., Dalton, N. and Pearce, E.J. (2002) Dendritic cells: a role for CD40. *Journal of Immunology*, **168**, 537-540.

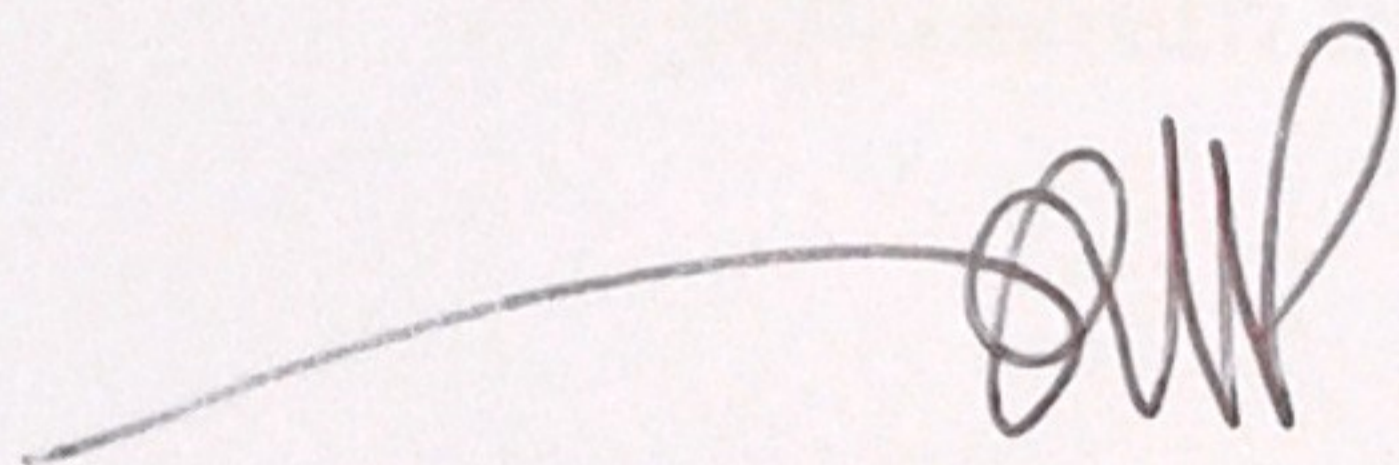
[36] Coffman, R.L. (2010) The Origin of TH2 Responses. *Science*, **328**, 1116-1117.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:
"Evaluación de algunos mecanismos de la respuesta inmunológica en niños con infecciones graves de tipo bacteriano", que presentó:

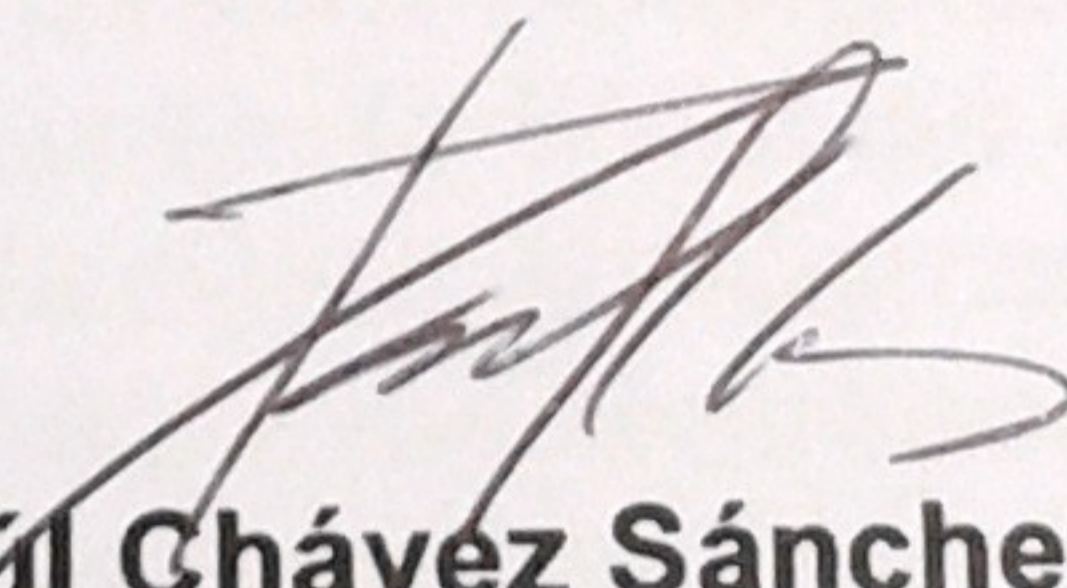
M. en C. Monika Palacios Martínez

El día 07 de diciembre del año 2012

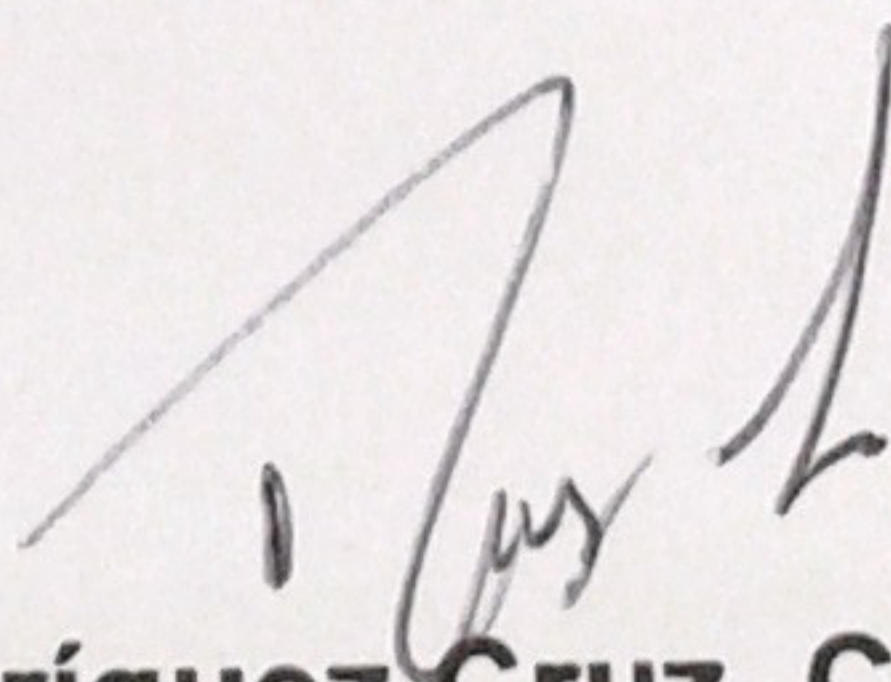
Sinodales



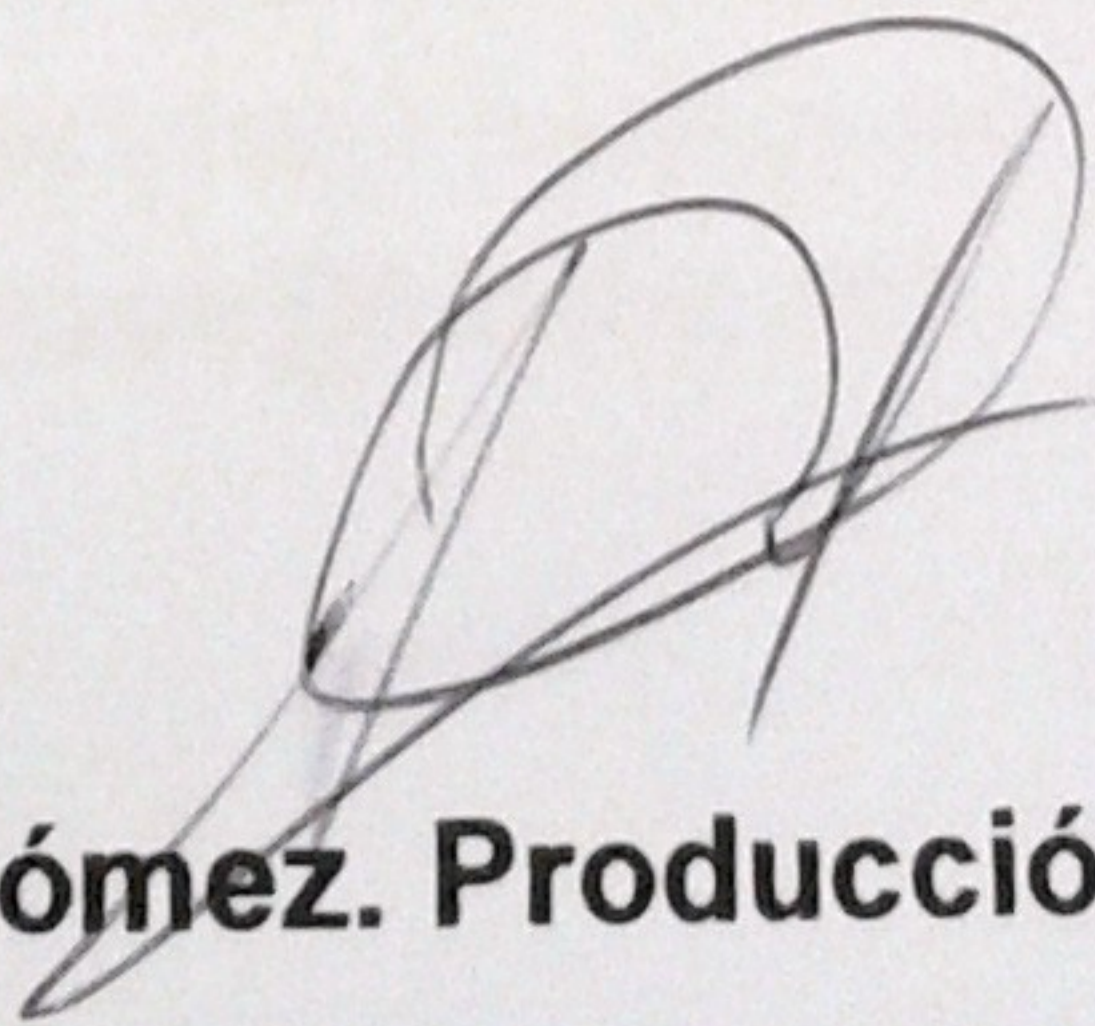
Presidente: Dr. Rubén Darío Martínez Pérez. Facultad de Medicina, UNAM.



Secretario: Dr. Francisco Raúl Chávez Sánchez. Facultad de Medicina UNAM.



Vocal 1: Dra. Leonor Rodríguez Cruz. Ciencias de la Salud. UAM-I.



Vocal 2: Dr. Daniel Martínez Gómez. Producción Agrícola y Animal. UAM-X