

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFEECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA ACTIVACIÓN DE LOS
MACRÓFAGOS PRODUCIDO POR EL LINFOMA MURINO
L5178Y SOBRE EL DESARROLLO DE ABSCESOS
HEPÁTICOS INDUCIDOS POR *Listeria monocytogenes*
Y *Entamoeba histolytica* EN RATONES
INMUNOCOMPETENTES.**

Por

REBECA PALACIOS CORONA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología**

Diciembre, 2005

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	i
1.1. ABSTRACT	ii
2. INTRODUCCIÓN	1
3. HIPÓTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
5. ANTECEDENTES	6
5.1. Función de los macrófagos.	
5.2. Activación de los macrófagos.	
5.3. Los Lipopolisacáridos (LPS).	
5.3.1. Características bioquímicas y funcionales de los LPS.	
5.3.2. El receptor de los LPS.	
5.3.3. Transducción de la señal de los LPS.	
5.3.4. Inhibidores de la activación de los macrófagos.	
5.4 El papel de los Macrófagos en los procesos infecciosos.	
5.4.1 Bloqueo de los inhibidores de la activación de los macrófagos y su aplicación en sistemas <i>in vivo</i> .	
5.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .	

5.4.3 *Entamoeba. Histolytica.*

5.5 El problema.

5.6 Originalidad.

6. MÉTODOS. 31

6.1 Origen de los reactivos.

6.2 Material biológico.

6.2.1 Animales de laboratorio.

6.2.2 Cepa de *Listeria monocytogenes* (Ziad W y col., 2003).

6.2.2.1 Preparación de los medios de cultivo.

6.2.2.1.1 Agar de infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Difco Labs, Detroit, Mich).

6.2.2.1.2 Agar Luria Bertani (LB) (Difco Labs, Detroit, Mich).

6.2.2.1.3 Agar sangre (AS) (Difco Labs, Detroit, Mich).

6.2.3 Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* para el desarrollo del absceso hepático experimental en ratones

BALB/c.

6.2.4 Cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* (Diamond's, 1968).

6.2.4.1 Preparación de los medios de cultivo.

6.2.4.1.1 Medio basal (PEHP) (Said-Fernández y cols., 1988).

6.2.5 Resiembra y cosecha.

6.2.5.1 Resiembra.

6.2.5.2 Obtención de cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS virulentas.

6.2.6 Preparación del inóculo de *Entamoeba histolytica* para el desarrollo del absceso hepático experimental.

6.2.7 Cepa de linfoma L5178Y.

6.2.8 Aislamiento del factor Inhibidor de la activación de macrófagos del Linfoma (FIAML).

6.2.8.1 Método de Ultrafiltración.

6.2.8.2 Cromatografía de exclusión molecular.

6.3 Método para determinar actividad inhibitoria de la activación de los macrófagos absoluta y específica.

6.3.1. Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales.

6.3.1.1 Preparación del medio RPMI.	
6.3.1.2 LPS.	
6.3.2 Activación de los macrófagos peritoneales.	
6.3.2.1 Determinación de Nitritos por la técnica de Griess	
6.3.2.2 Composición y preparación de las soluciones para la Técnica de Griess.	
6.3.2.2.1 Reactivo A.	
6.3.2.2.2 Reactivo B.	
6.3.2.2.3 Curva estándar de NaNO ₂ .	
6.3.3 Determinación de la concentración de los niveles de nitritos en el medio de cultivo de los macrófagos.	
6.4 Cuantificación de proteínas.	
6.5 Cuantificación de Carbohidratos.	
6.6 Desarrollo de los abscesos hepáticos producidos por <i>Entamoeba histolytica</i> .	
6.7 Desarrollo de los abscesos hepáticos producidos por <i>Listeria monocytogenes</i> .	
6.8 Esquema de tratamiento.	
6.9 Análisis histopatológico.	
6.10 Análisis estadístico.	
6.11 Consideraciones Éticas para el uso de animales.	
7. RESULTADOS	50
7.1 Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 de <i>E. histolytica</i> .	
7.2 Relación temporal del crecimiento de <i>L. monocitogenesis</i> .	
7.2.1 Obtención del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> para el desarrollo del absceso hepático experimental en ratones BALB/c.	
7.3 Purificación del FIAML.	
7.3.1 Cromatografía de exclusión molecular G-25.	
7.4 Efecto de la inhibición de la activación <i>in vitro</i> de los macrófagos.	
7.5 Efecto de la inhibición de la activación <i>in vivo</i> de los macrófagos..	
7.5.1 <i>Entamoeba. Histolytica</i> .	

7.5.2 *Listeria monocytogenes*.

8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
10. LITERATURA CITADA	77
11. APÉNDICES	96

2. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la respuesta inmunológica los macrófagos juegan un papel de defensa crítico en los tejidos requeridos. Estas células actúan como mediadoras de innumerables mecanismos de defensa, participan intensamente en la inmunidad natural (Roitt, 2001); además, están adaptadas para desempeñar funciones esenciales, como fagocitosis y citotoxicidad (Roitt, 2001) en la inmunidad específica adquirida, tanto humoral como celular. La activación de estas células es un proceso muy complejo y en varios estadios multifactorial (Abbas A et al., 2004). Dicha activación es estrictamente controlada y regulada, induciendo al macrófago a una serie de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales que al final culminan en el aumento del potencial de la célula para ejercer nuevas funciones complejas, tales como, la presentación de antígenos (Abbas A, 2004), la lisis de células tumorales (Zhonghua K et al., 2005) y la actividad microbicida (Elis AE, 2001). Los agentes más importantes y potentes en la activación de los macrófagos son: i) el Interferón- γ (IFN- γ) y ii) los lipopolisacáridos (LPS) (Rossi A y col., 2005), aunque también otros agentes como el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) , IL (Interleucina)-1, IL-2, IL-4 y Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , pueden inducir algunas vías de la activación de este tipo de células (Celada, 1994; Celada y Nathan, 1994; Hamilton y Adams, 1987).

Cabe mencionar que existen diversos mecanismos de inhibición de la activación de los macrófagos inducidos por los LPS o el IFN- γ , debido al carácter potencialmente

dañino de los mediadores liberados tras la activación de estas células. En general, los agentes que promueven la elevación de los niveles intracelulares de Monofostato Cíclico de Adenosina (AMPC) son potentes inhibidores de la activación de los macrófagos.

En 1989 se informó de la producción de Intermediarios de Nitrógeno Reactivos (INR) como un mecanismo antimicrobiano de macrófagos murinos activados. Los autores mencionan que probablemente los INR actúan en las etapas tempranas de la infección intracelular regulando tanto el reclutamiento de los macrófagos hacia los tejidos infectados como el grado inicial de la replicación microbiana (Nathan CF y Hibbs JB, 1991). Este mecanismo juega un papel antimicrobiano importante, y se dilucido de la convergencia de dos líneas de investigación independientes: del análisis del metabolismo de la nitrosamina en la carcinogénesis y el segundo del estudio de la actividad antitumoral de los macrófagos (Nathan CF y Hibbs JB, 1991 Stuehr DJ y Marleta MA, 1985, Stuehr DJ Y Marleta MA, 1987, Hibbs JB et al, 1987a, Hibbs JB et al, 1987b, Iyengar RD et al, 1987.).

Estudios posteriores corroboraron la evidencia, de que los INR contribuyen a la habilidad de los macrófagos murinos activados de inhibir a una amplia variedad de patógenos como lo son *Listeria monocytogenes*, *Entamoeba histolytica*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (Gregory SH et al, 1993; Chan J, 1992; Boockvar KS et al 1994; Beckerman KP et al, 1993; Chan J et al, 1995; Denis et al, 1992.).

Son pocos los estudios realizados referentes específicamente sobre el bloqueo de inhibidores de la activación de macrófagos y su aplicación en sistemas *in vivo*. Se ha sugerido que la inmunodeficiencia en pacientes con cáncer se debe a la presencia de factores producidos por la célula tumoral que inducen el abatimiento de la respuesta inmune. Entre ellos recientemente nuestro grupo a partir del tumor murino L5178Y, caracterizó un polipéptido que inhibe la activación de macrófagos e inhibe la liberación de Óxido Nítrico (NO) después de un estímulo con LPS (Palacios-Corona R et al., 1999).

Por lo que el presente trabajo se enfoca en investigar si el factor inhibidor de la activación de macrófagos de linfoma (FIAML) permite que *Listeria. monocytogenes* y *Entamoeba. histolytica* produzcan Abscesos Hepáticos Experimentales (AHE) en ratones BALB/c inmunocompetentes infectados experimentalmente con dichos microorganismos.

Considerando por una parte el gran potencial de los macrófagos en contra de los microorganismos patógenos, y por otra parte el efecto inhibitorio de la célula cancerosa sobre la actividad de los macrófagos, sugieren fuertemente que la incidencia de infecciones oportunistas observada en pacientes con cáncer, probablemente se deba al efecto deletéreo de estas células sobre la actividad de los macrófagos.

Los resultados del presente trabajo revelan la capacidad del FIAML para inhibir la activación de macrófagos, causando con ello la formación de abscesos hepáticos (AH) por *E. histolytica* y *L. monocytogenes*, a los cuales el modelo animal utilizado es naturalmente resistente. Se conoce que la síntesis de NO por los macrófagos juega un papel relevante en la prevención de enfermedades, por lo que la inhibición de la síntesis de este compuesto puede ser uno de los principales mecanismos por los cuales el FIAML probablemente ejerce su acción. Por otro lado no existe evidencia suficiente de que el FIAML tenga influencia en otras células del sistema inmune. Los datos derivados de este trabajo respaldan el importante papel de los macrófagos así como de la producción de NO en el impedimento de la formación de AH.

De acuerdo a lo evidenciado en este estudio el FIAML es un glicopéptido capaz de inducir una depresión sistémica de los macrófagos, dicha condición puede ser una herramienta útil en la investigación contribuyendo en diferentes áreas entre las que se pueden mencionar la tolerancia o resistencia a: infecciones, transplantes y crecimiento tumoral.

3. HIPÓTESIS

La administración del Factor Inhibidor de la Activación de Macrófagos de Linfoma en animales inmunocompetentes infectados con *Entamoeba histolytica* o *Listeria monocytogenes* permite el desarrollo de abscesos hepáticos experimentales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

El objetivo de nuestro trabajo es investigar si el Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma permite a *Entamoeba histolytica* y *Listeria monocytogenes* desarrollar abscesos hepáticos experimentales en ratones inmunocompetentes (BALB/c)

4.2 Objetivos Específicos.

4.2.1 Analizar si la administración del Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma en ratones inmunocompetentes BALB/c infectados experimentalmente con *Entamoeba histolytica*, permite el desarrollo de abscesos hepáticos amibianos.

4.2.2 Analizar si la administración del Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma en ratones inmunocompetentes BALB/c infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*, permite el desarrollo de abscesos hepáticos piógenos

5. ANTECEDENTES

Desde que el hombre tiene recuerdo de su historia, las infecciones han representado un castigo para la humanidad. En la actualidad varios científicos de varias regiones del mundo, han expresado su preocupación por la aparición de nuevos microorganismos con capacidad para infectar al hombre, así como, por la reaparición de infecciones que se consideraban controladas (Montroni M et al., 2003). El hombre tiene a su sistema inmune como defensa para detener o eliminar a los microorganismos patógenos que lo atacan; una vía muy involucrada en este propósito es el sistema fagocítico mononuclear donde la activación de macrófagos es uno de los procesos más importantes de defensa (Small PLC. Et al., 1994).

El sistema fagocítico mononuclear contiene un precursor común llamado: células madre pluripotenciales que derivan a un conjunto de células como: 1) monoblastos, 2) promonocitos, 3) monocitos y 4) macrófagos, células que presentan la función principal de fagocitar (Roitt, 2001). Este sistema fagocítico mononuclear en conjunto con las células neutrófilas constituyen los principales mecanismos de defensa del organismo frente agentes extraños como son los microorganismos patógenos, siendo los macrófagos la principal célula de defensa por sus características de respuesta (Abbas et al., 1991).

A los macrófagos se les puede encontrar de dos formas en el organismo: i) en forma inactiva ya que en ausencia de estímulos estas células no se activan y sólo pueden

permanecer en estado de reposo durante un corto periodo de tiempo y siendo eliminadas posteriormente mediante procesos de apoptosis (Celada, 1994), o ii) en forma activa, donde los estímulos inflamatorios (Abbas, et al., 2004) pueden activar a los macrófagos induciéndolos a realizar sus funciones específicas (Abbas, et al., 2004)). A diferencia de otras células del sistema inmunológico, los macrófagos cuando son activados no conlleva un proceso de expansión clonal caracterizado por una elevada tasa proliferativa, tal como sucede con los linfocitos B y T (Abbas et al., 2004).

5.1. Función de los Macrófagos.

Estas células actúan como mediadoras de innumerables mecanismos de defensa, participan intensamente en la inmunidad natural (Roitt, 2001); además, están adaptadas para desempeñar funciones esenciales, como fagocitosis y citotoxicidad (Roitt et al., 2001) en la inmunidad específica adquirida, tanto humoral como celular. Los macrófagos en forma basal, se encuentran en disposición de realizar funciones tales como fagocitosis mediante receptores no opsonizados (Roitt et al., 2001) sin necesidad de ningún tipo de estímulo, se sabe que muchas de estas funciones pueden ser realizadas con mayor eficiencia por los macrófagos cuando un estímulo les permite pasar de un estado no activado a un estado activado celular. Sin embargo, para la realización de algunas funciones de los macrófagos, tales como, fagocitosis dependiente de anticuerpos y complemento, inflamación y reparación de daños en los tejidos y procesamiento y presentación de antígenos, entre otras (Roitt et al., 2001) se requiere que estos hayan sido previamente activados.

Los macrófagos realizan algunas de sus funciones directamente, a través de interacciones célula-célula, o indirectamente, mediante la liberación de sustancias capaces de afectar a otras células (Abbas et al., 2004). Para realizar estas funciones, los macrófagos disponen de un repertorio muy extenso de factores: i) autocrinos, como lo son las citocinas TNF- α , IL-1 β , and IL-6 que son producidas por los macrófagos y a su vez amplifican la activación de los propios macrófagos estimulados por LPS que interactúan con el receptor grupos de diferenciación (CD)-14 (Leturco DJ et al., 1996).

Otro ejemplo es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el cual induce la producción de angiopoyetinas (Ang), principalmente la Ang 2, asociada al proceso de vascularización (Hubbard NE, 2005), ii) paracrinos, la IL-10 producida por los macrófagos e inducida por el GM-CSF y la IL-4, previene la generación de las células dendríticas y favorece el desarrollo de macrófagos con un bajo potencial estimulador de células T pero secretor de altos niveles de IL-8 (Buelens C, 1997). y iii) endocrinos, tales como el dietil-estilbestrol (DES), Bisfenol A (BPA), entre otros, los cuales estimulan las respuestas proliferativas y la producción de citocinas por los macrófagos (Yamashita U. y col., 2005). En general todos los productos de macrófagos se engloban de manera general desde agentes mitogénicos hasta agentes quimiotácticos o inductores de apoptosis (Tabla I) (Nathan, 1987).

Los macrófagos en la inmunidad natural principalmente, fagocitan y eliminan partículas extrañas, tales como: bacterias, por ejemplo; *L. monocytogenes* (Ishiguro T et al., 2001), y *E. coli* (Peiser L. et al., 2000), virus de la influenza A; (Zhang J et al., 2005), parásitos como *Trichinella spiralis* (Gruden M et al., 2005), macromoléculas (Oh YK, 1996), e incluso células propias del organismo que están dañadas o muertas (eritrocitos viejos y células apoptóticas) (Taniuchi S et al., 2005). Al fagocitar los macrófagos a las células muertas o en estado apoptótico evitan que estas puedan verter su contenido potencialmente tóxico al medio extracelular evitando así, el posible desencadenamiento de procesos inflamatorios.

TABLA I. Productos secretados por los macrófagos (Nathan, 1987)

TIPO	PRODUCTO
Hormonas polipeptídicas	IL-1, IL-6, TNF α (Factor de necrosis tumoral α), IFNs α/β (Interferones α/β), FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos), PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF (Factor de crecimiento transformante), GM-CSF, M-CSF, Factor activador de neutrófilos, Hormonas adenocorticotrópicas, Eritropoyetina
Hormonas esteroideas	25-dihidroxitamina
Componentes del sistema del complemento	C1, C2, C3, C3a, C3b, C4, C5, C5a, Factor B, Factor D, etc.
Factores de coagulación	V, VII, IX, X, Protrombina, Factor tisular, Protrombinasa, Activador del plasminógeno, Inhibidor del activador del plasminógeno, Inhibidores de la plasmina
Enzimas hidrolíticos	Hidrolasas, ácidos lisosómicos, Proteasas, Lipasas, Lisozima, Colagenasa, Elastasa, Perforina, Granzima, etc.
Inhibidores de enzimas y citocinas	Inhibidores de proteasas, Lipomodulina, Inhibidor de IL-1
Proteínas de la matriz extracelular	Fibronectina, Decorina, Proteoglicanos tipo condrotin sulfato, etc.
Proteínas ligadoras	Transferrina, Apolipoproteína E, Avidina, etc.
Oligopéptidos con función biológica	Glutación
Intermediarios del metabolismo lipídico	Prostaglandinas, Tromboxano, Leucotrienos, PAF (Factor activador de plaquetas), etc.
Intermediarios del metabolismo de ácidos nucleicos	Timidina, Uracilo, Ácido úrico
Intermediarios reactivos del oxígeno	Superóxido, Peróxido de hidrógeno, Radicales hidroxilo
Intermediarios reactivos del nitrógeno	Óxido nítrico (NO), Nitratos, Nitritos

Por otra parte, los macrófagos pueden provocar la muerte de microorganismos extracelulares y controlar la dispersión de una infección mediante la secreción de enzimas como las lisozimas lectinas y proteasas (Elis AE, 2001.) Además de secretar metabolitos del oxígeno y del nitrógeno e intermediarios del metabolismo lipídico como las prostaglandinas (Blatteis CM et al., 2005).

5.2. Activación de los Macrófagos.

La activación de los macrófagos es un proceso muy complejo y en varios estadios multifuncionales (Abbas A et al., 2004). Esta activación es estrictamente controlada y regulada, induce al macrófago a una serie de modificaciones morfológicas internas, bioquímicas y funcionales que al final culminan en el aumento del potencial de

la célula para ejercer nuevas funciones complejas, tales como, la presentación de antígenos (Abbas A, 2004), la lisis de células tumorales (Zhonghua K y col, 2005) y la actividad microbicida (Elis AE, 2001) (Fig. 1.). Los agentes más importantes y potentes en la activación de los macrófagos son: i) el Interferón- γ (IFN- γ) y ii) los lipopolisacáridos (LPS) (Rossi A y col., 2005), aunque también otros agentes como el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2, IL-4 y TNF- α , pueden inducir algunas vías de la activación de este tipo de células (Celada, 1994; Celada y Nathan, 1994; Hamilton y Adams, 1987).

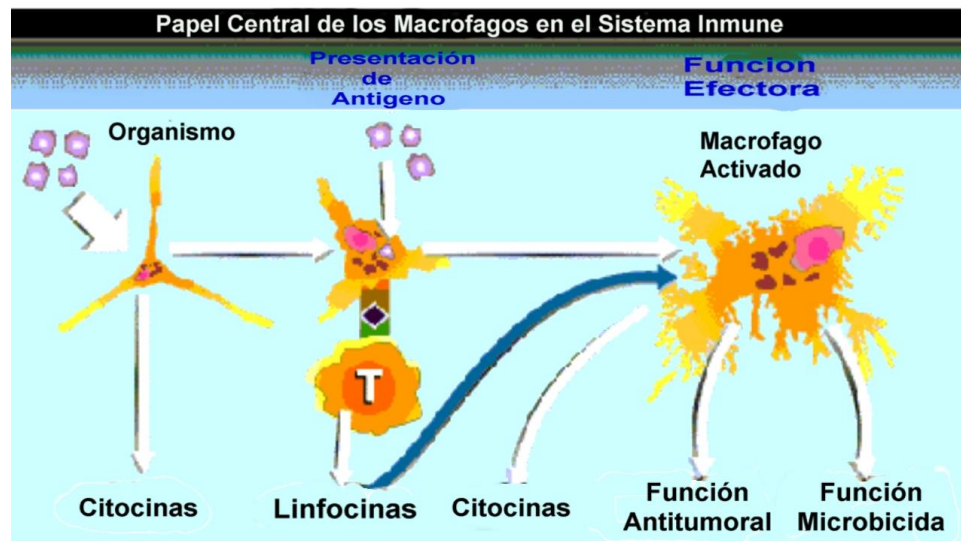


Fig. 1. Papel Central de la Activación de los Macrófagos

5.3. Los Lipopolisacáridos (LPS).

5.3.1. Características Bioquímicas y Funcionales de los LPS.

Los LPS son conocidos como endotoxinas (Sharon L et al., 2004, Madigan, M. T et al., 1997), principalmente forman parte de los componentes estructurales de la membrana plasmática exterior de las bacterias Gram negativas: como *Salmonella*.

typhimurium (Miethke, T et al, 1992) y *Escherichia coli* (Bruckmaier RM y col., 2005, Sharon L y col., 2004). Desde el punto de vista estructural, los LPS se dividen en tres grandes categorías o clases diferentes: lípido A, núcleo oligosacárido y antígeno O (Coughlin, RT et al., 2002) (Fig. 2). El lípido A consta de un oligosacárido al que se unen ácidos grasos y es la parte hidrofóbica que ancla toda la molécula en la membrana externa (Madigan, M. T et al., 1997, Coughlin, RT et al., 2002) (Fig. 3). El Oligosacárido esta formado por N-acetilglucosamina que es un disacárido unido por medio de enlaces ester a B-hidroxi mirística (hydroxymirystic); la B-hidroxi mirística se construye a partir de grupos específicos poco comunes de ácidos grasos, ácidos caprícos y ácidos láuricos (Madigan, M. T et al., 1997). El antígeno O es una cadena polisacáridica de gran peso molecular, generalmente poseen azúcares de 3 o 5 carbonos cuya secuencia se repite cerca de 25 veces consecutivas, es altamente variable de cepa a cepa y le confiere propiedades antigénicas (Kannenberg, E. L et al., 2001, Madigan, M. T et al., 1997). Este antígeno contiene glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, azúcares de ocho carbonos, KDO (en inglés ketodeoxyoctulosonic acid) y heptosas (azúcares de siete carbonos) (Kannenberg, E. L et al., 2001). Debido a este tipo de estructura, los LPS actúan como moléculas anfipáticas y por ello son solubles en soluciones acuosas (Ulevitch y Tobias, 1995).

Mediante la exposición de los macrófagos a los LPS se induce la síntesis de citocinas características, tales como: TNF- α (Martín LA et al., 2005), interleucina IL-1 (IL-1) (Engler KL et al., 2005), IL-6 (Dahle MK et al, 2004), IL-8 (Valatas V y col., 2004), IL-10 (Dahle MK et al, 2004), IL-12 (Chino A et al., 2005), IFN- α/β (Tzung SP et al., 1991), TGF- β (Yamate J et al, 2004), metabolitos del ácido araquidónico principalmente prostaglandinas y leucotrienos (Rossi A et al., 2005) y lípidos bioactivos como el factor activador de plaquetas (Berdeli A et al., 2004), péptidos quimiotácticos como las proteínas de la inflamación de macrófagos (MIP- α) (Muhl H et al., 1997) y especies INR e INO (Kim SJ et al., 2004, Han YJ et al., 2001). Sin embargo, se ha documentado que no todos estos productos ejercen un efecto positivo sobre la respuesta de los macrófagos, se sabe que la IL-10 forma parte de un mecanismo autoinhibidor que controla la producción de otras citocinas como el TNF- α (Sweet y Hume, 1996).

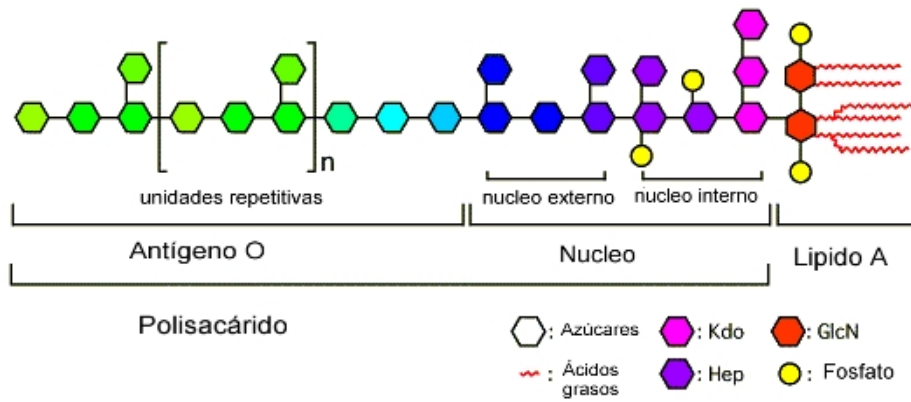


Fig. 2. Estructura Esquemática del LPS

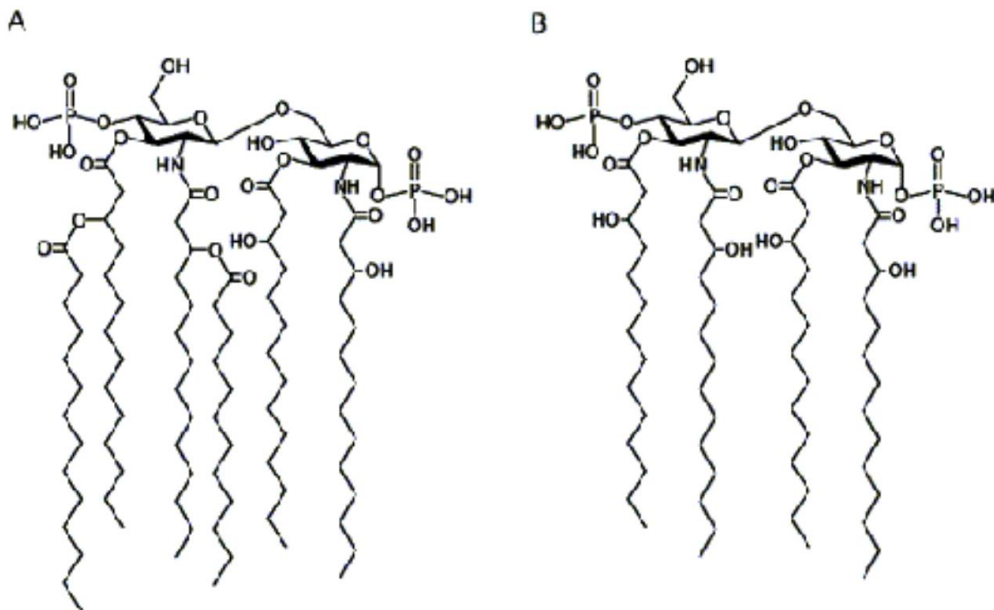


Fig. 3. Estructura Química del Lípido A

5.3.2. El Receptor de los LPS.

El receptor de alta afinidad de los LPS pertenece a una familia denominada *Toll-like receptor* (TLR) (Barton GM et al., 2002). Los TLRs son proteínas transmembranales que pertenecen al tipo de las proteínas integrales (Janssens et al., 2003), en donde una gran porción de la proteína esta insertada en la capa lipídica, estas proteínas integrales están altamente conservadas en los mamíferos y en los insectos (Takeda K et al., 2003).

Estos receptores transmembranales de los LPS presentan una alta homología con los receptores de la IL-1 (Janssens et al., 2003), ya que ambos receptores presentan dominios conservados del tipo TIR (*Toll/IL-1R*) (Janssens et al., 2003). Pero se ha visto que ambos receptores difieren en la región que da al exterior de la célula (extracelular) ya que en esta región, los TLRs de los LPS contienen dominios ricos en leucina (LRR), importantes en la interacción proteína-proteína y los TLRs de los IL-1Rs contienen tres dominios similares a los que presentan las inmunoglobulinas. Con esta información, el sistema inmunológico innato puede responder directamente contra una amenaza de infección. (Akira et al., 2001; Pulendran et al., 2001; Underhill et al., 1999; Underhill y Kocinsky, 2002) (Fig. 4).

Para que se produzca el reconocimiento de los LPS, y la posterior señalización intracelular por parte del receptor TLR4, es necesario que los LPS se encuentren unidos a una proteína sérica denominada LBP (Proteínas de unión al LPS) (Viriyakosol y Kirkland, 1995). El LBP funciona como una opsonina de partículas que contienen LPS, incluyendo las de las bacterias Gram-negativas enteras, facilitando la unión de estas partículas con el CD14 presente en las células mieloides (Ulevitch y Tobias, 1995).

El CD14 es una glicoproteína que puede encontrarse anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) en la membrana de monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Ulevitch y Tobias, 1995) (Fig. 5). El CD14 es asociado físicamente con un complejo proteico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria la MD-2

(Fig. 4). A pesar de que MD-2 haya perdido el dominio transmembranario, se mantiene asociada con la célula a través de la interacción con el dominio extracelular del TLR4. Es posible que el complejo TLR4/MD-2 sea el responsable del reconocimiento directo de diferentes estructuras del LPS, que varían en función de la especie, proporcionando una alta especificidad al receptor (Akashi et al., 2000; Shimazu et al., 1999).

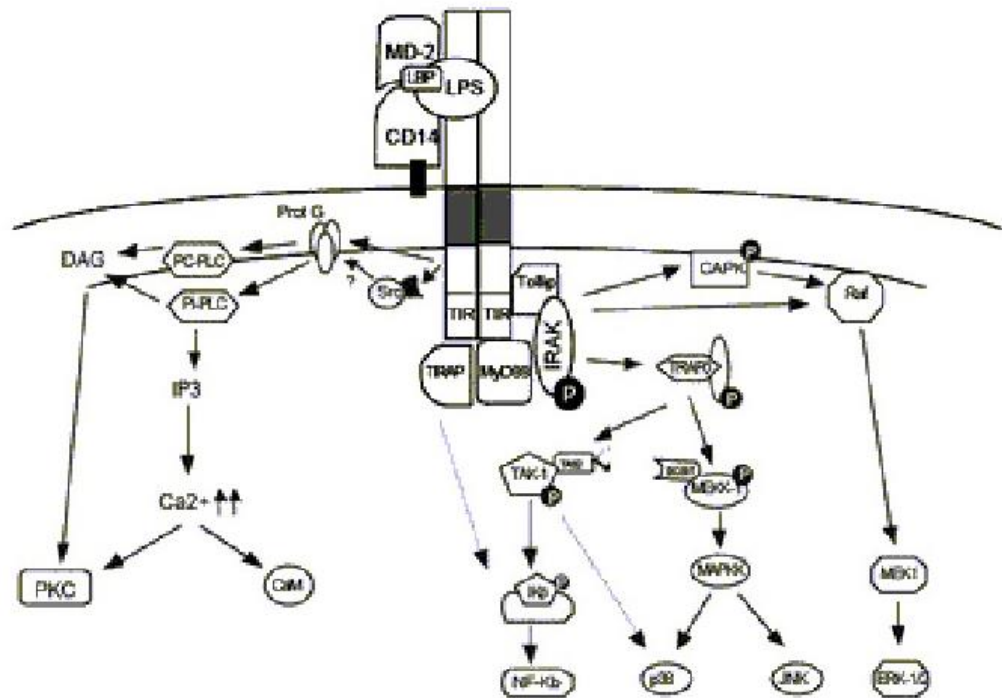


Fig 4 Vías de señalización por el receptor del LPS. CAPK, ceramida-activated protein kinase; ERK, extracellular-regulated kinase; IP3, inositol trifosfato; JNK, c-jun N-terminal quinasa; MEK, MAPK/ERK kinase; P, punto de fosforilación; PC-PLC, fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina; PI-PLC, fosfolipasa específica de fosfatidilinositol; PKC, proteína quinasa C; Src, proteína quinasa de la familia Src; TIR, *Toll/IL-1R* homology element; TAK, *TNF-activated kinase*; TRAF, *TNF-receptor-activated factor*.

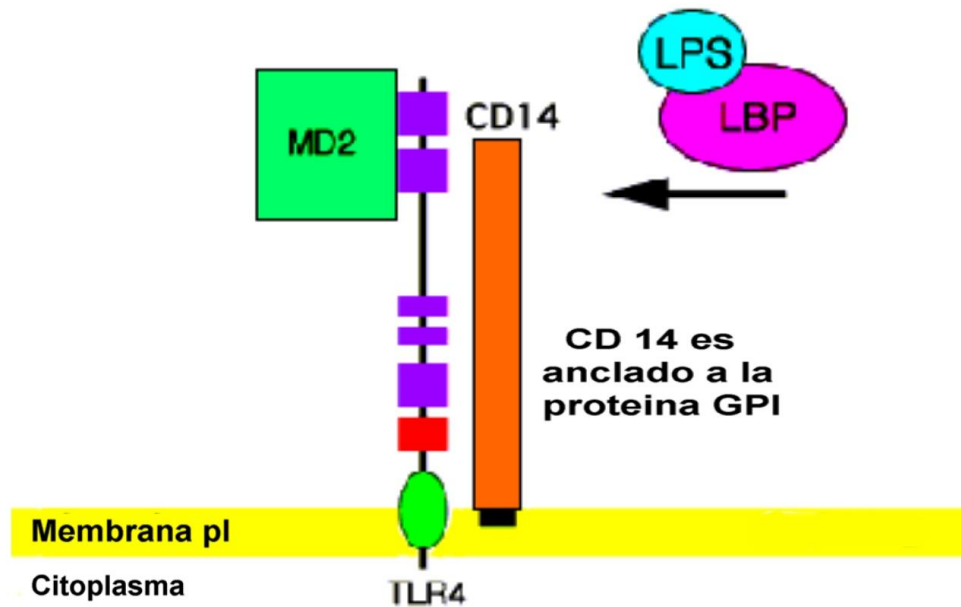


Fig. 5. Glicoproteína CD14 anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI)

5.3.3. Transducción de la Señal de los LPS.

Una vez que los LPS interaccionan con todo el complejo protéico del receptor TLR4, se produce la dimerización del receptor y el consiguiente reclutamiento de una proteína adaptadora la MyD88. Esta proteína MyD88 contiene un dominio TIR que le permite unirse al receptor y un “dominio de muerte” llamado DD (Dominio de Muerte), por sus siglas en inglés), que se unirá con otro dominio DD de la serina/treonina quinasa de la familia IRAK, produciéndose así la fosforilación y activación de esta quinasa (Aderem y Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001).

Recientemente, se ha descrito otra molécula, llamada Tollip, que se encuentra constitutivamente asociada a IRAK y que puede interactuar con los dominios TIR del receptor de TLR4 (Bulut et al., 2001; Burns et al., 2000). Una vez fosforilada, IRAK o el dominio DD puede disociarse del receptor y de Tollip y para posteriormente asociarse con el factor activado por el receptor del TNF-6 (TRAF6). Esta asociación permite que TRAF6 interactúe con una MAPKK Kinasa, TAK-1 a través de una proteína adaptadora denominada TAB2. TAK-1 está implicada en la activación del factor de transcripción NF- κ B mediante la fosforilación del inhibidor κ B (Muzio et al., 1998b; Ninomiya-Tsuji et al., 1999). La activación de TRAF6 puede también transmitir la señal iniciada por el LPS a través de la proteína adaptadora ECSIT (*evolutionarily conserved signaling intermediate*, por sus siglas en inglés) que actuaría de puente entre TRAF6 y la proteína quinasa mitogénica extracelular (MEKK1) (Kopp et al., 1999). El resultado final de este proceso conduce a la activación de dos vías; por un lado la activación de las proteínas activadas mitogénicas (MAP) quinasas, c-Jun N-quinasa terminal (JNK) y p38 y por otro lado hacia la familia Rel de factores de transcripción, entre ellos el factor nuclear (NF)- κ B (Fig. 4 , 5 y 6).

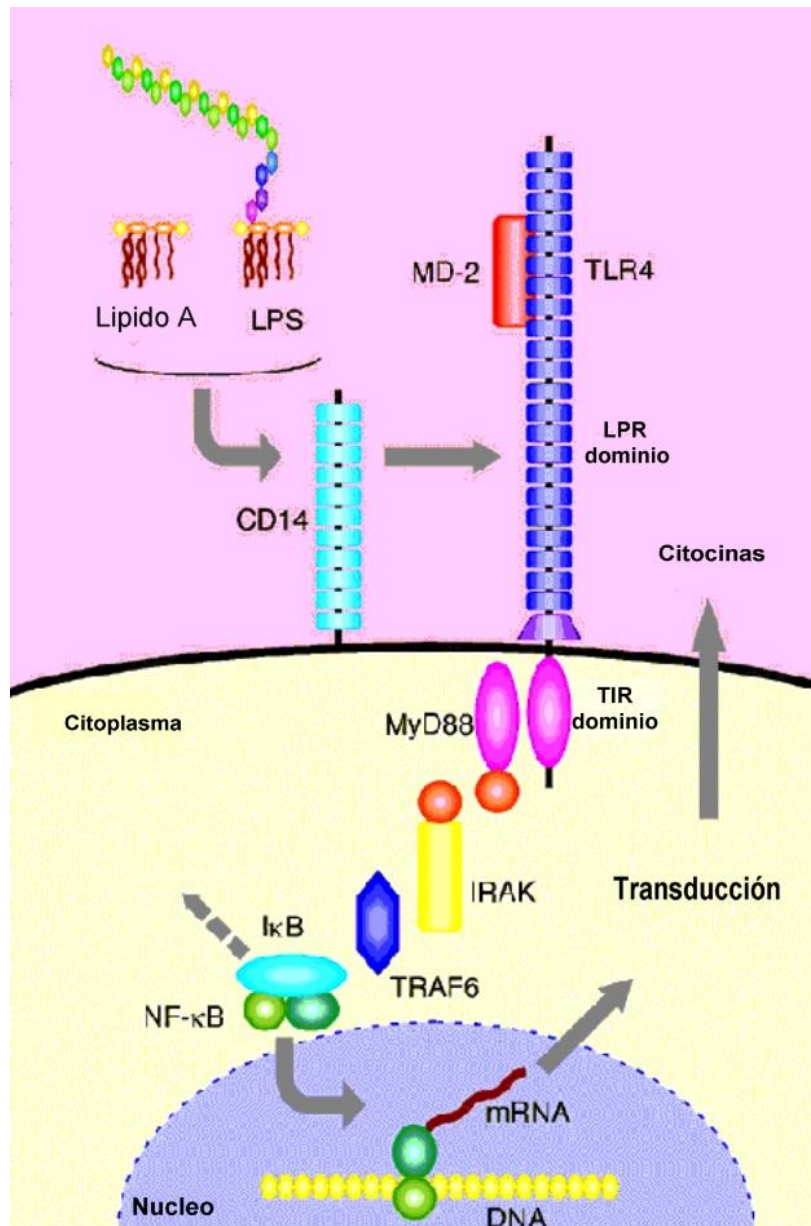


Fig. 6. Reconocimiento y Vías de Señalización del LPS y el Lípido A

Recientemente, se ha demostrado la existencia de otra vía de señalización mediada por los LPS independiente de la proteína adaptadora llamada factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88). Esta vía fue identificada al detectarse tan solo una inhibición parcial de la activación de NF- κ B en células deficientes en MyD88, mientras que en células deficientes en el receptor TLR-4, la inhibición era total (Kawai et al., 1999). La proteína implicada en la activación de esta vía corresponde a la proteína adaptada al dominio contenedor del TIR (TIRAP) o *Maackia amurensis* leukoagglutinin (MAL), con un dominio TIR en el extremo carboxi-terminal parecido al presente en MyD88. Se conoce muy poco sobre la función específica y la vía de señalización de TIRAP/MAL. Se ha descrito que también puede activar a NF- κ B pero independientemente de MyD88, y que puede interactuar con otros miembros de la familia IRAK (Fitzgerald et al., 2001; et al., 2001). Por otro lado, la vía de TIRAP/MAL se ha implicado con la activación de otros sustratos como la proteína serina/treonina quinasa activada por RNA de doble cadena (dsRNA) (PKR) (Horng y col., 2001). PKR ha estado implicada en la activación de p38 MAP quinasa y en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Goh et al., 2000; Uetani et al., 2000) (Fig. 4 y 5).

Aunque el mecanismo exacto de transducción de la señal por el receptor de los LPS no está bien definido, se han descrito numerosas vías de señalización intracelular activadas tras la estimulación de los macrófagos con LPS (Sweet y Hume, 1996). Así, la unión del LPS con su receptor (MD-2/CD14/TLR4) induce la activación transitoria de tirosina-quinazas de la familia Src, como p53/56 lyn, p58/64 hck y p59 c-fgr (English et al., 1993; Stefanova et al., 1993; Weinstein et al., 1992), proteínas G heterotriméricas con un amplio espectro de funciones, miembros de la familia PKC de serina/treonina quinazas, e induce también la formación de sustratos importantes para la activación de PKC y de la proteína quinasa activada por ceramida (CAPK) (Yao et al., 1995).

La activación de proteínas G heterotriméricas, formadas por una subunidad catalítica, α y dos subunidades reguladoras β y γ implica la unión de esta proteína a una molécula de GTP y la consiguiente disociación de la subunidad α de las subunidades

reguladoras. A continuación, la subunidad α es capaz de activar a otros efectores, como la fosfolipasa C (PLC). Los LPS activan sobre todo a la PLC específica de fosfatidilcolina (PC-PLC), pero también se ha detectado activación de la PLC específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (Fig. 4). En ambos casos, parece ser necesaria la activación previa de tirosina-quinasas. Tanto la activación de PC-PLC como la de PI-PLC culminan en la generación de DAG (Diacil Glicerol). Dicho DAG permite la activación de las PKC convencionales y nuevas. La actividad de PI-PLC también genera el segundo mensajero fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (IP3), capaz de estimular la movilización de iones calcio, contribuyendo a la activación de las isoformas de PKC dependientes de calcio (convencionales) y a la Calmodulina. Además, los propios LPS pueden, por si solos, constituir un segundo mensajero. De hecho, el lípido A del LPS puede unirse a la fosfatidilserina de las PKC convencionales, ejerciendo una acción directa sobre estas enzimas (Ellis et al., 1987). La activación de las PKC por parte del LPS permite la producción de TNF- α e IL- α en monocitos humanos (Shapira et al., 1994). En los macrófagos murinos estimulados con LPS, la PKC induce la síntesis de óxido nítrico y la adquisición del estado microbicida (Celada y Schreiber, 1986; Fujihara et al., 1994; Novotney et al., 1991, Paul et al., 1995) y colabora en la reorganización del citoesqueleto (Li y Aderem, 1992; Seykora et al., 1991).

Los macrófagos expresan en la membrana plasmática niveles elevados de un subgrupo de proteínas G heterotriméricas denominadas $G_{\alpha 2}$. Tras la estimulación con LPS, la $G_{\alpha 2}$ es internalizada y asociada a las vesículas y las vacuolas (Sweet y Hume, 1996). La inhibición de $G_{\alpha 2}$ bloquea la producción de IL-1, de derivados del ácido araquidónico y del óxido nítrico inducida por el LPS (Coffee et al., 1990; Daniel-Issakani et al., 1989; Jakway y DeFranco, 1986), mientras que potencia la producción de TNF- α en respuesta a los LPS (Zhang y Morrison, 1993). Por otro lado, la simple inhibición de $G_{\alpha 2}$ es capaz de imitar la citotoxicidad y la inhibición de la proliferación inducida por los LPS (Hume y Denkins, 1989). Estos datos demuestran que una misma proteína G puede estar involucrada en la regulación positiva de algunas respuestas a los LPS y en el control negativo de otras.

En los macrófagos, se ha descrito que el TGF- β inhibe la activación de estas células mediada tanto por IFN- γ como por los LPS. En este sentido, el TGF- β

Otros grupos de inhibidores (de la activación de los macrófagos) lo constituyen las citocinas como la IL-10 que es inducida por los propios macrófagos posteriormente a la expresión de TNF- α inducida en respuesta a los LPS o por el IFN- γ , y por linfocitos T activados, pudiendo actuar como un mecanismo atenuador de la actividad de estas células (O'Farrell et al., 1998). El TGF- β es otra citocina inhibidora de la actividad de los macrófagos, y de otras células del sistema inmunológico, la cual es producida de forma autócrina por los macrófagos. Se han identificado cinco genes distintos en vertebrados y tres de estos (TGF- β 1, β 2 y β 3) son expresados en mamíferos. Así el TGF- β inhibe la proliferación de los linfocitos T y B, antagoniza la producción de citocinas, y previene la inducción de los receptores de IL-1 e IL-2. También suprime la producción de las inmunoglobulinas por los linfocitos B, inhibe la adhesión de los linfocitos T y los neutrófilos a las células endoteliales y suprime la actividad de las células NK (Kehrl et al., 1986; Rook et al., 1986; Wahi et al., 1988).

Existen diversos mecanismos de inhibición de la activación de los macrófagos inducida o inducidos por los LPS o el IFN- γ , debido al carácter potencialmente dañino de los mediadores liberados tras la activación de estas células. En general, los agentes que promueven la elevación de los niveles intracelulares de AMPc son potentes inhibidores de la activación de los macrófagos. Un ejemplo natural de este tipo de inhibición lo constituyen la prostaglandina E2 (PGE2) y la adenosina, los cuales podrían actuar como mecanismos atenuadores de la activación de los monocitos y macrófagos en los procesos inflamatorios (Cheung y Hamilton, 1992; Xaus et al., 1999a; 1999c). Por ejemplo, la adenosina, a parte de inhibir la expresión de las moléculas de clase II inducidas por el IFN- γ , inhibe también otros aspectos de la activación de los macrófagos como son la expresión de la enzima iNOS y de citocinas pro-inflamatorias como la IL- α y el TNF- α (Xaus et al., 1999a).

5.3.4. Inhibidores de la Activación de los Macrófagos.

□inhibe la inducción por el IFN- γ □y la expresión de iNOS, la liberación de TNF- α □o la capacidad de matar a bacterias intracelulares (Bogdan et al., 1992; Vodovotz et al., 1993). El TGF- β □es capaz de inhibir la expresión de iNOS inducida por los LPS o la expresión de citocinas pro-inflamatorias, aunque en estos casos los mecanismos de acción son menos descritos hasta ahora (Imai et al., 2000; Werner et al., 2000).

5.4. El Papel de los Macrófagos en los Procesos Infecciosos.

Además de la función importante de los macrófagos como células presentadoras de antígenos, se ha demostrado que los macrófagos juegan un papel muy importante en el reconocimiento y destrucción de microorganismos patógenos (Roitt et al, 2001b.).

En 1989 se informó de la producción de Intermediarios de Nitrógeno Reactivos como un mecanismo antimicrobiano de macrófagos murinos activados (Nathan CF y Hibbs JB, 1991). Este mecanismo juega un papel antimicrobiano importante, y se dilucido de la convergencia de dos líneas de investigación independientes: del análisis del metabolismo de la nitrosamina en la carcinogénesis y el segundo del estudio de la actividad antitumoral de los macrófagos (Nathan CF y Hibbs JB, 1991 Stuehr DJ y Marleta MA, 1985, Stuehr DJ Y Marleta MA, 1987, Hibbs JB et al, 1987a, Hibbs JB et al, 1987b, Iyengar RD et al, 1987.).

Estudios posteriores corroboraron la evidencia, de que los RNI contribuyen a la habilidad de los macrófagos murinos activados de inhibir a una amplia variedad de patógenos intracelulares como lo son *L. monocytogene* y *M. tuberculosis* y patógenos extracelulares como *E. histolytica*, entre otros (Gregory SH et al, 1993; Chan J, 1992; Boockvar KS et al 1994; Beckerman KP et al, 1993; Chan J et al, 1995; Denis et al, 1992.).

5.4.1 Bloqueo de los Inhibidores de la Activación de los Macrófagos y su Aplicación en Sistemas *in vivo*.

Son pocos los estudios realizados referentes específicamente sobre el bloqueo de inhibidores de la activación de los macrófagos y su aplicación en sistemas *in vivo*. Kobayashi F y col., en el año 2000, realizaron un estudio en ratones C57BL/6, utilizando anticuerpos monoclonales contra IL-10 para estudiar los mecanismos de defensa contra la infección por *Plasmodium yoelii yoelii*. Es conocido que la IL-10 es una citosina involucrada en la inhibición de la función microbicida de los macrófagos, por lo que este grupo de investigadores planteó bloquear la acción inhibitoria de la IL-10, para que los macrófagos recuperasen su función antimicrobiana. Los ratones fueron inyectados con AMs anti-IL10 después de la inoculación con *P. yoelii yoelii*. El tratamiento en los ratones con anticuerpos anti-IL-10 dio como resultado una prolongada sobrevivencia hasta del 60%, mientras que el grupo de ratones control (sin anticuerpos anti- IL-10), el 100% de ellos murieron al día 11.

Después Swierczynski B y col. (2000), realizaron un estudio sobre la producción de anticuerpos en contra de dos citocinas que inhiben la activación microbicida de macrófagos para destruir a *Toxoplasma gondii*, comprobando que la aplicación de dichos anticuerpos conducían a que los macrófagos murinos se recuperan del efecto inhibitorio provocado por la IL-4 y/o IL-10, de tal forma que pudieran actuar inhibiendo la proliferación del microorganismo patógeno. El grupo de Asseman demostró que el uso de anticuerpos anti NK1.1 puede inducir alteraciones de los mecanismos reguladores, tomando como antecedente el papel de las células Natural Killer (NK) como posible principal fuente de producción de IFN-gamma en la infección por esquistosomiasis murina; ellos aplicaron anticuerpos anti NK por 17 semanas después del estímulo con *Schistosoma mansoni* y observaron el aumento del granuloma hepático debido a la falta de producción de IFN-gama producido por las células NK. También, se realizó un estudio similar utilizando anticuerpos anti-IL10 *in vivo*, para analizar su efecto en los mecanismos de defensa del huésped contra infección por *Salmonella* y encontraron que la administración de anticuerpos anti-IL10 aumentó significativamente

la resistencia del huésped en la etapa temprana de la infección, así como también se vio notablemente disminuido el crecimiento del microorganismo patógeno tanto en la cavidad peritoneal como en el hígado de los ratones utilizados.

Por otro lado y particularmente refiriéndonos a los microorganismos en estudio encontramos pocas referencias sobre el papel de anticuerpos anti-citosinas, involucradas en la inhibición de la activación de los macrófagos. Como son los estudios realizados por Haak-Frendscho M y col., 1992 y Wagner y col., 1994. Estos grupos de investigadores analizaron el papel de la IL-4 en la resistencia hacia la infección por *L. monocytogenes*, para lo cual administraron anticuerpos monoclonales anti-IL-4. Ellos observaron que los ratones tratados con 0.01 a 0.4 mg de anticuerpos monoclonales anti-IL-4 antes del estímulo de *L. monocytogenes* disminuyeron significativamente el daño hepático por el microorganismo patógeno. La protección máxima fue alcanzada mediante la inyección de 0.1 mg de anticuerpos monoclonales anti-IL-4 antes del estímulo con *L. monocytogenes*. El tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-IL-4 después del estímulo con la bacteria no tuvo ningún efecto en los mecanismos de resistencia antilisterial. Pfaff y su grupo de investigadores, en el año 2003, evaluaron la capacidad de las IL-12 y IL-18 para modular la respuesta inmune celular específica de antígeno, *in vitro*, en pacientes expuestos a la infección por *Onchocerca volvulus* y *E. histolytica*. Mediante la utilización de anticuerpos anti-IL12 y anti-IL 18, concluyeron que la IL-18 resulto ser altamente capaz de inhibir la producción de IL-10 por macrófagos estimulados con *E. histolytica* (Pfaff AW et al., 2003).

5.4.2 *Listeria monocytogenes*.

L. monocytogenes es un patógeno intracelular que infecta principalmente a los macrófagos y a los hepatocitos (Fig. 7). Esta especie de bacterias son Gram-positivas, facultativas, y no forman esporas. *L. monocytogenes* produce meningoencefalitis en ratas normales. En estos éstos animales, la invasión por bacterias esta asociada al reclutamiento y subsiguiente desaparición de los macrófagos que expresan las enzimas iNOS y la nitrotirosina, lo cual es un indicador de la producción de óxido nítrico (Fehr T

et al., 1997). El tratamiento con un inhibidor selectivo de la iNOS, L-N (6)-(1-iminoethyl)-lysina (L-NIL) incrementó la mortalidad en ratas, lo que sugiere que el NO tiene un efecto protector en la meningoencefalitis listérica en ratas (Remer KA. Et al., 2001).

La listeriolisina-O es un compuesto producido por *L. monocytogenes* que inhibe la fusión de los lisosomas a los fagosomas. La exposición de la listeriolisina-O al NO fue inhibida bajo condiciones nitrosativas. Estos resultados sugieren que el estrés nitrosativo mediado por macrófagos es un importante componente del arsenal inmunológico en el control de las infecciones provocadas por *L. monocytogenes* (Ogawa R et al., 2001).

Además, se ha demostrado que la listeriolisina-O, secretada por la bacteria, contribuye como un potente estímulo inflamatorio para inducir la activación de las células endoteliales durante los procesos infecciosos donde esta involucrada la activación del NF-kB. Este factor nuclear permite la expresión de la iNOS con la producción de NO (Kayal S et al., 1999). Agregado a esto, se ha demostrado que los ratones deficientes en NOS₂ son incapaces de matar a *L. monocytogenes*, así como a las bacterias entéricas (Shiloh MU et al., 1999).

Entre los reguladores negativos de ciertas funciones de los macrófagos durante el curso de la infección por *L. monocytogenes* actúan algunas citocinas, como es la IL-4 (Haak-Frendscho et al., 1992, Emoto M et al., 1995), la IL-10 (Malefyt W et al., 1991, Tripp C et al., 1993, Kelly JP et al., 1996, Fleming SD y Campbell PA 1994) y el TGF-β (Strassmann G et al., 1991),

La listeriosis murina ha sido utilizada como un modelo para estudiar la respuesta mediada por células (principalmente macrófagos) hacia ciertas bacterias. La respuesta de los macrófagos activados fue descubierta por primera vez utilizando el modelo de Salyers (Salyers AA et al., 1994, Mielke MEA et al., 1993).

Los ratones BALB/c son resistentes a la infección por *L. monocytogenes*. La resistencia del ratón involucra una respuesta bifásica: la primera fase consiste de las primeras 48 h después de la infección, durante la cual hay multiplicación de *L. monocytogenes* en el hígado y el bazo de los ratones infectados. En estos ratones no inmunizados los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares son las células efectoras involucradas en el control de la multiplicación. En la segunda fase, el desarrollo de la inmunidad mediada por células inicia en el segundo día, tiempo durante el cual la multiplicación de *L. monocytogenes* prevenida por los macrófagos que poseen una actividad microbicida incrementada que es mediada por la acción de linfocinas liberadas por linfocitos T (Schutheis RJ y Keams RJ 1990, Portnoy DA et al, 1992).

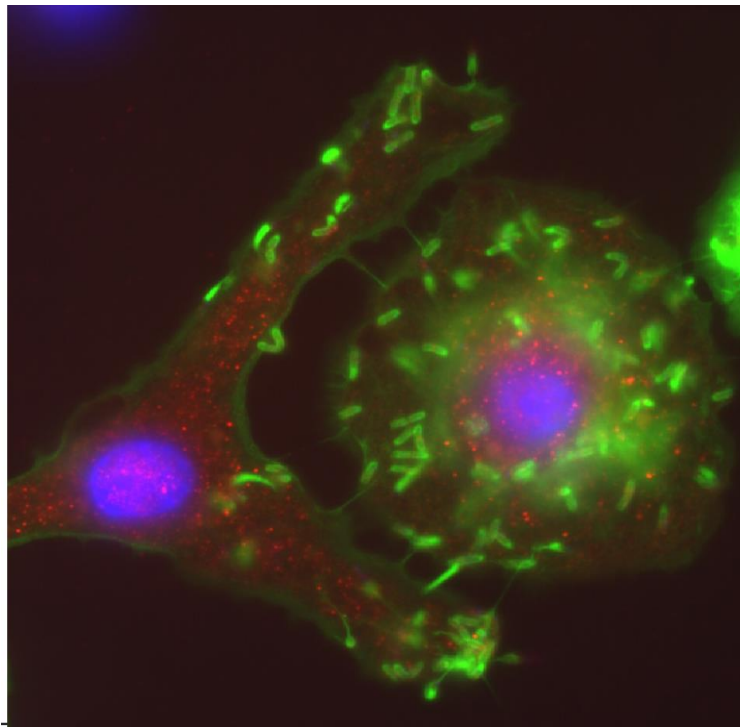


Fig. 7. Micrografía de Fluorescencia que muestra macrófagos infectados con *L. monocytogenes*.

5.4.3 *Entamoeba histolytica* (Fig. 8).

El protozooario *E. histolytica* es el parásito que causa la disentería amibiana y puede producir AH, lo cual esta asociado con la morbilidad y mortalidad en el mundo (WHO/PAHO/UNESCO, 1997). El desarrollo de AHA implica la movilización de los trofozoítos de *E. histolytica* del lumen intestinal hacia la pared intestinal a través de el sistema circulatorio hacia el hígado. El evento inicial es la unión de los trofozoítos amibianos a las células epiteliales intestinales, seguido por la lisis de estas células y por la subsiguiente invasión dentro de la mucosa intestinal (Ravdin JI et al., 1988). Existe evidencia de que la reacción inflamatoria ocurre después de la etapa inicial de la invasión al tejido fino por trofozoítos (Tsusumi V, 1988). Estudios *in vitro* han mostrado que en co-cultivos de células madre y células epiteliales humanas con trofozoítos, se incrementa la secreción y expresión de citocinas proinflamatorias y quimiotactantes (Eckmann L. et al., 1995). Resultados similares fueron obtenidos utilizando un modelo ratón-humano SCID de xenoinjerto intestinal (Seydel KB et al., 1997).

Además de lo mencionado anteriormente, *E. histolytica*, evade la respuesta inmune y el organismo afectado es incapaz de controlar la invasión amibiana. De hecho, se ha observado una disminución de la respuesta inmunológica en pacientes y roedores experimentales susceptibles, tales como hámster y gerbiles que pueden producir AHA (Denis M et al, 1988, Lin JY et al, 1993, Wang W et al., 1992, Wang W et al., 1992b).

Las proteínas amibianas y el medio condicionado regulan negativamente las funciones efectoras y accesorias de los macrófagos en ratones BALB/c mediante la estimulación de la producción de la Prostaglandina E2 (PGE2) (Wang W et al., 1995). Recientemente, Sánchez Ramírez y col., en el año 2004 reportaron que *E. histolytica* puede estimular la producción hepática de PGE2 en hámster que poseen AHA y sugieren que esto contribuye al estudio de procesos inflamatorios y de patogénesis provocados por la formación de abscesos amibianos. Sin embargo, éste posible efecto producido por *E. histolytica* no ha sido observado en ratones inmunocompetentes (ratones con sistema inmune funcional, capaz de desarrollar anticuerpos). De hecho,

estos animales son generalmente resistentes a la infección amibiana en el hígado (Gold D. et al., 1978, Gold D. 1989, Meerovich E et al., 1988, Neal RA et al., 1975). Por otro lado, algunos estudios han provisto evidencias de que los macrófagos juegan un papel importante en la defensa del huésped contra *E. histolytica* invasiva (Ghadirian E et al, 1988a, Ghadirian E et al, 1988b, Martínez-Gigena MP et al., 1992). Esto ha sugerido que su actividad protectora es debida a la producción de NO (Denis M et al., 1992, Lin JY et al., 1992 Lin JY., 1994 et al., Lin JY et al., 1995, Seguin R et al., 1997).

Cuando a los ratones se les administra un inhibidor de los macrófagos semejante a la sílica, se bloquea la resistencia natural contra la infección hepática por *E histolytica* en los ratones (Stern JJ et al., 1984). Estos estudios con modelos experimentales sugieren que la resistencia del huésped en la amibiasis murina es dependiente de los macrófagos. A pesar de todo lo anterior, hasta este momento no hay evidencia directa disponible.

En un pequeño porcentaje de las infecciones, los trofozoítos se hacen invasivos y penetran a la mucosa intestinal causando úlceras y colonizan otros tejidos principalmente el hígado donde forman abscesos (Sehgal D et al., 1996). En las infecciones clínicas y experimentales por *E. histolytica* se ha observado que los mecanismos efectores mediados por los macrófagos son importantes en el control y resistencia a la infección (Denis M et al., 1989, Lin JY et al., 1992, Salata RA et al., 1987, Salata RA et al., 1986, Salata RA et al., 1985, Stern JJ et al., 1984 y Treviño MLC 1990). También se sabe que los procesos de muerte amébrica por macrófagos activados por IFN- γ , los LPS y el TNF, involucran las vías dependientes e independientes de oxígeno, principalmente por el NO, siendo el H₂O₂ y el O₂ moléculas cofactores (Lin JY et al., 1994, Lin JY y Chadee K 1992, Ghadirian E y Denis M. 1992, Denis M et al., 1992, Salimi A y Ghadirian E. 1993 y Ghadirian E y Salimi A. 1993).

Para estudiar los mecanismos involucrados en la relación huésped-parásito que determinan la producción de la enfermedad, se han utilizado diferentes modelos experimentales *in vivo* (Tsusumi et l., 1994, Acevedo A.J. et al., 2000, Shibayama M. et

al., 2000). En la búsqueda de los modelos experimentales se observó que los ratones BALB/c presentan una resistencia innata a la infección amébrica (Rivero-Nava L et al., 1997 y Ghadirian E y Kogshavn PAL. 1984) lo que plantea a éste modelo como un sistema idóneo para analizar algunos aspectos de inmunoresistencia durante la infección de *E. histolytica*.

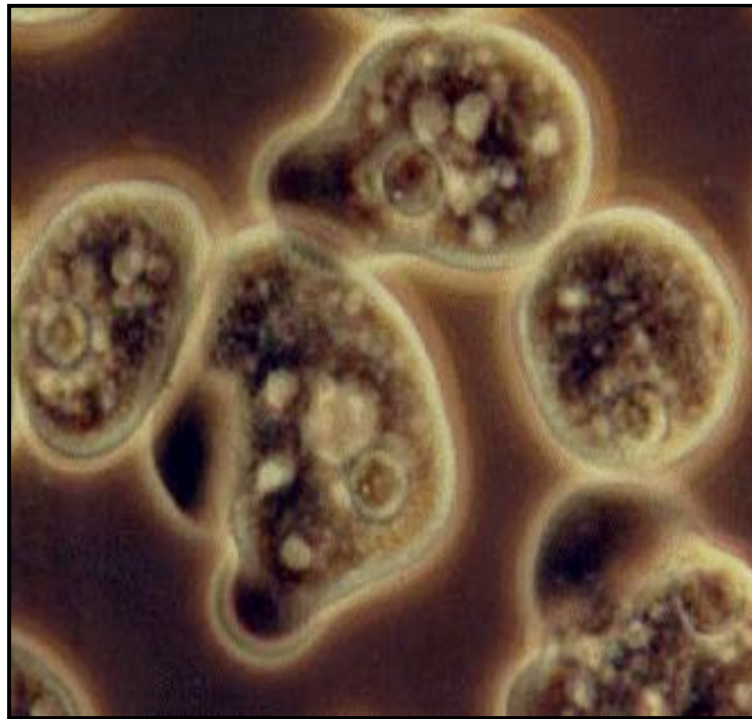


Fig. 8. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

5.5 El Problema.

Nosotros nos propusimos investigar si el FIAML permite que *L. monocytogenes* y *E. histolytica* produzcan AHE en ratones BALB/c infectados experimentalmente con dichos microorganismos.

Se ha sugerido que la inmunodeficiencia en pacientes con cáncer se debe a la presencia de factores producidos por la célula tumoral que inducen el abatimiento de la respuesta inmune. Entre ellos recientemente nuestro grupo a partir del tumor murino L5178Y, caracterizó un polipéptido que inhibe la activación de macrófagos y inhibe la liberación de NO después de un estímulo con LPS. Considerando que uno de los principales mecanismos microbicidas de los macrófagos es a través de la producción de NO, es posible que ésta sea la vía inhibida en los pacientes con cáncer y de ahí su propensión a las infecciones bacterianas. Por otra parte se ha demostrado que los ratones BALB/c son naturalmente resistente a infecciones por *E. histolytica*, *L. monocytogenes*, por lo que resultan buenos modelos experimentales para analizar la respuesta del sistema inmunológico ante estos microorganismo en presencia de un inhibidor de origen tumoral.

5.6 Originalidad.

Se conocen pocos estudios sobre la actividad de factores inhibidores de origen tumoral que afectan al sistema inmune, particularmente a los macrófagos, utilizando sistemas *in vivo*. Miyata H y col., en 1981 identificaron un factor de origen tumoral, de bajo peso molecular en ratones portadores de un fibrosarcoma informando que es liberado a la circulación, lo que hace al animal susceptible a ser infectado experimentalmente con *L. monocytogenes* (Miyata H y col., 1981). También se ha informado que el sobrenadante de cultivos de células tumorales desactiva a los macrófagos inhibiendo la actividad antitoxoplasmal y antileishmania así como el metabolismo oxidativo de los macrófagos, en condiciones *in vitro* (Szuro-Sudol A et al., 1983).

Considerando por una parte el gran potencial de los macrófagos en contra de los microorganismos patógenos, y por otra parte el efecto inhibitorio de la célula cancerosa sobre la actividad de los macrófagos, sugieren fuertemente que la incidencia de infecciones oportunistas observada en pacientes con cáncer probablemente se deba al efecto deletéreo de estas células sobre la actividad de los macrófagos. Para esclarecer

esta incógnita se requiere de la realización de varias etapas en la investigación, entre las que podemos considerar importantes las del índole del presente trabajo en el que pretendemos demostrar si los ratones resistentes a la infección por dos microorganismos patógenos importantes (*L. monocytogenes* y *E. histolytica*) pueden producir AHE.

6. MÉTODOS

6.1 Origen de los Reactivos.

De la Marca Spectrum Quality Products IN. (Gardenia, CA, New Brunswick, NJ, USA) utilizamos los siguientes reactivos: Fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, D-Glucosa, Cloruro de sodio y cloruro de benzalconio.

De la marca Difco Labs, Detroit, Mich utilizamos los siguientes reactivos: Caldo Luria Bertani, peptona de gelatina, infusión de cerebro de ternera, infusión de corazón de res, triptona, extracto de levadura, agar, sustrato nutritivo (extracto de corazón y peptonas), agar-agar, Peptona de caseína, hematoxilina-eosina y glicerol.

De la marca Cheminova de México: pentobarbital sódico

Se adquirió de Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) los siguientes reactivos: L-cisteína, ácido ascórbico, tris-HCl, tripsina, lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8, albúmina bovina, glutaraldehído, glicina, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, reactivo de folin, naftil-etilendiamina, sulfanilamida, nitrito de sodio, HEPES , Trizma base, Tris HCl, carbonato de sodio, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, y medio RPMI-1640 para cultivo *in vitro* de células de mamífero, azul tripano, suero bovino fetal, membrana de corte de peso molecular de 10 kDa, antrona, formol y etanol absoluto.

De la marca Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V. (Cuautitlán Itzcalli, Estado de México): peptona de caseína, jeringas y agujas desechables.

De Spectrum Quality Products Inc. (Gardena, CA, New Brunswick, NJ, USA): Fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, ácido sulfurico,

De Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V., Monterrey, NL: hidróxido de sodio.

De Infra S.A. de C.V. Edo. de México. Nitrógeno, grado NF UN 1066.

De Pharmacia, Uppsala, Swrden: Sephadex G-25

De Nycomed Pharma Centryfugation Media (Oslo, Noruega): NycoPrep 1.068

6.2 Material Biológico.

6.2.1 Animales de Laboratorio.

Se utilizó como modelo experimental *in vivo* ratones BALB/c de sexo femenino, de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. Este mismo modelo *in vivo* fue utilizado para propagar y producir las células tumorales, obtener cantidades suficientes de macrófagos peritoneales e inducir el LmHA y el EhHA. A los ratones BALB/c se les mantuvo en el bioterio a una temperatura de 18 a 20°C, en jaulas de polipropileno con cubierta de rejilla metálica de 43 × 27 × 15 cm (Nalgene, New York, U.S.A.) y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* como lo indica las normas internacionales (Lab. Diet. PMI Nutrition International, Inc., St. Louis Missouri, U.S.A.).

6.2.2 Cepa de *Listeria monocytogenes* (Ziad W et al, 2003).

La cepa BP24 de *L. monocytogenes*, fue utilizada para realizar los ensayos de desarrollo de AHE en ratones BALB/c Esta cepa fue donada en el año de 1997 por el laboratorio del Dr. Rolando Tijerina Menchaca de la escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las bacterias se hicieron crecer, para su mantenimiento y obtención de suficiente biomasa, como lo describe Wadsworth y colaboradores (Wadsworth SL, y col., 1999). Dicha cepa de *L. monocytogenes* fue cultivada en cajas Petri de 100 × 15 mm con medio infusión cerebro corazón (Difco Labs, Detroit, Mich). Una vez que se obtuvo suficiente masa bacteriana de la cepa de referencia, fueron cultivados tres tubos de esta cepa en caldo Luria –Bertani (Difco Labs, Detroit, Mich) (Cepa madre) y a las 24 h de crecimiento se les agregaron 40% de glicerol estéril y se congelaron y almacenaron a –80 °C para su preservación hasta que fuesen requeridos para la realización de los experimentos específicos de esta tesis.

6.2.2.1 Preparación de los Medios de Cultivo.

6.2.2.1.1 Agar de Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Difco Labs, Detroit, Mich). Se mezclaron y disolvieron los componentes: Peptona de gelatina 10,0 g, cloruro de sodio 5,0 g, fosfato disódico dodecahidratado 2,5 g, glucosa 2,0 g, infusión de cerebro de ternera 200 mL, infusión de corazón de res 250 mL. en 950 mL de agua desionizada, se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. El medio fue colocado en un matraz de 1L y cubierto con un tapón de gasa en la boca del matraz, se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C ±1 con el tapón flojo, el cual se ajustó después estando el recipiente todavía caliente. Se separaron alícuotas del medio en placas de petri de 10 × 125 mm y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Dichas cajas con el medio fueron almacenadas a temperatura de 4°C hasta su uso.

6.2.2.1.2 Agar Luria Bertani (LB) (Difco Labs, Detroit, Mich). Se mezclaron y disolvieron los componentes: Triptona 10.0 g, extracto de levadura 5.0 g, Cloruro de

sodio 5.0g, Agar 10.0 g, en 950 mL de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N y el contenido fue aforado a 1,000 mL con agua desionizada. El medio fue distribuido en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 × 100 mm con tapón de rosca. Los tubos con el medio fueron esterilizados en autoclave por 15 min a 121°C ±1 con los tapones flojos, los cuales se apretaron después estando los recipientes todavía calientes. El medio fue almacenado en congelación hasta su uso.

6.2.2.1.3 Agar Sangre (AS) (Difco Labs, Detroit, Mich). Se mezclaron y disolvieron los componentes: sustrato nutritivo (Extracto de corazón y peptonas) 20.0 g, cloruro sódico 5.0 g, agar-agar 15.0 g. en 950 mL de agua desionizada y se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. El medio fue colocado en un matraz de 1L con un tapón de gasa en la boca del mismo y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C ±1. Se dejó enfriar a 45-50°C, y se incorporó al mismo 50 mL de sangre desfibrinada y se prepararon alícuotas del medio en placas de petri de 100 × 15 mm y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se almacenaron las cajas con el medio a temperatura de 4°C hasta su uso.

6.2.3 Preparación del Inóculo de *Listeria monocytogenes* para el Desarrollo del Absceso Hepático Experimental en Ratones BALB/c.

Se preparó un cultivo fresco, a partir del cultivo madre de *L. monocytogenes* (que se encontraba a -20 °C en medio LB), de esta bacteria en cajas Petri de 100 × 15 mm, las cuales contenían agar sangre. Las cajas con *L. monocytogenes* fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Después de este tiempo con una torunda estéril, se recogió la mayor cantidad de colonias bacterianas, las cuales se homogeneizaron en un tubo estéril de 100 × 150 mm que contenía 2 mL de PBS estéril. De esta solución fue tomada una muestra colocándola en otro tubo estéril que contenía 2 mL de PBS, hasta alcanzar el índice de 0.5 según la escala de patrones del nefelómetro de Mc Farland (McF) con una lectura de 80 % de transmitancia (T). A partir del tubo de 0.5 de McF se realizaron seis diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) de la siguiente manera y por triplicado:

- 1) Tubo A: concentración bacteriana de 0.5 de McF (80% T)
- 2) Dilución de 10^{-1} : 0.5 mL del tubo A más 4.5 mL de PBS
- 3) Dilución de 10^{-2} : 0.5 mL de la dilución 10^{-1} más 4.5 mL de PBS
- 4) Dilución de 10^{-3} : 0.5 mL de la dilución 10^{-2} más 4.5 mL de PBS
- 5) Dilución de 10^{-4} : 0.5 mL de la dilución 10^{-3} más 4.5 mL de PBS
- 6) Dilución de 10^{-5} : 0.5 mL de la dilución 10^{-4} más 4.5 mL de PBS

Se realizó un cultivo en placa de agar sangre para cada una de las diluciones, colocando 10 μ l de la suspensión. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de este tiempo se realizó el conteo de las colonias de *L. monocytogenes* así como los ajustes necesarios para alcanzar 5×10^5 bacterias en 50 μ l de PBS estéril obteniendo así la dosis requerida para el inóculo de *L. monocytogenes* para el desarrollo de los AHE en los ratones BALB/c.

6.2.4 Cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* (Diamond's, 1968).

Se utilizó la cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS la cual se ha mantenido en condiciones axénicas en medio PEHPS (Said Fernández y col., 1988) en nuestro laboratorio mediante cultivo continuo por 23 años.

6.2.4.1 Preparación de los Medios de Cultivo.

6.2.4.1.1 Medio Basal (PEHP) (Said-Fernández y cols., 1988). Peptona de caseína 10.0 g, D-Glucosa 6.0 g, L-cisteína 1.0 g, ácido ascórbico 0.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 0.6 g, extracto de hígado y páncreas 250 mL. Se mezclaron y disolvieron los componentes en 950 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. El medio fue distribuido en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 \times 100 mm con tapón de rosca. Se esterilizaron los tubos con el medio en autoclave por 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1$ con los tapones flojos, los que se apretaron después estando los recipientes todavía calientes. Se almacenó el medio a temperatura ambiente hasta su uso.

6.2.5 Resiembra y Cosecha.

6.2.5.1 Resiembra.

Se incubó la cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS a 37 °C en una incubadora de CO₂ (Napco, modelo 5100, Pórtland Oregón, USA) y 5 % de humedad. Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido (Reich, No. de serie WI-54220), para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Se colocó el mejor tubo de cultivo de cada cepa en agua-hielo por 10 min, se determinó la concentración celular con un hematocitómetro y se inocularon 5×10^3 amibas/mL, a cada uno de otros tres tubos (5.5 mL de medio suplementados con 10% de suero bovino) en medio de cultivo PEHPS (Saïd-Fernández y cols., 1988) fresco. Se conservaron los cultivos de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento celular de las amibas. Las resiembras fueron realizadas cada 72 h.

6.2.5.2 Obtención de Cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS Virulentas.

Para asegurar que la cepa HM1:IMSS tuviese una virulencia máxima para producir AH, a la cepa original fue inoculada en hígado de hámster, en tres secciones, verificando la producción de abscesos, para lo cual se uso la siguiente metodología:

Como modelo experimental para producir amibiasis hepática, se utilizaron hámsters sirio dorados (*Mesocricetus auratus*), machos recién destetados, con un peso de 40-60 g, (Kretschmer, R. R. 1996) los cuales fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

Se inocularon 10^6 trofozoítos crecidos en medio PEHPS a cada hámster, en grupos de 5 machos hámster. Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringas desechables de 1 mL y agujas calibre No. 25 en dosis de 6.3 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Se procedió a rasurar el vientre del hámster y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de

benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después fue colocado un campo estéril y con tijeras se realizó una pequeña incisión en abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón, exponiendo el hígado. Se inocularon a cada hámster 10^6 amibas, suspendidas en 0.1 mL de medio PEHP basal, directamente en el lóbulo ventral del hígado, con una aguja calibre No. 25. Después de la inoculación se hizo hemostasia en el punto de la inoculación con gelfoam, esponja estéril hemostática (Upjohn), y la incisión fue suturada mediante súrgete continuo con candado, abarcando los planos peritoneal muscular y cutáneo, con seda estéril calibre 000 (González-Garza, M.T. *et al.* 1996).

La evaluación de las lesiones hepáticas se realizó 7 días después de la inoculación, mediante una laparotomía exploratoria, practicada a cada animal de cada grupo. Para demostrar la presencia de los trofozoítos vivos en los AH; se tomaron piezas del tejido afectado de 0.5 cm las cuales fueron puestas directamente en medio de cultivo PEHPS. Después de 72 h se observaron los tubos bajo el microscopio invertido para confirmar la presencia de los trofozoítos vivos. Estas amibas se reinocularon dos veces más en pases por hígado de hámster, verificando que las amibas produjeran en cada pase AHA grado V (Cruz-Vega y cols., 1997) para que éstas estuvieran expresando su mayor virulencia en el momento de realizar los experimentos de esta tesis.

6.2.6 Preparación del Inóculo de *E. histolytica* para el Desarrollo del Absceso Hepático Experimental.

Se incubó en tubos de 13 × 100 mm con 5 mL de medio basal (PEHP), la cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS a 37 °C en una incubadora (Napco, modelo 5100, Pórtland Oregón, USA). Antes de cada resiembra los cultivos fueron inspeccionados en un microscopio invertido (Reich, No. de serie WI-54220), para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Se colocaron los tubos de cultivo de la cepa en agua-hielo por 10 min, se determinó la concentración celular con un hemacitómetro, y se realizaron los ajustes necesarios para obtener 5×10^5 trofozoitos en 50 µl de PBS

estéril obteniendo así la dosis requerida para el inoculo de amibas para el desarrollo del AHE en los ratones BALB/c.

6.2.7 Cepa de Linfoma L5178Y.

Como modelo experimental para mantener el linfoma L5178Y, se utilizaron ratones hembras BALB/c, con un peso de 25-30 g, los cuales fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, a partir de un animal portador, donado por el CIBO- IMSS.

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal, con una solución de 0.032 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringas desechables de 1 mL y agujas calibre No. 25 en dosis de 3.2 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Se procedió a rasurar el vientre del ratón portador del linfoma y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después se colocó un campo estéril y con tijeras se realizó una pequeña incisión en el abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón. Se tomaron 500 µl de líquido de ascitis del Linfoma con una jeringa desechable de 1 mL y aguja calibre No. 25 y se reinoculo a dos ratones de la siguiente manera: se limpió con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 % el área peritoneal de los animales y con una jeringa de 1 mL y aguja calibre No. 25, se inyectaron 2,000,000 células/200µL del líquido de ascitis del linfoma por medio de una punción en la cavidad peritoneal de cada animal.

Posteriormente al pasar 12 días se sacrificó a uno de los dos ratones y el otro fue conservado hasta los 15 días más como reserva del linfoma. Con el animal sacrificado se procedió a utilizar la metodología descrita aquí. El inoculo se realizó cada 12 días (Hay R y col., 1992).

6.2.8 Aislamiento del Factor Inhibidor de la Activación de Macrófagos del Linfoma (FIAML).

Se siguió la metodología previamente descrita (Palacios-Corona R et al., 1999) Se anestesiaron 30 ratones BALB/c portadores de linfoma L5178Y por vía intraperitoneal, con una solución de 0.032 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 mL y aguja calibre No. 25 en dosis de 3.2 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Se procedió a rasurar el vientre de cada uno de los 30 ratones y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después se colocó un campo estéril y con tijeras se realizó una pequeña incisión en el abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón. Se sacrificó a los animales y posteriormente tomó todo el líquido de ascitis del linfoma de cada animal con una jeringa desechable de 10 mL y aguja calibre No. 25. Se colocó el volumen total de líquido de ascitis en tubos de 50 mL (Corning, NY, USA). El volumen de líquido de ascitis de cada uno de los ratones fue variable, entre 4 y 12 mL por cada uno. Como un primer paso de purificación a los tubos que contenían el líquido de ascitis fueron centrifugados a 600 xg durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células del linfoma.

6.2.8.1 Método de Ultrafiltración.

Como un segundo paso de purificación, se fraccionaron las proteínas contenidas en el sobrenadante del líquido de ascitis con un sistema de amicon (Amicon, Pharmacia Chem fino, Uppsala, Suecia), donde se utilizó una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa (Sigma Co., Santo Louis, Missouri, USA.). Utilizando N₂ con una presión de 38 psi. Se colectaron las fracciones por debajo de 10 kDa y como un segundo paso de purificación se separaron las proteínas contenidas en la fracción proveniente del sistema de amicon (con un peso molecular debajo de 10 kDa), utilizando una columna de borosilicato de 30 × 2 cm, donde se colocaron 9g/150 mL de Sephadex G-25/PBS (Pharmacia, Uppsala, Swrden), la cual fue preparada siguiendo las instrucciones del

fabricante (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Swrden). Se lavó la columna y se equilibró con PBS (pH 7.2) y con el mismo amortiguador se ajustó a un flujo de 1.0 mL/min. Las fracciones se colectaron cada 1 mL de muestra en tubos de borosilicato de 13 × 100 mm. Se determinó la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro (Carl Zeiss, Berlin, Alemania), suponiendo que 1 A280 = 1 mg/mL en celdas de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica. De los picos con proteína los juntamos y los guardamos a -20 °C hasta su uso.

6.2.8.2 Cromatografía de Exclusión Molecular.

Como un tercer paso de purificación, una vez colectados todos los picos se procedió a dializarlos contra agua bidestilada, donde se hicieron 4 cambios cada 12 h. Y posteriormente se liofilizaron de la siguiente manera. Se colocó un volumen de 2 a 3 mL, de las fracciones obtenidas después de la separación cromatografía de exclusión molecular, en las ampolletas para liofilización de 5mL (Labconco, Kansas, USA). Las ampolletas con las muestras fueron colocadas de manera inclinada en un congelador a -70°C (Revco, Asheville, N.C., USA). Posteriormente se transportaron a la liofilizadora (Labconco, Kansas, USA) en un recipiente contenedor de Nitrógeno líquido y se colocaron en los tubos del rotor de la liofilizadora, una vez que se comprobó que la liofilizadora alcanzó las condiciones óptimas de temperatura (-50°C) y vacío (25-50 micrones). Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry modificado por Hartee (Hartree, 1972) en las fracciones liofilizadas, para lo cual se reconstituyeron 10 µg de la fracción liofilizada en 100 µL de agua desionizada. Una vez determinada la cantidad de proteína se procedió a guardar las muestras en las ampolletas para su posterior uso. Cabe aclarar que las fracciones liofilizadas en este último paso corresponden al FIAML que fue utilizó para el desarrollo de los AHE de esta tesis.

6.3 Método para Determinar Actividad Inhibitoria de la Activación de los Macrófagos Absoluta y Específica.

Se determinó la activación de macrófagos absoluta y específica, basado en el método descrito por Palacios-Corona R y col., en 1999, con las siguientes modificaciones: se cultivaron los macrófagos peritoneales (1.2×10^7), obtenidos a partir de linfoma L5178Y, en microplacas de 96 pozos (Corning, N.Y., USA), colocando 2×10^5 macrófagos por pozo con 200 μ L de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, SL., Missouri, USA) el cual contenía 25 μ g de lipopolisacáridos (LPS) (Sigma Chemical Company, SL., Missouri, USA). Las microplacas con los macrófagos en el medio RPMI fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El reto con las fracciones se realizó 24 h antes y 24 h después de la estimulación con el LPS. La determinación de Nitritos se determinó 48 h después de la estimulación con LPS, por la técnica de Griess (Stuehr, 1989). Se determinó una unidad de inhibición de la activación de macrófagos (UIAM) como la cantidad de proteínas a partir de la fracción de líquido de ascitis libre de células o cualquiera de sus fracciones que inhibe al 50% la producción de NO, por parte de los macrófagos expuestos a las fracciones, con respecto a los controles.

6.3.1. Aislamiento y Cultivo de Macrófagos Peritoneales.

Los macrófagos fueron obtenidos del líquido de ascitis de la cavidad peritoneal de ratones portadores del linfoma L5178Y. Los ratones portadores del linfoma con 12 días de evolución se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron aproximadamente 3 mL del líquido de ascitis y se colocaron en el tubo estéril con tapón de rosca. La suspensión celular se agregó a un volumen igual de NycoPrep 1.068, se centrifugó 15 minutos a 450 Xg. La banda superior conteniendo a los macrófagos se extrajo con una pipeta pasteur, se determinó el número de macrófagos por mL con hemocitómetro contando el número de células observadas en los 8 cuadrantes del hemocitómetro, esta cantidad se dividió entre 8 y se multiplicó por 10,000. Los macrófagos obtenidos se

cultivaron en una microplaca de 96 pozos, colocando 2×10^5 macrófagos/200µl/por pozo.

6.3.1.1 Preparación del Medio RPMI.

Para preparar el medio RPMI, se mezclaron 500 mL de medio RPMI y 50 mL de suero bovino fetal, en condiciones asépticas, en a un frasco estéril de 1 L de capacidad con tapón de rosca. El medio se distribuyó en alícuotas de 100 mL en frascos estériles de borosilicato (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass works, Corning, NY, USA) con tapón de rosca de 120 mL de capacidad. El medio así preparado se almacenó en refrigeración (2-8°C) hasta su uso.

6.3.1.2 LPS.

Para preparar la solución de LPS se pesaron 10 mg de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8 Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) y se disolvieron en 10 mL de agua desionizada. La solución se almacenó en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL de capacidad, estériles (Corning Inc, Corning NY., USA) y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.2 Activación de los Macrófagos Peritoneales.

Para activar a los macrófagos peritoneales de ratones sanos y de ratones portadores del linfoma se colocaron 1×10^6 células en 1 mL de medio RPMI-1640 se agregaron 25 µg de LPS y/o 200 U de rIFN - γ . De aquí, se agregaron 200 µl a la microplaca y la producción de nitritos se determinó 48 horas después de la estimulación, por la técnica de Griess.

6.3.2.1 Determinación de Nitritos por la Técnica de Griess (Stuehr, 1989).

Consideramos utilizar la técnica de Griess para determinar la liberación de los nitritos por los macrófagos activados con LPS y/o IFN- γ en base a que se ha demostrado

que los nitritos juegan un papel primordial en la actividad antitumoral de los macrófagos (Stuehr et al., 1989, Klostergaard et al., 1991 e Yim et al., 1993). Además, en 1991, Mauel et al. comprobaron que la estimación de los nitritos liberados por los macrófagos activados por los inmunomoduladores, LPS e IFN- γ , *in vitro*, es la técnica más adecuada, con respecto a otras técnicas de evaluación de productos tóxicos antitumorales con la ventaja de su gran reproducibilidad, bajo costo y alta confiabilidad.

6.3.2.2 Composición y Preparación de las Soluciones para la Técnica de Griess.

6.3.2.2.1 Reactivo A. Se disolvieron 0.1 g de naftiletildiamina en 100 mL de agua desionizada y almacenó en botella de borosilicato con tapón de rosca a 4° C.

6.3.2.2.2 Reactivo B. Se disolvió 1g de sulfanilamida en 100 mL de H₃PO₄ al 5%. Se almacenó en botella de borosilicato con tapón de rosca a 4° C.

6.3.2.2.2 Curva estándar de NaNO₂. Se disolvieron 0.068 g de NaNO₂ para obtener una solución 1 mM en 100 mL de agua desionizada. A partir de esta solución se hizo una curva con concentraciones de 0.244, 0.488, 0.976, 1.95, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 μ M.

6.3.3 Determinación de la Concentración de los Niveles de Nitritos en el Medio de Cultivo de los Macrófagos.

Se tomaron 100 μ L del medio sobrenadante de los macrófagos cultivados y se agregaron 50 μ L del reactivo A de Griess más 50 μ L del reactivo B, la mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se leyó en el lector para microplacas (ELISA, Sigma USA) a 545 nm. La concentración de nitritos se obtuvo por extrapolación en la curva estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4 Cuantificación de Proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas de las preparaciones experimentales mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se preparó una curva estándar con concentraciones variables de una solución de 1 mg/mL de seroalbúmina bovina, fracción V (SAB), en tubos de ensayo de acuerdo a lo especificado en la Tabla II.

TABLA II
Curva estándar de seroalbúmina bovina (SAB)

SAB (μL)	Agua desionizada (μL)
0	200
5	195
10	190
20	180
40	160
60	140
80	120

Se prepararon también tubos de ensayo conteniendo volúmenes variables de las preparaciones de FIAML. A cada uno de los tubos se le agregó 1 mL de reactivo C. Inmediatamente después se mezcló el contenido de cada tubo en un vortex y se incubaron todos los tubos por 10 min a temperatura de laboratorio. Luego se agregaron 0.1 mL de reactivo de Folin recién preparado, se agitó nuevamente y se incubó por 30 min a temperatura de laboratorio. Se determinó la A_{750} del contenido de cada tubo con un espectrofotómetro (Zeiss, modelo PMQ-3. Alemania Oriental). En todos los casos las mediciones se hicieron por triplicado. Se graficó la A_{750} en función de la concentración de SAB (expresada como μg de proteína/mL). En esta curva se calculó por

interpolación, mediante regresión lineal, la cantidad de proteínas contenidas en las preparaciones de FIAML.

6.5 Cuantificación de Carbohidratos.

Esta determinación se hizo por el método de antrona descrito por Hodge (Hodge J. y col., 1962). El cual consiste en disolver 200 mg de antrona en 10 mL de ac. Sulfúrico concentrado, se pipetea 1 mL de dicha solución en tubos de 13 × 100 mm sumergidos en agua helada, se agrega con cuidado 0.5 mL de la muestra (20 a 40 µg/mL), se agita vigorosamente y mantienen los tubos en agua fría. Los tubos se pusieron en un baño de agua a ebullición (Lib-Line, Dubuque, Iowa USA) por 16 minutos y se volvieron a enfriar para poder leerlos a 625 nm en un espectrofotómetro (Carl Zeiss, Berlin, Alemania). Cada muestra se trabajó por triplicado y la concentración de azúcares totales se estimó a partir de una curva patrón que contenía glucosa de 20 a 200 µg/µL. (ver Tabla III).

TABLA III
Curva estándar de Glucosa

No. de Tubo	Antrona (mL)	Glucosa (µL)	Agua (µL)	Concentración Final (µg)
C ^a	1	0	600	0
1	1	100	500	25
2	1	200	400	50
3	1	300	300	75
4	1	400	100	100
5	1	600	0	150
FIAML	1	100	500	-

6.6 Desarrollo de los Abscesos Hepáticos Producidos por *Entamoeba histolytica*.

Se anestesió a los ratones BALB/c de los 6 grupos (mencionados en el inciso: *Esquema de tratamiento*) por vía intraperitoneal, con una solución de 0.032 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 mL y aguja calibre No. 25 en dosis de 3.2 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 min, y con una duración aproximada de una hora. Se procedió a rasurar el vientre de cada uno de los 30 ratones y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después se colocó un campo estéril y con tijeras se realizó una pequeña incisión en abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoideo del esternón, exponiendo el hígado. Se inoculó a cada ratón con 5×10^5 amibas, suspendidas en 0.05 mL de medio PEHP basal, directamente en el lóbulo ventral del hígado, con una aguja calibre No. 25. Después de la inoculación se hizo hemostasia en el punto de la inoculación con gelfoam, esponja estéril hemostática (Upjohn), y se suturó la incisión, mediante súrgete continuo con candado, abarcando los planos peritoneal muscular y cutáneo, con seda estéril calibre 000 (González-Garza, M.T. *et al.* 1996). Los animales fueron puestos en jaulas de policarbonato y se les proporcionó comida y agua *at libidum* durante los primeros cuatro días, después de este tiempo se realizó una segunda laparotomía para verificar el desarrollo de los AH en cada animal de cada grupo.

6.7 Desarrollo de los Abscesos Hepáticos Producidos por *Listeria monocytogenes*.

Se anestesiaron a los ratones BALB/c de los 6 grupos (mencionados en el inciso: *Esquema de tratamiento*) por vía intraperitoneal, con una solución de 0.032 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 mL y aguja calibre No. 25 en dosis de 3.2 mg/100g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 min y con una duración aproximada de una hora. Se procedió a rasurar el vientre de cada uno de los 30 ratones y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al

0.25 %. Inmediatamente después se colocó un campo estéril y con tijeras realizamos una pequeña incisión en abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón, exponiendo el hígado. Se inoculó a cada ratón 5×10^5 bacterias, suspendidas en 0.05 mL de PBS estéril, directamente en el lóbulo ventral del hígado, con una aguja calibre No. 25. Después de la inoculación se hizo hemostasia en el punto de la inoculación con gelfoam, esponja estéril hemostática (Upjohn), y se suturó la incisión, mediante súrgete continuo con candado, abarcando los planos peritoneal muscular y cutáneo, con seda estéril calibre 000 (González-Garza, M.T. *et al.* 1996). Los animales fueron puestos en jaulas de policarbonato y se les proporcionó comida y agua *at libidum* durante los primeros cuatro días, después de este tiempo se realizó una segunda laparotomía para verificar el desarrollo de los AH en cada animal de cada grupo.

6.8 Esquema de Tratamiento.

Para el análisis del desarrollo de AHA se formaron 6 grupos de 10 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados intrahepáticamente con 5×10^5 trofozoítos 24 h antes de la inoculación se inició la administración del factor inhibidor. Los grupos del 1 al 4 recibieron las siguientes dosis: 0 (Control), 1 y 5 μg del factor inhibidor (en 0.1 mL de solución salina/g de peso corporal), respectivamente por vía intraperitoneal. Los grupos del 5 al 8 recibieron dosis similares (0,1 y 5 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal) por vía subcutánea.

Esquema de tratamiento: La primer dosis fue aplicada 24 h antes de la inoculación intrahepática de los patógenos. Las dosis subsiguientes fueron aplicadas 24, 48 y 72 h posteriores a la inoculación de los patógenos. Los grupos control (1 y 5) recibieron PBS. Para el análisis del desarrollo de los AHL se siguió el mismo esquema que el descrito para el desarrollo de los AHA, utilizando 5×10^5 bacterias para la inoculación intrahepática en los ratones. Los AH fueron analizados 24 h después de la última administración del factor inhibidor, se realizó laparotomía exploratoria y se retiró el hígado de los ratones para su estudio histopatológico Fig. 8).

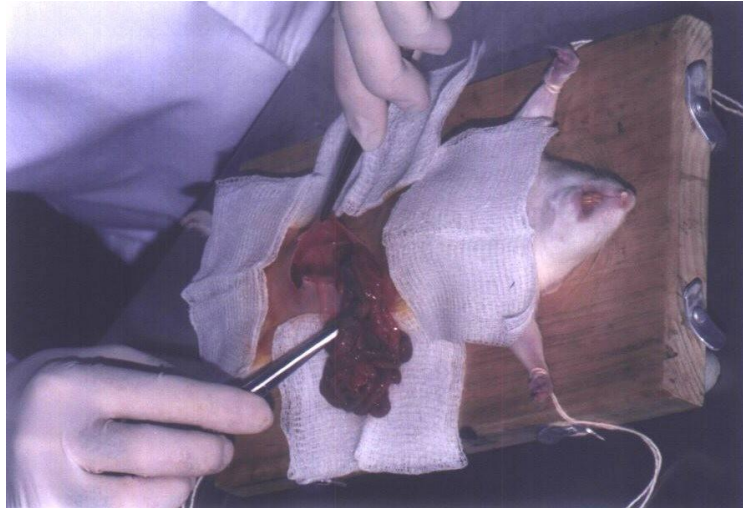


Fig. 9. Laparatomía Exploratoria en un ratón BALB/c

6.9 Análisis Histopatológico.

Para el análisis histopatológico de los hígados de los ratones de todos los grupos se realizó una biopsia hepática laparoscópica, la cual está indicada para la evaluación de daño hepático por microorganismos patógenos. Las biopsias de los hígados de cada uno de los animales fueron fijadas con formol al 10%. Posteriormente se realizaron cortes de la siguiente manera: Se colocaron trozos de tejido hepático de 10 × 5 mm (biopsias) en el procesador automático de tejidos (Miles Scientific, Illinois, USA) (tiempo de procesamiento 12 horas en cada baño) por 45 minutos en cada paso de: etanol al 70% (2 pasos), etanol absoluto (2 pasos), xilol (3 pasos), parafina (2 pasos). Se obtuvieron secciones (cortes) de 3- 4 micras por medio de un micrótopo digital (Leica, Lauderdale, USA) . Éstas fueron extendidas sobre laminillas y coloreadas con hematoxilina-eosina. Las laminillas preparadas fueron analizadas por el Patólogo experto para su diagnóstico histopatológico.

6.10 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos para cada uno de los animales tanto de los grupos experimentales como de los controles y de acuerdo con lo especificado en sección de Esquema de tratamiento, en la página anterior, fueron registrados en las hojas de recolección de datos y posteriormente se almacenaron en el soporte magnético de un ordenador PC Intel Celeron. A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar y varianza), así como un estudio comparativo mediante la utilización de la prueba estadística no paramétrica, *U de Mann-Whitney*, la cual compara dos variables cuantitativas (medias) en los casos de variables con distribución no normal. En todos los casos se consideró que existía significancia estadística cuando el valor de $p= 0.05$. Las estimaciones con un intervalo de confianza del 95% de probabilidad. La evaluación estadística de los datos se llevó a cabo mediante el programa estadístico *SPSS*® versión 11.0 para Windows.

6.12 Consideraciones Éticas para el uso de Animales.

Las consideraciones éticas para el uso de los animales en el presente trabajo se remitieron a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. La cual se puede consultar en la siguiente dirección: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>

7. RESULTADOS

En trabajos previos nuestro grupo caracterizó parcialmente (Palacios-Corona et al., 1999) la presencia del FIAML en el líquido de ascitis de ratones infectados con el linfoma L5178Y, donde se encontró que aparentemente es una proteína que inhibe la activación de macrófagos *in vitro* (Palacios C, 1996, Tesis).

Con este cúmulo de ideas, nuestro grupo está interesado en encontrar si la proteína presente en el linfoma L5178Y llamada FIAML permite que *L. monocytogenes* y *E. histolytica* produzcan AH en ratones BALB/c ya que dichos ratones son resistentes naturales hacia ambos microorganismos para producir AH.

Por lo anterior, se decidió adaptar un modelo de AH en ratones BALB/c en nuestro laboratorio y explorar la posibilidad de que el FIAML pueda inducir la proliferación de este daño.

7.1 Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 de *E. histolytica*.

Como paso inicial, se obtuvieron los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación, inóculo y días de incubación) necesarios para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial.

Se incubó la cepa HM1 de *E. histolytica* a 37 °C. La Fig. 10 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa HM1, en donde se observa una ausencia de la fase Log de crecimiento. La función que encontramos en la fase exponencial corresponde a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de amibas/mL} = e^{0.03739(\text{días de incubación}) + (7.2838)}$$

Correlación con la recta $r^2 = 0.96$

A partir de esta ecuación se determinó el tiempo de duplicación de 33.76 h y se definió tanto el inóculo (10^5 amibas/.05 mL) como los días de cultivo (2 días) necesario para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.

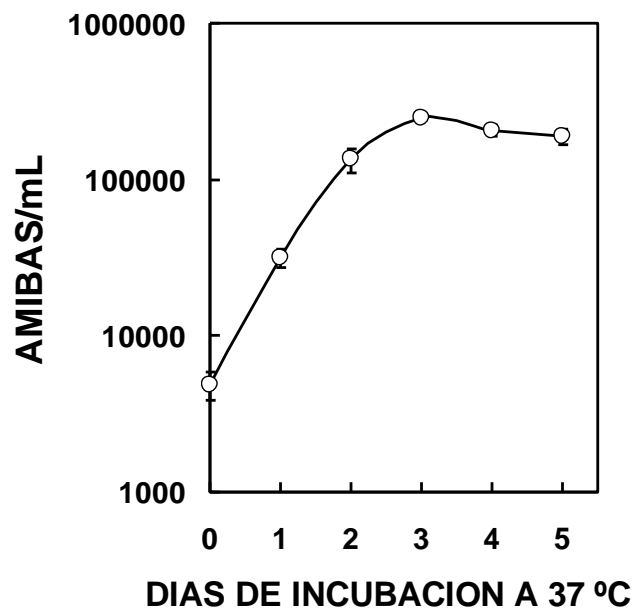


Fig. 10. Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 de *E. histolytica*. En la figura se muestra la densidad de los cultivos con un hematocitómetro. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes en tres ensayos diferentes. El coeficiente de correlación con la recta (r^2) = 0.96; $P < 0.001$.

7.2 Relación Temporal del Crecimiento de *L. monocitogenes*.

7.2.1 Obtención del Inóculo de *Listeria monocitogenes* para el Desarrollo del Absceso Hepático Experimental en Ratones BALB/c.

De las 5 diluciones cultivadas en agar sangre se encontró que la dilución de 10^{-3} presentó 100 UFC contenidas en 10 μ l de PBS. Por lo tanto, el volumen requerido para la inoculación para cada uno de los animales fue de 5×10^5 UFC/50 μ l (Tabla IV).

TABLA IV
Obtención del inóculo de *Listeria monocitogenes* para el desarrollo del AHE en ratones BALB/c.

Concentración bacteriana ^a	Volumen de siembra (mL)	UFC (X ^b)
0.5 McF ^a	0.010	3×10^8
10^{-1}	0.010	ND(I)
10^{-2}	0.010	ND(I)
10^{-3}	0.010	10^2
10^{-4}	0.010	3
10^{-5}	0.010	0

La dilución 10^{-3} resultó ser la dilución precisa para el inóculo de cada uno de los animales.

UFC: Unidad Formadora de Colonia

ND(I): No Determinada (Incontables)

^a Este tubo corresponde a una cantidad de 3×10^8 UFP de *L. monocitogenes*

^b Cada punto corresponde a tres experimentos independientes y tres determinaciones en cada experimento.

7.3 Efecto de la Inhibición de la Activación *in vivo* de los Macrófagos.

Para esto se utilizaron dos microorganismos patógenos capaces de producir AH como son *E. histolytica* y *L. monocitogenensis*.

7.3.1 *Entamoeba. Histolytica.*

Se desarrolló y probó el modelo de la producción de AH en ratones de la cepa BALB/c en presencia de *E. histolytica* cuya cepa fue pasada tres veces por hígado de hámster para tener la certeza que produjera abscesos amibianos. Cuando se realizaron estos experimentos se obtuvieron los resultados esperados: la ausencia de abscesos en los hígados de los ratones, ya que este tipo de ratones presenta un sistema inmunológico bastante activo que impide la proliferación de las amibas en el hígado.

Una vez probado el modelo experimental se procedió a determinar si el FIAML inyectado por vía intraperitoneal o subcutánea podría inhibir la activación de los macrófagos (o deprimir el sistema inmune de los ratones) y esto favoreciese la proliferación de las amibas en el hígado produciendo un absceso en ellos. Cuando se realizaron los experimentos se encontró que por ambas vías de inoculación del FIAML en los ratones, las amibas proliferaron vigorosamente en los lóbulos de los hígados de los ratones y se produjeron AH usando dosis tan bajas del FIAML tales como 1 µg/g de peso del ratón (Fig. 11). En los ratones controles a los cuales solo se les administró PBS no fueron observados AH como se muestra en la Fig. 11. Además se cuantificaron los daños producidos por las amibas en los abscesos. En la tabla VI se muestran los resultados donde se encuentra que no existen diferencias entre los animales del grupo control, es decir los que no recibieron el inhibidor y los animales del grupo que fueron inoculados con PBS e inoculados ambos grupos con el microorganismo patógeno, en ambos casos no se observó el desarrollo de AHE. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas con una $P > 0.05$ (IC de 95%) entre los animales a los que se les inyectó la dosis de 1 µg/g de peso y la dosis de 5 µg/g de peso tanto por la vía subcutánea como por la vía peritoneal (Tablas VI y VII). Tampoco se observaron

diferencias significativas ($P > 0.05$, IC de 95%) al comparar el efecto del inhibidor para producir AHE por las diferentes vías de administración (subcutánea e intraperitoneal) (Tablas VI y VII).

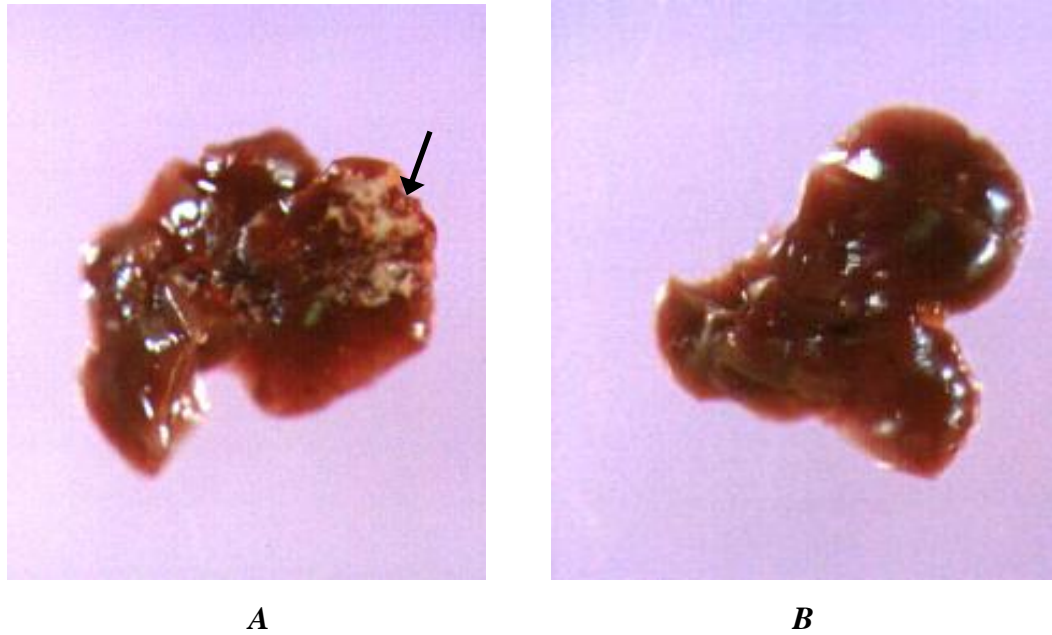


Fig. 11. Abscesos Hepáticos Amibianos en ratones BALB/c. A) Gpo. Experimental (1 μg de FIAML/g de peso corporal). Se observa un absceso hepático amibiano. B) Gpo. Control. No se observa absceso hepático amibiano.

TABLA V**Comparación de los AHE con *E. histolytica* administrada por vía intraperitoneal.**

No. de animal	No. de grupo experimental		
	I	II	III
Dosis de FIAML ($\mu\text{g/g}$ peso corporal)			
	0 ^a	1	5
	-	(mm)	(mm)
1	-	12	11
2	-	15	15
3	-	11	15
4	-	11	15
5	-	15	11
6	-	12	12
7	-	14	12
8	-	11	11
9	-	13	12
10	-	14	15
X		12.80	12.90
DE		1.61	1.85

Se muestran las medidas de los diámetros en mm de los abscesos hepáticos producidos en los ratones BALB/c por *E. histolytica*

^a : Grupo de ratones a los que no se les administró FIAML(grupo control)

X= promedio

TABLA VI
Comparación de los AHE con *E. histolytica* administrada por vía subcutánea.

No. de animal	No. de grupo experimental		
	I	II	III
Dosis de FIAML ($\mu\text{g/g}$ peso corporal)			
1	0	12	11
2	-	10	14
3	-	11	14
4	-	13	15
5	-	14	15
6	-	15	11
7	-	15	10
8	-	12	16
9	-	10	12
10	-	11	10
	-		
X		12.30	12.80
DE		1.88	2.25

Se muestran las medidas de los diámetros en mm de los abscesos hepáticos en ratones BALB/c producidos por *E. histolytica*

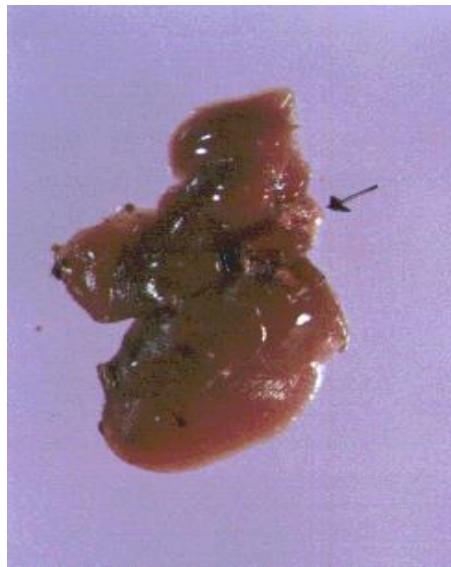
^a : Grupo de ratones a los que no se les administró FIAML(grupo control)

X= promedio

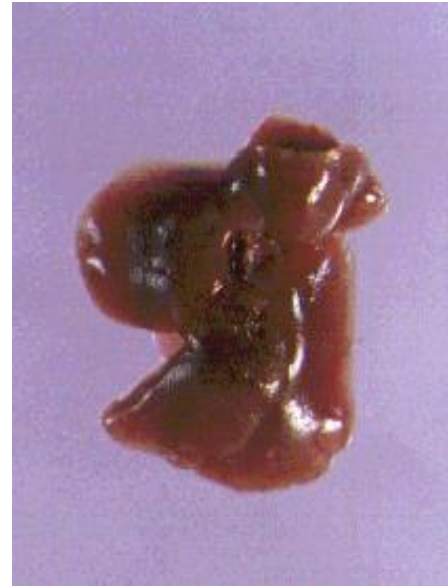
7.3.2 *Listeria monocytogenes*.

El siguiente paso fue determinar el efecto de inhibición del FIAML sobre la presencia o ausencia de AH usando la bacteria *L. monocytogenes*. Cuando se probó la producción de abscesos con *L. monocytogenes*, se encontró que estas bacterias produjeron AH en los hígados de los ratones en forma similar que las amibas, pero con menos diámetro usando dosis tan bajas como 1 µg/g del FIAML (Fig. 12). Además, no se encontró ninguna diferencia entre las vías de administración del FIAML en los ratones, intraperitoneal o subcutánea, ya que fue igual la producción de los abscesos por ambas vías. Por otro lado, en el grupo control, el cual fue inoculado con *L. monocytogenes* pero no con FIAML sino con PBS, no desarrolló los abscesos como se ilustra en la Fig. 12. Los animales de los grupos tratados con FIAML sin *L. monocytogenes* no mostraron infección adicional al final de los experimentos. También se observó que los animales inoculados con *L. monocytogenes* y administrados con el FIAML mostraron inflamación intestinal además del AH (datos no mostrados).

Se cuantificaron los daños producidos por *L. monocytogenes* en los abscesos. En la tabla VI se muestran los resultados donde se encuentra que no existen diferencias entre los animales del grupo control, es decir los que no recibieron el inhibidor y los animales del grupo que fueron inoculados con PBS e inoculados ambos grupos con el microorganismo patógeno, en ambos casos no se observó el desarrollo de AHE. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas con una $P > 0.05$ (IC de 95%) entre los animales a los que se les inyectó la dosis de 1 µg/g de peso y la dosis de 5 µg/g de peso tanto por la vía subcutánea como por la vía peritoneal. Tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$, IC de 95%) al comparar el efecto del inhibidor para producir AHE por las diferentes vías de administración (subcutánea e intraperitoneal) (Tabla VI y VII).



A



B

Fig. 12. Abscesos Hepáticos Piógenos en ratones BALB/c. A) Gpo. Experimental (1 μ g de FIAML/g de peso corporal). Se observa un absceso hepático piógeno. B) Gpo. Control. No se observa absceso hepático piógeno.

Por otra parte, los animales inoculados con *L monocytogenes* y los tratados con el FIAML mostraron la formación del absceso en el área de la inoculación. Muchos hepatocitos fueron destruidos, y se presentó tejido fino necrótico rodeado por infiltrados inflamatorios en el parénquima hepático adyacente (Fig. 13).

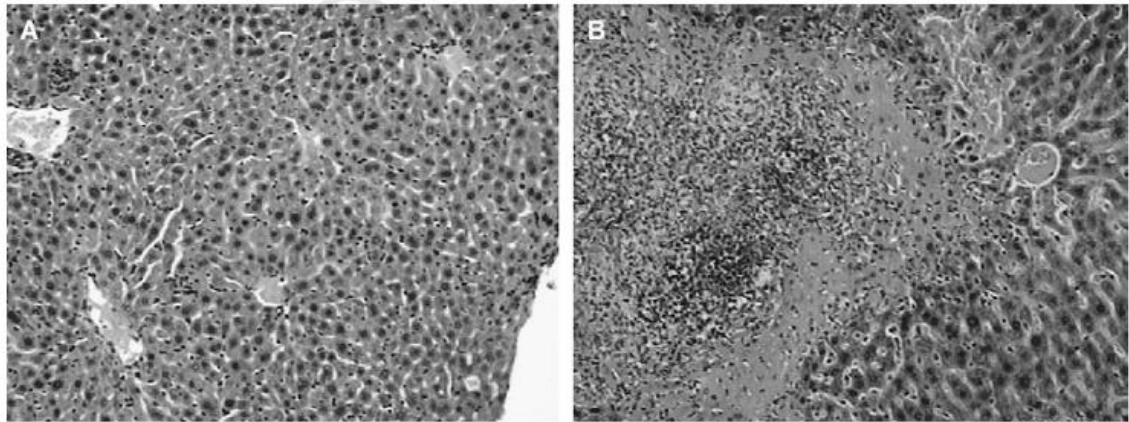


Fig. 13. Vista microscópica de los hígados de ratones BALB/c 4 días después de la inoculación con *L. monocytogenes*. A) Hígado de ratón inoculado vía subcutánea con PBS; se muestra una inflamación mínima en el infiltrado. B) Lesión en el sitio de inoculación de un hígado de ratón inoculado subcutáneamente con FIAML, se observa tejido necrótico rodeado de infiltrado inflamatorio.

TABLA VII

Comparación de los AHE con *L monocytogenes* administrada por vía intraperitoneal.

No. de animal	No. de grupo experimental		
	I	II	III
	Dosis de FIAML ($\mu\text{g/g}$ peso corporal)		
	0	1	5
	-	(mm)	(mm)
1	-	7	6
2	-	8	8
3	-	5	6
4	-	7	9
5	-	8	7
6	-	7	5
7	-	8	6
8	-	5	4
9	-	8	8
10	-	8	6
X	-	7.10	6.50
DE	-	1.197	1.509

Se muestran las medidas de los diámetros en mm de los abscesos hepáticos en ratones BALB/c producidos por *L monocytogenes*

^a : Grupo de ratones a los que no se les administró FIAML (grupo control)

X= promedio

TABLA VIII

Comparación de los AHE con *L monocytogenes* administrada por vía subcutánea.

No. de animal	No. de grupo experimental		
	I	II	III
Dosis de FIAML ($\mu\text{g/g}$ peso corporal)			
	0	1	5
	-	(mm)	(mm)
1	-	7	8
2	-	5	5
3	-	4	9
4	-	8	6
5	-	8	4
6	-	7	8
7	-	6	6
8	-	6	7
9	-	4	7
10	-	8	7
X		7.10	6.70
DE		1.197	2.23

Se muestran las medidas de los diámetros en mm de los abscesos hepáticos en ratones BALB/c producidos por *L monocytogenes*

^a : Grupo de ratones a los que no se les administró FIAML (grupo control)

X= Promedio

El FIAML es un glicopéptido con un peso molecular aparente menor de 10 kDa capaz de inducir una depresión inmunológica.

8. DISCUSIÓN

El sistema inmune de los vertebrados superiores está compuesto por una variedad de células morfológica y funcionalmente diferentes, que se diferencian a partir de células primordiales pluripotenciales. Todos estos tipos celulares ejercen funciones diferentes, interaccionando constantemente entre sí. Estas interacciones pueden estar mediadas por contacto célula a célula o a través de factores solubles que ejercen su función en células con receptores específicos. El sistema inmune humano, tiene como función principal defender al cuerpo de sustancias consideradas extrañas o no habituales que podrían causar daño y que se denominan antígenos, ya sean solubles o particulados presentes en los microorganismos patógenos como los virus, las bacterias y los parásitos unicelulares y pluricelulares. Las células del sistema de defensa se producen en la médula ósea y migran hacia los órganos especializados donde maduran y se convierten en células especializadas de defensa. Una vez diferenciadas estas células responden a un estímulo por los microorganismos patógenos y se vuelven agresivas activándose cuando el cuerpo es amenazado por dichos microorganismos (Abbas A et al., 2004).

Se sabe que actualmente uno de los mayores retos de la Inmunología es el desarrollo de inmunoterapias que protejan al paciente contra la infección o que modulen los efectos de la respuesta inmune inducida por los agentes patógenos o moléculas extrañas (Sánchez de la Rosa E y Rodríguez Hernández N, 2001). Para dilucidar estos mecanismos se requiere de la utilización de modelos animales que sean extrapolables a los mecanismos de la respuesta inmune contra microorganismos patógenos en el

humano. En la búsqueda de los modelos experimentales se observó que los ratones BALB/c presentan una resistencia innata a la infección por *E. histolytica* así como a la infección por *L. monocytogenes* (Rivero-Nava L y col., 1997 y Ghadirian E y Kogshavn PAL. 1984, Schutheis RJ y Keams RJ 1990, Portnoy DA y col, 1992) Nuestros resultados mostraron que el modelo desarrollado en esta tesis utilizando ratones BALB/c inmunocompetentes resultó ser un sistema idóneo para analizar algunos aspectos de inmunoresistencia durante la infección de *E. histolytica* y *L. monocytogenes*. Lo anterior debido a que el FIAML es capaz de inhibir al sistema inmune de los ratones permitiendo el desarrollo de los AH producidos por los microorganismos patógenos *E. histolytica* y *L. monocytogenes*.

Refiriéndonos al patógeno extracelular, *E. histolytica*, este microorganismo es causante de la amibiasis, enfermedad de distribución mundial. Se estima que infecta alrededor de 500 millones de personas anualmente y que de ellas 110 000 mueren por complicaciones causadas por este agente. El 1 % de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como la colitis amibiana fulminante o el AHA (Walsh JA 1986). El AHA es resultado de la invasión al hígado por *E. histolytica* desde un foco intestinal; en la mayoría de los casos existe sólo un absceso localizado generalmente en el lóbulo hepático derecho, el cual recibe la mayor parte de la circulación portal (Thompson JE y cols, 1985). La morbilidad y la mortalidad no han cambiado en la última década a pesar de la quimioterapia antiamebiana efectiva disponible, en gran parte por prácticas de higiene inapropiadas en regiones donde la prevalencia es alta (Campbell D y cols, 1997, Stanley, S y col, 2001, Salles J y cols, 2003, y WHO 1985). En la patogénesis del AHA, los trofozoítos de *E. histolytica* pueden invadir la mucosa del colon dependiendo de su perfil genético e inmunoenzimático (Bruchhaus I y cols, 2002). Al ingresar al sistema porta produciendo enzimas proteolíticas y haciéndose resistentes a la lisis por el complemento producen infección extraintestinal, es más frecuente a nivel hepático, en especial en el lóbulo derecho, donde la mayoría de los parásitos serán lisados, sin embargo, algunos sobreviven y desarrollan su actividad histolítica, generando trombosis y microabscesos que posteriormente progresan en tamaño. En los últimos años, las técnicas de genética

molecular y los nuevos modelos de experimentación han enseñado mucho acerca de la patogénesis de la amibiasis, pero a pesar de su importancia, persisten interrogantes acerca de la respuesta inmune frente a la infección por este parásito (Stanley, S. y cols, 2001). Nosotros demostramos que el FIAML indujo un estado de inmunosupresión en el modelo murino que desarrollamos en esta tesis, lo cual puede contribuir de manera importante en el estudio de los mecanismos de la respuesta inmune por macrófagos hacia *E. histolytica*, por ejemplo analizar el mecanismo de escape de *E. histolytica* a la respuesta inmune ya que la invasión tisular por la *E. histolytica* induce supresión de la respuesta inmune celular y a pesar de la infiltración de células inflamatorias la amiba prolifera en el absceso hepático. La sobrevivencia de los trofozoítos puede ser favorecida por el desarrollo de un estado transitorio de inmunosupresión, asociado con la amibiasis hepática y demostrada a nivel celular por deficiencias en la función de macrófagos.

La modulación de la función de los macrófagos es multifactorial, tienen gran actividad amebicida cuando son activados *in vitro* por $\text{INF } \gamma$, $\text{TNF } \alpha$, LPS y factor estimulante de colonias 1 (FEC-1) y en la infección por *E. histolytica* se asocia con alteración en su función (Campbell D y cols, 1997), la amiba patógena causa lisis directa de los macrófagos y otras células. Dada la importancia de los macrófagos en la respuesta inmune contra *E. histolytica*, podríamos sugerir con nuestros resultados que el FIAML inhibe la producción de NO en los ratones BALB/c, de tal forma que la amiba puede proliferar ante la presencia de macrófagos inmunosuprimidos que no producen NO.

Por otro lado, el grupo de Campbell D, demostró que los macrófagos son importantes en el mecanismo de respuesta en contra de *E. histolytica* pero sugieren analizar el papel de los Linfocitos T durante la infección y la respuesta a proteínas solubles de la amiba *in vitro* y mencionan que muchos de estos mecanismos continúan en investigación (Campbell D y cols, 1997). Actualmente no tenemos evidencias suficientes para probar que el FIAML tiene actividad en otras células del sistema inmune. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los linfocitos humanos, incubados con el FIAML, no fueron afectados en su habilidad para responder

hacia un estímulo con PHA (Datos no mostrados). Sin embargo, otras células inmunológicas como los neutrófilos o células polimorfonucleares pudieran también ser afectadas por el FIAML.

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han evidenciado alteración en la función efectora y accesoria de los macrófagos, los cuales se vuelven refractarios a la activación por INF γ y LPS, está reducida la habilidad para presentar antígenos a linfocitos T por disminución en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad Clase II, aumento en la producción de metabolitos del ácido araquidónico principalmente la prostaglandina E2, leucotrienos C4 y B4 que disminuyen la producción de proteínas y promueven la formación de granulomas, defectos en la producción de interleucinas y TNF α (necesarios para la formación de óxido nítrico, activación de granulocitos, fibroblastos, macrófagos y adherencia y migración de neutrófilos), modulación en la producción de metabolitos oxidativos (H_2O_2 , O_2^-) y no oxidativos (NO) e inefectividad en la lisis amibiana (Campbell D et al, 1997). Esta supresión en la función del macrófago ocurre en la población próxima al absceso, pues la población periférica no se encuentra afectada, lo cual sugiere que es un evento local relacionado con exposición directa a la amiba o sus productos (Campbell D et al, 1997, Espinosa-Cantellano M et al, 2002). La nueva proposición de esta investigación es analizar si la acción inmunosupresora del FIAML en macrófagos está relacionada con el aumento de metabolitos del ácido araquidónico como la PG2 que promuevan el desarrollo de los AH por *E. histolytica*, causando una disminución en la producción de proteínas, con la disminución de producción de interleucinas necesarias para la formación de NO, nosotros hemos demostrado en un trabajo realizado en nuestro laboratorio que los macrófagos son inhibidos en su producción de NO en condiciones *in vitro* lo cual nos lleva a pensar que en condiciones *in vivo*, el FIAML pudiera tener un efecto similar en los macrófagos peritoneales de ratones inmunocompetentes infectados con trofozoitos de *E. histolytica*.

En un reporte de caso de múltiples episodios de AHA en un paciente durante un periodo de 4 años, se encontraron alteraciones en la producción de IOR, mecanismo importante de resistencia por parte de los macrófagos. Aunque aun no hemos demostrado si el FIAML afecta la producción de IOR, hemos demostrado en trabajos anteriores que el FIAML inhibe la producción de INR en macrófagos peritoneales murinos activados con LPS. Estudios realizados por otros grupos de investigadores corroboraron la evidencia, de que los INR contribuyen a la habilidad de los macrófagos murinos activados de inhibir a patógenos extracelulares como *E. histolytica* (Denis et al, 1992.). Es de gran interés conocer si esta función es similar en macrofagos humanos infectados con trofozoítos de *E. histolytica*, lo cual es sugerible al demostrar en este estudio que el FIAML produjo AH en ratones inmunocompetentes proablemente inhibiendo la producción de INR por los macrófagos. Esta idea es apoyada por el trabajo realizado por Moran y cols, quienes demostraron que la depresión de la actividad de macrófagos inducida por sílica o por suero anti-macrófagos incrementa la severidad del AHA (Moran P y cols, 2002). En este mismo sentido nosotros podemos sugerir que el FIAML fue capaz de inhibir a los macrófagos, en condiciones *in vivo*, provocando el desarrollo de abscesos hepáticos amibianos en los ratones inmunocompetentes. Por consiguiente, estos datos apoyan el importante papel de los macrófagos en el rechazo del desarrollo de abscesos hepáticos producidos por microorganismos patógenos y sugiere que la producción de NO esta involucrada en este proceso.

Experimentos *in vitro*, han demostrado el papel de diversas citoquinas (INF γ TNF α y β , FEC-1, IL-2 y otras) en la activación de macrófagos y neutrófilos para destruir a *E. histolytica*. De igual forma, se ha encontrado que el NO favorece la resistencia del hepatocito frente a la apoptosis inducida por el parásito, también estimula la regeneración hepática y ocasiona la destrucción del parásito, ésta se considera la principal molécula implicada en la citotoxicidad mediada por los macrófagos frente al trofozoíto (Espinosa-Cantellano M et al, 2002 y Seydel K et al, 2000). El TNF- α , producido por macrófagos activados, actúa en forma autocrina aumentando la citotoxicidad contra el parásito al elevar la expresión genética de la iNOS (Campbell D et al, 1997). Como lo hemos mencionado, en un trabajo previo realizado por nuestro

grupo encontramos mediante experimentos *in vitro* que el FIAML inhibe la activación de los macrófagos estimulados con LPS, aunque no por IFN- γ , inhibiendo totalmente la producción de NO por los macrófagos. Este hecho nos llevo a pensar que el FIAML también pudiera estar afectando la producción de NO en un sistema *in vivo*. Nosotros pudimos demostrar que el FIAML provocó inmunosupresión en los ratones BALB/c, haciéndolos susceptibles a la infección por *E histolytica*. Con estos resultados concordamos con los resultados encontrados por otros grupos de investigadores.

En la actualidad se desconoce la identidad de las moléculas amibianas involucradas en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Los receptores y la interacción con estos, las vías de transducción que son usadas y los elementos de regulación genética deben ser elucidados y es probable que más de una molécula se encuentre involucrada. La lectina de adhesión y la proteína rica en serina de la *E. histolytica* tienen efectos inmunoprotectores más que inmunosupresores (Campbell D y cols, 1997). De acuerdo con lo anterior, corroboramos que el modelo murino de ratones inmunosuprimidos inmunizados con el FIAML puede contribuir de manera importante en el esclarecimiento de dichos mecanismos actualmente desconocidos en el proceso de infección de *E histolytica*.

Se ha observado que el pretratamiento con TGF- β estimula a los macrófagos de médula ósea para incrementar la citotoxicidad contra los trofozoítos de *E. histolytica* (Lin JY y cols, 1994). Como lo mencionamos en los antecedentes de esta tesis, el TGF- β es un inhibidor de la activación de los macrófagos. El TGF- β es capaz de inhibir la expresión de iNOS inducida por los LPS o la expresión de citocinas pro-inflamatorias, aunque en estos casos los mecanismos de acción son menos descritos hasta ahora (Imai et al., 2000; Werner et al., 2000). En base a nuestros resultados podríamos suponer que el FIAML presenta un comportamiento muy similar a esta citosina., sugiriendo que el pretratamiento con el FIAML pudiera estimular a los macrófagos murinos para incrementar la citotoxicidad contra los trofozoítos de *E. histolytica*.

Tutsumi y cols, demostraron que la producción de NO por los macrófagos generada por el estímulo por IFN γ se suprime durante la infección, mientras que la respuesta de los macrófagos hacia la infección cuando son estimulados por LPS, no se vio afectada (Tutsumi, 1988). Nuestros resultados mostraron un comportamiento totalmente contrario a estos resultados ya que los macrófagos estimulados por LPS son inhibidos en su producción de NO no siendo así con IFN γ , lo cual nos sugiere que el mecanismo de acción del FIAML es diferente en los ratones BALB/c aun tratándose de el mismo patógeno extracelular. Nosotros sugerimos que es posible que exista una respuesta diferencial importante por parte de los macrófagos hacia los antígenos de protozoarios parásitos, donde el NO juega un papel importante en el rechazo hacia la infección.inhibitoria de la producción de NO en macrófagos murinos estimulados con LPS pero no con IFN- γ .

Por lo que respecta a *L. monocytogenes*, es un patógeno intracelular que produce la enfermedad llamada listeriosis invasiva, con una amplia distribución en la naturaleza. En los últimos 20 años, *L. monocytogenes* ha pasado de ser el agente causal de una enfermedad infecciosa de importancia limitada a uno de los microorganismos responsables de zoonosis típicos transmitidos por alimentos y de mayor interés para las autoridades de salud pública y la industria de alimentos. Es importante el conocimiento sobre parasitismo intracelular practicado por esta bacteria, los determinantes moleculares responsables de las principales etapas de su ciclo de vida dentro de la célula hospedero, la fisiopatología de la listeriosis, manifestaciones clínicas y el tratamiento en las poblaciones de riesgo.

La investigación de la fisiopatología de listeriosis requiere de un modelo animal en el cual el agente infeccioso pueda manifestar el mismo tropismo celular y tisular que en humanos; modelo en el que se observen los mismos efectos directos e indirectos que causan los daños inmunopatológicos (Lecuit 2002). Existen dos estrategias para establecer un modelo para el estudio de la listeriosis: La primera es identificar una especie animal en la cual la interacción ligando-receptor sea específica y similar al humano. La segunda es generar un animal modificado genéticamente (transgénico),

generalmente un ratón en el que se pueda establecer la infección (Lecuit 2002). Nuestros resultados mostraron que el FIAML provocó inmunodepresión en los ratones BALB/c lo que permitió la infección por *L. monocytogenes*, lo cual hace al modelo murino utilizado en esta tesis idóneo para el estudio de los mecanismos de infección por *L. monocytogenes*. El modelo implementado en esta tesis es similar al modelo propuesto por Lecuit para el estudio de la infección por *L. monocytogenes*.

Existen diferentes estudios que definen la función de los macrófagos en contra de *L. monocytogenes*, que contribuyen al progreso de estas nuevas estrategias en la manipulación de la respuesta inmune (Gregory SH et al, 1993; Boockvar KS et al 1994; Beckerman KP et al, 1993). Recientes estudios han demostrado que los macrófagos juegan un papel primordial en la defensa contra las infecciones provocadas por *L. monocytogenes*, lo cual se ha observado en macrófagos murinos (Haschtmann y cols, 2005, Ito S y cols, 2005). Ellos mostraron que los macrófagos peritoneales murinos son capaces de matar a *L. monocytogenes* dentro de hepatocitos infectados, hecho que los hace suponer, que esta actividad es un nuevo papel citotóxico de los macrófagos como parte de la defensa del huésped en la fase temprana contra la infección por la bacteria intracelular facultativa y en monocitos humanos, en donde reportan que (TNF)-relacionado a 2" (LIGHT) incrementa los niveles de fagocitosis de los macrófagos en contra de *L. monocytogenes* ((Marion S y cols., 2005, Vohra H y cols, 2003, Heo SK y cols, 2005, y Ventura-Juárez y cols, 2003). Estos antecedentes demuestran que los macrófagos como células principales de defensa tienen la capacidad de participar activamente ante diferentes estímulos de tipo infeccioso. Nuestros resultados apoyan idóneamente estas investigaciones ya que encontramos que los ratones inmunocompetentes son capaces de suprimir su respuesta inmune hacia *L. monocytogenes* cuando son expuestos con el FIAML, lo que nos hace suponer que los macrófagos se ven afectados en su producción de NO, hecho que permite a *L. monocytogenes* infectar a los hepatocitos murinos. Además este resultado es apoyado por Lecuit y su grupo quienes diseñaron un ratón transgénico para evaluar el papel de la interacción internalina-E caderina en la habilidad de *L. monocytogenes* para cruzar la barrera intestinal (Lecuit 2001). También Ebe y cols, concuerdan con nuestros resultados

al encontrar en sus experimentos de depleción del sistema inmune “*in vivo*” que los macrófagos residentes destruyen la mayoría de bacterias ingeridas, lo que resulta en la disminución del tamaño de la población bacteriana, durante las primeras 6 horas de infección (Ebe y cols, 1999). Anteriormente demosramos que los macrófagos murinos en cultivo no producen NO cuando son estimulados con LPS y retados con el FIAML, en condiciones *in vivo*. El FIAML es capaz de inhibir la respuesta inmune de ratones inmunocompetentes lo cual sugiere nuevamente que los macrófagos se encuentran afectados por el inhibidor demostrando con esto el papel importante en el mecanismo de deensa contra la infección por bacterias intracelulares como es *L. monocytogenes*.

Blanot y cols, utilizaron modelos de ratón y rata para analizar los factores de virulencia de *L. monocytogenes* que presentan homología con el humano. Además de que en roedores se ha estudiado experimentalmente la tromboencefalitis por *L. monocytogenes* (Blanot y cols, 1997). De acuerdo con este esquema podríamos sugerir la utilización del modelo desarrollado en este trabajo de tesis para el seguimiento de la respuesta inmune de los ratones BALB/c en otros procesos infecciosos provocados por la bacteria intracelular, *L. monocytogenes*.

La microscopía electrónica de tejido hepático de ratones infectados sugiere que *L. monocytogenes* desarrolla completamente el ciclo infeccioso intracelular en los hepatocitos (Gaillard y cols, 1996). El paso de hepatocito a hepatocito conduce a la formación de un foco infeccioso en el que *L. monocytogenes* se disemina a través del parénquima hepático sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune; lo que pudiera explicar por qué los anticuerpos no son importantes en la inmunidad anti-Listeria (Edelson et al., 1999). Durante las etapas tempranas de colonización hepática, los polimorfonucleares son reclutados en los sitios de infección, en respuesta a la liberación de quimioattractantes por parte de los hepatocitos, formando microabscesos (Rogers et al., 1996). Los ratones BALB/c son resistentes naturales a la formación de abscesos por *L. monocytogenes*. En este trabajo de tesis, la administración del FIAML en estos ratones los inmunosuprimió, de tal forma que *L. monocytogenes* desarrollo abscesos hepáticos en los lóbulos hepáticos en dichos ratones. Nuestros

resultados mostraron que en los cortes histológicos de ratones infectados con la bacteria se observó tejido necrótico rodeado de infiltrado inflamatorio, lo cual corresponde con lo encontrado por otros autores.

Se conoce que los macrófagos están involucrados en el reconocimiento y subsiguiente eliminación de las bacterias intracelulares, como lo es *L. monocytogenes*. Al respecto, varios investigadores, mostraron que la resolución de las infecciones en la cavidad peritoneal es temporalmente retardada por el reclutamiento de los macrófagos y que la inhibición del reclutamiento de los macrófagos en el desarrollo tumoral esta asociada con el incremento en la mortalidad por listeriosis (Gahan y cols, 1997). Mientras, Yang y cols demostraron en un estudio realizado en ratas, que la exposición a partículas extraídas de diesel (DEP) hacia los macrófagos disminuyó la capacidad de estas células inmunológicas de producir oxidantes antimicrobianos en respuesta a *L. monocytogenes* y de esta forma se incrementa la susceptibilidad a la infección pulmonar en las ratas (Yang y cols, 2001). Es interesante notar que la disminución de la producción de NO y el incremento en la susceptibilidad hacia infecciones pulmonares por bacterias esta asociado con la edad avanzada (Antonini JM y cols, 2001). Fehr T y su grupo realizaron un estudio con ratas normales, demostrando que la invasión por bacterias esta asociada al reclutamiento y subsiguiente desaparición de los macrófagos que expresan las enzimas iNOS y la nitrotirosina, lo cual es un indicador de la producción de NO (Fehr T y cols, 1997). El tratamiento con un inhibidor selectivo de la iNOS, la L-N(6) (1-iminoethyl)-lysina (L-NIL), incremento la mortalidad en ratas, lo que sugiere que el NO posee un efecto protector en la meningoencefalitis listérica en ratas (Remer KA y cols, 2001). Nuestros resultados apoyan a estos grupos de investigación ya que demostramos que el FIAML inhibe la respuesta inmune de los ratones inmunocompetentes hacia la infección por *L. monocytogenes* cuando estos ratones se exponen al FIAML, por lo que podemos sugerir que el FIAML afecta a los macrófagos involucrados en la defensa contra la infección no solo por parásitos extracelulares sino también por bacterias intracelulares como lo es *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes además de ser un paradigma para la investigación inmunológica se ha convertido en sistema modelo apropiado para el análisis de los mecanismos del parasitismo intracelular de otras bacterias. Investigadores en el área de la Inmunología se interesaron en este microorganismo cuando se reconoció el riesgo que representaba para la salud pública y la seguridad en la industria de alimentos. Desde mediados de los años 80's se ha investigado la Biología Molecular de los marcadores de virulencia de este microorganismo, la Biología Celular de las interacciones de los marcadores de virulencia con los receptores de la célula hospedero y los mecanismos de inmunidad mediada por células del hospedero (Shen y cols, 1998). A pesar de todos los estudios que se conocen sobre el mecanismo de acción de los macrófagos en contra de *L. monocytogenes*, aun no se ha esclarecido como es que los macrófagos eliminan a los parásitos intracelulares. El descubrimiento de la especificidad por el hospedero y la elucidación del mecanismo de patogenia, ha conducido a la generación de ratones que sirvan de modelo de estudio. Nuestros resultados mostraron que el modelo implementado en esta tesis utilizando ratones BALB/c pudiera ser considerado para el estudio de los mecanismos que aun no se esclarecen en el ámbito de la respuesta inmune hacia *L. monocytogenes*

Se cree que la generación durante la ruptura oxidativa de IOR, la interacción del anión superóxido y el NO y los INR realizan un papel importante. Datos experimentales “*in vitro*” sugieren que ROI y RNI contribuyen significativamente a la muerte de *L. monocytogenes* mediada por macrófagos (Ohya et al., 1998a; Ohya et al., 1998b). El hierro es requerido para las reacciones catalíticas que conducen a la generación de IOR y INR, y la correcta homeostasis intracelular de este elemento ha sido reportada como esencial para tener una adecuada actividad listericida de los macrófagos (Fleming 1997). El hecho de conocer que el FIAML inhibe la producción de INR apoya la idea de que el FIAML en condiciones *in vivo* pudiera estar inhibiendo la producción de INR por los macrófagos murinos de ratones inmunocompetentes, lo cual es congruente con los resultados obtenidos por Ohya y Fleming.

La catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) son enzimas producidas por *L. monocytogenes* para detoxificar los radicales endógenos de oxígeno libres, generados durante el metabolismo oxidativo, lo cual es importante para contrarrestar el mecanismo microbicida dependiente de oxígeno del hospedero, durante la infección (Haas 1993; Miller 1997). Otros mecanismos microbicidas como enzimas lisosomales, defensinas y péptidos antimicrobianos citosólicos son fundamentales para la defensa del hospedero con la infección listerial (Hiemstra et al., 1999; Shiloh et al., 1999). Actualmente nosotros desconocemos si el FIAML es capaz de inhibir la producción de otros mediadores producidos por los macrófagos involucrados en el proceso infeccioso por *L. monocytogenes*, lo que sugiere un análisis posterior de dichos mecanismos mediante la utilización del modelo desarrollado en este trabajo de tesis.

Nuestros resultados nos demuestran que el FIAML es un glicopéptido que permite el desarrollo de abscesos hepáticos provocados por *L. monocytogenes*, bacteria intracelular. Los abscesos hepáticos producidos por *L. monocytogenes*, no fueron observados en los ratones normales. Estos descubrimientos apoyan la idea de que la síntesis de NO por los macrófagos juega un papel significativo en la prevención de la infección por *L. monocytogenes* y además sugiere que la inhibición de las funciones de los macrófagos y la inhibición de la síntesis del NO son los principales mecanismos de acción del FIAML no solo en parásitos extracelulares como *E. histolytica*, sino también en bacterias intracelulares como *L. monocytogenes*.

De acuerdo a lo evidenciado en este estudio el FIAML es un inmunomodulador capaz de inducir una depresión sistémica de los macrófagos, dicha condición puede ser una herramienta útil en la investigación contribuyendo en diferentes áreas entre las que se pueden mencionar la tolerancia o resistencia a las infecciones, trasplantes y crecimiento tumoral.

Las evidencias en esta tesis demuestran que el FIAML es un potente inhibidor de la activación de los macrófagos y de esta manera y en ausencia de que indique otro nivel de acción sugiere que estas moléculas están involucradas en dicho mecanismo.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- 1) Se confirmó la resistencia natural por la ausencia de abscesos hepáticos en los ratones BALB/c contra la infección por *Listeria monocytogenes*
- 2) Se confirmó la resistencia natural por la ausencia de abscesos hepáticos en los ratones BALB/c contra la infección por *Entamoeba histolytica*
- 3) Se demostró que la administración del Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma en animales inmunocompetentes infectados con *Entamoeba histolytica* permitió el desarrollo de abscesos hepáticos experimentales.
- 4) Se demostró que la administración del Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma en animales inmunocompetentes infectados con *L. monocytogenes* permitió el desarrollo de abscesos hepáticos experimentales.

RECOMENDACIONES

Nuestro grupo sugiere que el siguiente paso en el área de investigación con el Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma murino: es purificar a homogeneidad de la o las moléculas responsables del efecto inhibitorio. Ya que una vez purificado podremos obtener su secuencia total por medio de métodos moleculares.

Además se recomienda la obtención de anticuerpos específicos contra la o las moléculas responsables de la inhibición para intentar la disminución del crecimiento del linfoma en los ratones BALB/c.

Se recomienda también la búsqueda de este inhibidor en líquido de ascitis en linfomas humanos e identificarlo y obtener anticuerpos monoclonales y compararlo con el Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma murino para intentar en ambos casos una disminución en el desarrollo tumoral

Se recomienda probar si el Factor Inhibidor de la Activación de los Macrófagos de Linfoma murino es capaz de inmunosuprimir la respuesta inmune en transplantes heterologos.

RESUMEN CURRICULAR

Rebeca Palacios Corona

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS PRODUCIDO POR EL LINFOMA MURINO L5178Y SOBRE EL DESARROLLO DE ABSCESOS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR *Listeria monocytogenes* Y *Entamoeba histolytica* EN RATONES INMUNOCOMPETENTES.

Campo de Estudio: Microbiología e Inmunología

Datos Personales: Nacida en México, DF., el 3 de Mayo de 1964, hija de José Palacios Alvarado y Lilia Corona Ahuatzi.

Educación: Egresada de la Universidad Nacional Autónoma de México, grado obtenido Biólogo en 1993. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestra en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en 1996, recibiendo mención honorífica.

Experiencia Profesional: Gerente de Investigación y Desarrollo en la empresa CTR Scientific desde el año 1998; N41 Técnico en Investigación en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS desde el año 2000; N49 Investigador Asociado "A" en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS desde el año 2003; N50 Investigador Asociado "B" en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS desde el año 2005.

1. RESUMEN

Los macrófagos están involucrados en la resistencia contra infecciones bacterianas y por protozoarios. Los ratones normales son naturalmente resistentes a la formación de los abscesos hepáticos experimentales producidos por *Listeria monocytogenes* y *Entamoeba histolytica*. Recientemente nuestro grupo describió un factor inhibidor de la activación de los macrófagos producido por el linfoma murino L5178Y, que inhibe la producción de óxido nítrico por los macrófagos. El objetivo del presente estudio fue investigar si el factor inhibidor permite el desarrollo de abscesos hepáticos amibianos y piógenos en ratones BALB/c infectados intrahepáticamente. Para el análisis del desarrollo de abscesos hepáticos amibianos se formaron 6 grupos de 10 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados intrahepáticamente con 5×10^5 trofozoítos 24 h antes de la inoculación se inició la administración del factor inhibidor. Los grupos del 1 al 3 recibieron las siguientes dosis: 0 (Control), 1 y 5 μg del factor inhibidor (en 0.1 mL de buffer de fosfatos/g de peso corporal), respectivamente por vía intraperitoneal. Los grupos del 4 al 6 recibieron dosis similares (0,1 y 5 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) por vía subcutánea. Esquema de tratamiento: La primera dosis fue aplicada 24 h antes de la inoculación intrahepática de los patógenos. Las dosis subsiguientes fueron aplicadas 24, 48 y 72 h posteriores a la inoculación de los patógenos. Los grupos control (1 y 4) recibieron amortiguador de fosfatos. Para el análisis del desarrollo de los abscesos hepáticos piógenos se siguió el mismo esquema que el descrito para el desarrollo de los abscesos hepáticos amibianos, utilizando 5×10^5 bacterias para la inoculación intrahepática en los ratones. Los abscesos hepáticos fueron analizados 24 h después de la última administración del factor inhibidor, se realizó laparotomía exploratoria y se retiró el hígado de los ratones para su estudio histopatológico. Resultados: a) no se desarrollaron abscesos hepáticos en los ratones BALB/c que no se expusieron al factor inhibidor y se infectaron con *E. histolytica*, b) no se desarrollaron abscesos hepáticos en los ratones BALB/c que no se expusieron al factor inhibidor y se infectaron con *L. monocytogene*, c) los ratones BALB/c expuestos al factor inhibidor desarrollaron abscesos hepáticos experimentales producidos por el parásito extracelular, d) los ratones BALB/c expuestos al FIAML desarrollaron abscesos hepáticos experimentales producidos por la bacteria intracelular y e) no se observaron diferencias con respecto a las vías de administración del inhibidor (intraperitoneal y subcutánea). El factor inhibe la activación de los macrófagos, *in vitro*, e inactiva la producción de NO y de esta manera y en ausencia de que indique otro nivel de acción sugiere que esta molécula está involucrada en dicho mecanismo. Nuestros resultados muestran que el factor inhibidor es un potente bloqueador de la respuesta inmune celular al provocar el desarrollo de los abscesos hepáticos experimentales en los ratones inmunocompetentes.

1. ABSTRACT

Macrophages are involved in the rejection of infections due to bacteria and protozoa. Normal mice are naturally resistant to formation of experimental hepatic abscess produced by *Listeria monocytogenes* or *Entamoeba histolytica*. Recently, our group have described a macrophage activation inhibitor factor produced by the murin lymphoma L5178Y, which block the production of NO by macrophages, when they are stimulated with LPS but not with Interferon gamma. Considering that Balb/c mice are naturally resistant to the infection due to *L. monocytogenes* y *E. histolytica*, and due to their capacity to produce NO, macrophages play an important role in the resistance to those infections. The aim of this research was to investigate if the inhibitor factor was or not able to inhibit *in vivo* macrophages response, permitting the development of amoebic and bacterial hepatic abscess in experimentally infected intrahepatically Balb/c mice. Six groups, with ten mice each one, were used to analyze the development of amoebic hepatic abscess. The mice were inoculated intrahepatically con 5×10^5 trophozoites, 24h before the inoculation a dose of the inhibitor factor was administered. Groups 1-3 were injected daily for 3 days by intraperitoneally doses with 0 (control group), 1, y 5 μg ; of the inhibitor factor (in 0.1 ml of phosphate buffer/g of corporal weight) respectively. Groups 4-6 received similar doses (0, 1 y 5 μg /g of corporal weight) subcutaneously. The first dose was administered 24 h before the bacteria's intrahepatically inoculation. The subsequent doses were applied 24, 48 and 72 h after the inoculation of the microorganisms. Control groups (1 and 4) received only phosphate buffer. The scheme described to analyze the development of the amoebic hepatic abscess was also used to examine the bacterial hepatic abscess, using 5×10^5 bacteria for the intrahepatically mice inoculation. The hepatic abscesses were analyzed 24h after the last administration of the inhibitor factor, an exploratory laparotomy was practiced and the affected hepatic lobe was surgically removed to perform the histopathological analysis. Results: a) no hepatic abscesses were developed in Balb/c mice infected with *E. histolytica*, but not exposed to FIAML, b) no hepatic abscesses were developed in Balb/c mice infected with con *L. monocytogenes*, but not exposed to the inhibitor factor, c) Balb/c mice exposed to the inhibitor factor developed experimental hepatic abscess due the extracellular parasite infection, d) Balb/c mice exposed to FIAML developed experimental hepatic abscess produced by intracellular bacteria, and e) no differences were observed in the inhibitor administration route (intraperitoneally and subcutaneously). The FIAML inhibits *in vivo* and *in vitro* macrophage's activation, also inactivates the NO production suggesting by this, and without evidence of other action level, that this molecule is involved in such mechanisms. Our results show that the inhibitor factor is a potent blocker of cellular immune response, causing the development of experimental hepatic abscess in immunocompetent mice.

11. APÉNDICES

11.1 Resultados de la evaluación estadística de los datos llevada a cabo mediante el programa estadístico SPSS® versión 11.0 para Windows.

11.1.1 Estadísticas Descriptivas para los grupos de animales sometidos a diferentes dosis FIAML e inoculados con *Listeria monocytogenes*.

GRUPO		Estadístico	Error tít.
DOSIS	A	Media	7,10
			,379
		Intervalo de confianza para la media al 95%	
		Límite inferior	6,24
		Límite superior	7,96
		Media recortada al 5%	7,17
		Mediana	7,50
		Varianza	1,433
		Desv. tít.	1,197
		Mínimo	5
		Máximo	8
		Rango	3
		Amplitud intercuartil	1,50
		Asimetría	-1,204
			,687
		Curtosis	,141
			1,334

B	Media		6,50	,477
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5,42	
		Límite superior	7,58	
	Media recortada al 5%		6,50	
	Mediana		6,00	
	Varianza		2,278	
	Desv. típ.		1,509	
	Mínimo		4	
	Máximo		9	
	Rango		5	
	Amplitud intercuartil		2,25	
	Asimetría		,121	,687
	Curtosis		-,401	1,334
<hr/>				
C	Media		6,30	,496
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5,18	
		Límite superior	7,42	
	Media recortada al 5%		6,33	
	Mediana		6,50	
	Varianza		2,456	
	Desv. típ.		1,567	
	Mínimo		4	
	Máximo		8	
	Rango		4	
	Amplitud intercuartil		3,25	
	Asimetría		-,403	,687
	Curtosis		-1,285	1,334
<hr/>				
D	Media		6,70	,473
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	5,63	
		Límite superior	7,77	
	Media recortada al 5%		6,72	
	Mediana		7,00	
	Varianza		2,233	
	Desv. típ.		1,494	
	Mínimo		4	
	Máximo		9	
	Rango		5	
	Amplitud intercuartil		2,25	
	Asimetría		-,360	,687
	Curtosis		-,152	1,334

11.1.2 Estadísticas Descriptivas para los grupos de animales sometidos a diferentes dosis FIAML e inoculados con *Entamoeba histolytica*.

AMIBAS	A	Media	12,80	,512
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	11,64
			Límite superior	13,96
		Media recortada al 5%	12,78	
		Mediana	12,50	
		Varianza	2,622	
		Desv. típ.	1,619	
		Mínimo	11	
		Máximo	15	
		Rango	4	
		Amplitud intercuartil	3,25	
		Asimetría	,204	,687
		Curtosis	-1,695	1,334
<hr/>				
	B	Media	12,90	,586
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	11,57
			Límite superior	14,23
		Media recortada al 5%	12,89	
		Mediana	12,00	
		Varianza	3,433	
		Desv. típ.	1,853	
		Mínimo	11	
		Máximo	15	
		Rango	4	
		Amplitud intercuartil	4,00	
		Asimetría	,312	,687
		Curtosis	-2,139	1,334
<hr/>				
	C	Media	12,30	,597
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	10,95
			Límite superior	13,65
		Media recortada al 5%	12,28	
		Mediana	12,00	
		Varianza	3,567	
		Desv. típ.	1,889	
		Mínimo	10	
		Máximo	15	

	Rango		5	
	Amplitud intercuartil		3,50	
	Asimetría		,327	,687
	Curtosis		-1,310	1,334
<hr/>				
D	Media		12,80	,712
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	11,19	
		Límite superior	14,41	
	Media recortada al 5%		12,78	
	Mediana		13,00	
	Varianza		5,067	
	Desv. típ.		2,251	
	Mínimo		10	
	Máximo		16	
	Rango		6	
	Amplitud intercuartil		4,25	
	Asimetría		,018	,687
	Curtosis		-1,787	1,334

11.2 Prueba de normalidad aplicada a los promedios de los abscesos hepáticos experimentales.

	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk			
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<i>L. monocytogenes</i>	A	,274	10	,032	,738	10	,003
	B	,230	10	,144	,947	10	,638
	C	,172	10	,200	,883	10	,140
	D	,180	10	,200	,966	10	,854
<i>E. histolytica</i>	A	,189	10	,200	,873	10	,109
	B	,286	10	,020	,757	10	,004
	C	,163	10	,200	,909	10	,275
	D	,203	10	,200	,896	10	,199

* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

11.3 Prueba de Mann-Whitney

	Rangos			
	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
<i>L. monocytogenes</i>	A	10	11,75	117,50
	B	10	9,25	92,50
	Total	20		
<i>E. histolytica</i>	A	10	10,25	102,50
	B	10	10,75	107,50
	Total	20		

ABREVIATURAS

%	Por ciento.
μl	Microlitros.
AH	Abscesos Hepáticos .
AHA	Abscesos Hepáticos Amibianos.
AHE	Abscesos Hepáticos Experimentales.
AMPc	Monofostato Cíclico de Adenosina
AMs	Anticuerpos Monoclonales.
Ang	Angiopoiatina
BPA	Bisfenol A
CAPK	Proteína Quinasa Activada por Ceramida.
CD	Grupos de Diferenciación
Células NK	Células Asesinas Naturales.
DAG	Diacil Glicerol
DD	Dominio de Muerte.
DEP	Partículas Extraídas de Diesel
DES	Dietil-Estilbesterol.
dsRNA	Proteína Serina/Treonina Quinasa Activada por RNA de doble cadena.
ECSIT	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate, por sus siglas en inglés
EhHA	Abscesos Hepáticos producidos por <i>E. histolítica</i> .
EHP	Bis (2-ethylhexyl) phthalato.
FEC-1	Factor Estimulante de Colonias 1.
FIAML	Factor inhibidor de la Activación de Macrófagos de Linfoma.

GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos.
GPI	Glicofosfatidilinositol.
h	hora/s
i.p.	Intra peritoneal
IFN- γ	Interferón γ
IFN-gama	Interferon gamma.
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β .
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6.
IL-8	Interleucina 8.
IL-10	Interleucina 10.
IL-12	Interleucina 12.
IL-12	Interleucina 12.
IL-18	Interleucina 18.
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa inducible.
IP3	Fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato.
IRAK	IL-1R–asociada a quinasa treonina serina
INR	Intermediarios de Nitrógeno Reactivo
IOR	Intermediarios de Oxígeno Reactivo
JNK	c-Jun N-quinasa terminal
KDa	Kilo Daltones
KDO	ketodeoxyoctulosonic acid.
LALC	líquido de ascitis libre de celulas.
LBP	Proteína de unión a LPS.
LmHA	Abscesos Hepáticos producidos por L. monocytogenes.
L-NIL	L-N (6)-(1-iminoethyl)-lysina.
LBP	Proteínas de Unión al LPS
LPS	Lipopolisacáridos
LRR	Receptores Regulatorios de Leucocitos .

MAIF	Factor Inhibidor de la Activación de Macrófagos.
MAL	Maackia amurensis leukoagglutinin
MAP	Proteína Activada Mitogénica
MAPKK	Proteína Quinasa Quinasa activada mitogénica protein
McF	patrones del nefelómetro de Mc Farland
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos.
MEKK1	Proteína Quinasa Mitogénica Extracelular
mg	miligramos
min	minutos
MIP- α	Proteínas de la inflamación de macrófagos α .
ml	mililitros
mM	Milimolar
MyD88	Factor de Diferenciación Mieloide 88
NF-kB	Factor Nuclear kappa Beta.
nm	Nanometros
nM	Nanomoles
NO	Óxido Nítrico
NOS ₂	Óxido Nítrico sintasa 2
NP	p-nitrofenol
°C	Grados Centígrados
PBS	Buffer Fosfatos-Salina.
PC-PLC	PLC específica de fosfatidilcolina.
PGE ₂	prostaglandina E ₂ .
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
PI-PLC	PLC específica de fosfatidilinositol.
PKR	RNA-dependent protein kinase R
PLC	fosfolipasa C.
TAB2	adaptor protein 2
TAK-1	Factor- β -activated kinase 1
TGF- β	Factor de Crecimiento Tumoral β .

TGF- β 1	Factor de crecimiento tumoral β 1.
TGF- β 3	Factor de crecimiento tumoral β 3.
TGF- β 2	Factor de crecimiento tumoral β 2.
TIR	<i>Dominio homologo</i> Toll/IL-1R.
TIRAP	Proteína adaptada al dominio contenedor de TIR
TLR	Toll-like receptor.
TLR4	Receptor 4 Toll-like
TLRs	Receptores Toll-like
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α .
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral. - α .
U	Unidades.
UFC	Unidad Formadora de Colonia.
UIAM	Unidad de Inhibición de la Activación de Macrófagos.
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.
Xg	Centrifugación relativa.
μ g	microgramos.
μ M	Micromoles.

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Papel Central de la Activación de los Macrófagos.	10
2. Estructura Esquemática del LPS.	12
3. Estructura Química del Lípido A.	12
4. Vías de señalización por el receptor de LPS.	14
5. La glicoproteína CD14. anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI).	15
6. Reconocimiento y Vías de Señalización del LPS y el Lípido A	15
7. Micrografía de Fluorescencia que muestra macrófagos infectados con <i>L. monocytogenes</i>	25
8. Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	28
9. Laparatomía Exploratoria en un ratón BALB/c	48

10. Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1 de <i>E. histolytica</i> .	51
11. Abscesos Hepáticos Amibianos en ratones BALB/c.	54
12. Abscesos Hepáticos Piógenos en ratones BALB/c.	58
13. Vista microscópica de los hígados de ratones BALB/c 4 días después de la inoculación con <i>L. monocytogenes</i> .	59

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
I. Productos secretados por los macrófagos.	9
II. Curva estándar de seroalbúmina bovina (SAB).	44
III. Curva estándar de Glucosa.	45
IV. Obtención del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> para el desarrollo del AHE en ratones BALB/c.	52
V. Comparación de los AHE con <i>E. histolytica</i> administrada por vía intrapertoneal.	55
VI. Comparación de los AHE con <i>E. histolytica</i> administrada por vía <i>subcutánea</i> .	56
VII. Comparación de los AHE con <i>L monocytogenes</i> administrada por vía intraperitoneal.	60
VIII: Comparación de los AHE con <i>L monocytogenes</i> administrada por vía <i>subcutánea</i> .	61

CAPITULO 10

10. LITERATURA CITADA

- Abbas A, Lichtman A. 2004. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Saunders Elsvier, USA ; pp. 243-274.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. 1991. Capítulo “Cells and tissues of immune system”. En *Cellular and Molecular Immunology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia. 223-283.
- Acevedo A.J., Pacheco-Yépez J., Serrano-Luna J., Espinosa-Cantellano M., Tsutsumi V. and Shibayama M. 2000. Experimental Amebic Liver Abscess: In Vivo Localization of TNF- α . *Arch. Med. Res.* 31:S98-S100.
- Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406:782-787.
- Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M y Miyake K. 2000. Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 164: 3471-3475.
- Akira, S., Takeda, k. y Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680.
- Antonini JM, Roberts JR, Clarke RW, Yang HM, Barger MW, Ma JY, Weissman DN. 2001. Effect of age on respiratory defense mechanisms: pulmonary bacterial clearance in Fischer 344 rats after intratracheal instillation of *Listeria monocytogenes*. *Chest* 120:240-249.
-
- Asseman C, Pancre V, Quatennens B, Auriault C. Schistosoma mansoni-infected mice show augmented hepatic fibrosis and selective inhibition of liver cytokine production after treatment with anti-NK1.1 antibodies *Immunol Lett.* 1996 Dec 1;54(1):11-20.
- Barton GM, Medzhitov R. 2002. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol.* 270:81-92.
-

- Beckerman KP, Rogers HW, Corbett JA, Schreiber RD, McDaniel ML, Unanue ER. 1993. Release of nitric oxide during the T cell-dependent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 150:888-95.
- Berdeli A, Akisu M, Dagci T, Akisu C, Yalaz M, Kultursay N. 2004. Meconium enhances platelet-activating factor and tumor necrosis factor production by rat alveolar macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 71:227-32.
- Bi YC, Yang LJ, Dong SZ, Fan QY, Zhang DZ. 2005. Anti-tumor immune response in vitro induced by fusion of Tca8113 cells with macrophages. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 40:314-8.

Blanot S, Joly M M, Vilde F. 1997. A Gerbil Model for Rhomboencephalitis Due to *Listeria monocytogenes*. *Microb Path* 23: 39-48.

- Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. 2005. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76:1-18.
- Bogdan C, Paik Y, Vodovotz y Nathan C. 1992. Contrasting mechanism for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin 10. *J.Biol.Chem.* 267: 23301-23309.
- Boockvar KS, Granger DL, Poston RM, Maybody M, Washington MK, Hibbs JB, Kurlander RL. 1994. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect. Immun.* 62:1089-100.
- Bruchhaus I, Roeder T, Lotter H, Schwerdtfeger M, Tannich E. 2002. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microbiol.* 44:1063-1072.
- Bruckmaier RM. 2005. Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Res.* 72:120-4.
- Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. 1997. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 27:756-62.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., y Arditi, M. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* 167: 987-994.

- Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J y Volpe F. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell. Biol.* 2:346-351.
- Campbell D, Chadee K. 1997. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: Modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitol Today.* 13:184-190.
- Celada A y Schreiber SR. 1986. Role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon-gamma. *J. Immunol.* 137: 2373-2379.
- Celada, A. 1994. En “*Inmunología Básica*”, Labor S. A., Barcelona 100-104
- Celada, A. y Nathan, C.F. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today.* 15:100-102.
- Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. 1995. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Murine Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995; 63: 736-40.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175: 1111-22.
- Cheung DL y Hamilton JA. 1992. Regulation of human monocyte DNA synthesis by colony-stimulating factors, cytokines, and cyclic adenosine monophosphate. *Blood.* 79: 1972-1981.
- Chino A, Sakurai H, Choo MK, Koizumi K, Shimada Y, Terasawa K, Saiki I. 2005. Juzentaihoto, a Kampo medicine, enhances IL-12 production by modulating Toll-like receptor 4 signaling pathways in murine peritoneal exudate macrophages. *Int Immunopharmacol.* 5:871-82.
- Coffee KA, Halushka PV, Wise WC y Cook JA. 1990. Altered responses to modulators of guanine nucleotide binding protein activity in endotoxin tolerance. *Biochem. Biophys. Acta.* 1035: 201-205.
- Coughlin RT, Tonsager S; McGroarty EJ 1983. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1983, 22, 2002-7.
- Cruz-Vega DE, Campos-Gongora E, Said-Fernandez S, Gonzalez-Garza MT. 1997. Determination of the antiamebic effect of a metronidazole/gossypol blend. *Arch Med Res.* 28 Spec No:300-1.
- Dahle MK, Overland G, Myhre AE, Stuestol JF, Hartung T, Krohn CD, Mathiesen O, Wang JE, Aasen AO. 2004. The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B

signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun.* 72:5704-11.

- Daniel-Issakani SA, Spiegel M y Strulovici B. 1989. Lipopolisaccharide response is linked to the GTP binding protein, Gi 2, in the promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.* 264: 20240-20247.

Denis M, Chadee K. 1989. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun.* 57:1750-1756.

- Denis M and Ghadirian E. 1992. Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.* 12:193-198.

Ebe Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida Naito M. 1999. The Role of Kupffer Cells and Regulation of Neutrophil Migration Into the Liver by Macrophage Inflammatory Protein-2 in Primary Listeriosis in Mice. *Pathol Int* 49: 519-532.

-
- Eckmann L, Reed SI, Smith JR y Kagnoff. 1995. *Entamoeba histolytica* induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1-alpha. *J. Clin. Invest* 96:1269-1279.

Edelson B, Cossart P, Unanue R. 1999. Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to *Listeria* Infection. *J Immunol* 163: 4087-4090.

- Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol.* 25:827-39.
- Ellis CA, Aitken A, Takayama K y Qureshi N. 1987. Substitution of phosphatidylserine by lipid A in the activation of purified rabbit brain protein kinase C. *FEBS Lett.* 218: 238-242.
- Emoto M, Emoto Y and Kaufman SH. 1995. Interleukin-4 producing CD4+ NK1.1+ TCR alpha/beta intermediate liver lymphocytes are down-regulated by *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* 25:3321-3325.

Emoto Y, Emoto M, Kaufmann S H E. 1997. Transient Control of Interleukin-4 Producing Natural Killer T Cells in the Livers of *Listeria monocytogenes* Infected Mice by Interleukin-12. *Infect Immun* 65: 5003-5009.

- Engler KL, Rudd ML, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. 2005. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta. *J Neuroimmunol.* 160:87-91.

- English BK, Ihle JN, Myracle A y Yi T. 1993. Hck tyrosine kinase activity modulates tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Exp. Med.* 178: 1017-1022.

Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A.2002. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.*13:318-331.

- Fehr T, Schoedon G, Odeermatt B, Holtschke T, Schneermann M, Bachmann MF, Mak TW, Horak I, Sinkernage M. 1997. Crucial role of interferon Consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J Exp Med* 185: 921-931,
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermot EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint B, Dunne A, Gray P y Harte MT. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* 413: 78-83.
- Fleming SD and Campbell PA. 1996. Macrophage have cell surface IL-10 that regulates macrophage bactericidal activity. *J. Immunol.* 156:1143-1150.

Fleming S D, Campbell, P.A. 1997. Some Macrophages Kill *Listeria monocytogenes* While Others Do Not. *Immunol Rev* 158: 69-77.

- Fujihara M, Connolly N, Ito N y Suzuki, T. 1994. Properties of protein kinase C isoforms (betaII, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J. Immunol.* 152: 1898-1906.

Gahan CG, Barrett JR, O'Brein MG, O'Sullivan GC, Shanaban F, Collins JK. 1997. Innate resistance to *Listeria monocytogenes* in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol* 62:726-32.

-

Gaillard J L, Jaubert F, Berche P. 1996. The *inlAB* Locus Mediates The Entry of *Listeria monocytogenes* Into Hepatocytes In Vivo. *J Exp Med* 183: 359-369.

Geginat G, Lalic M, Kretschmar M, Goebel W, Hof H, Palm DBubert . 1998. A. Th1 Cells Specific for a Secreted Protein of *Listeria monocytogenes* Are Protective in Vivo. *J Immunol* 160: 6046-6055.

- Ghadirian E and Denis M. 1992. In vivo activation of macrophages by IFN-gamma to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. *Parasite-Immunol.* 14:391-404.
- Ghadirian E and Kogshavn PAL. 1984. Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite. Immunol.* 6:349-354.

- Ghadirian E and Salimi A. 1993. In vitro effect of recombinant interferon gamma in combination with LPS on amoebicidal activity of murine Kupffer cells. *Immunobiology*. 188:203-219.
- Ghadirian E, Bout DT. 1988a. In vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites by interferon-gamma-activated mouse macrophages. *Immunobiology*. 176:341-53.
- Ghadirian E, Kongshavn PA. 1988b. Activation of macrophages by *Entamoeba histolytica* extracts in mice. *Microb Pathog*. 5:63-70.
- Goh KC, deVeer MJ y Williams BR. 2000. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J*. 19: 4292-4297.
- Gold D, Kagan. 1978. Susceptibility of various strain of mice to *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol*. 64:937-938.
- Gold D, Kagan. 1989. Delayed-type hypersensitivity to *Entamoeba histolytica* in mice and hamsters a comparasion. *Parasitol.Res* 75:335-342.
- González-GarzaMT, Castro-Garza J, Anaya-Velazquez F, Mata-Cárdenas BD, Lozano-Garza G, Carranza-Rosales MP, Vargas-Villarreal J y Said- Fernández S. 1996. Anti-amoebic effect of gossypolin golden hamsters with experimental hepatic amoebic abscess. *Pharmaceut. Sci*. 2:153-156.
- Gregory SH; Wing EJ, Hoffman RA, Simmons RL. 1993. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *J Immunol*. 150:2901-9.
- Gruden-Movsesijan A, Milosavljevic LS. 2005. The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Vet Immunol Immunopathol*. (Epub ahead of print)
- Haak-Frendsscho, Brown JF, Ilzawa Y, Wagner RD and Czuprynski CJ. Administration of anti IL-4 monoclonal antibody 11B11 increase the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol*. 1992; 148:3978-3985.
- Hamilton, T.A., y Adams, D.O. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today*. 8: 151-158.
- Han YJ, Kwon YG, Chung HT, Lee SK, Simmons RL, Billiar TR, Kim YM. 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide*. 5:504-13.
- Hartree EP. 1972. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 48: 670.

- Hauf N, Goebel W, Serfling E, Kuhn M. 1994. *Listeria monocytogenes* Infection Enhances Transcription Factor NF-kappaB in P388D 1 Macrophage -like Cells. *Infect Immun* 62: 2740-2747.
- Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, McClintock P, Reid Y. 1992. Catalogue of Cell Lines Hybridoma. 7a. Ed. American Type Collection. USA, 168.
- Haas A, Brehm K. 1993. Superoxide Dismutases and Catalases Biochemistry, Molecular Biology and Some Biomedical Aspects. *Genet Eng Biotechnol* 13: 243-269.
- Haschtmann D, Gerber HJ, Mielke ME. 2005. Cytotoxic activity of murine resident peritoneal cells against *Listeria monocytogenes*-infected hepatocytes in vitro *Microbes Infect* 7:1177-1183.
- Heo SK, Ju SA, Lee SC, Park SM, Choe SY, Kwon B, Kwon BS, Kim BS. 2005. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM *J Leukoc Biol*. Nov 7[Epub ahead of print].
- Hibbs JB, Tantor RR, Vavrin Z. 1987a. Macrophage Cytotoxicity Role for L-arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science*. 235:473-6.
 - Hibbs JB, Vavrin Z, Tantor RR. 1987b. L-arginine is Required for Expression of the Activated Macrophage Effector Mechanism Causing Selective Metabolic Inhibition in Target Cells. *J. Immunol.* 138: 550-65.
- Hiemstra P S, Van den Barselaar M T, Roest M, Nibbering P H, Van Furth R. 1999. Ubiquicidin, a Novel Murine Microbicidal Protein Present in the Cytosolic Fraction of Macrophages. *J Leuk Biol* 66: 423-428.
- Hodge, J.E., and Hofreiter, B.T. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates p 380. *In: Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol 1. (R.L Whistler and M.L Wolfrom Eds) Academic Press, New York.
 - Horng T, Barton GM y Medzhitov R. 2001. TIRAP, an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2: 835-84.
 - Hubbard NE, Lim D, Mukutmoni M, Cai A, Erickson KL. 2005. Expression and regulation of murine macrophage angiopoietin-2. *Cell Immunol.* 234:102-9.
 - Hume DA y Denkins YM. 1989. Activation of macrophages to express cytotoxic activity correlates with inhibition of their responsiveness to macrophage colony-stimulating factor (CSF-1): involvement of a pertussis toxin-sensitive reaction. *Immunol. Cell Biol.* 67: 243-249.

- Imai K, Takeshita A y Hanazawa S. 2000. Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect. Immun.* 68: 2418-2423.
- Ishiguro T, Naito M, Yamamoto T, Hasegawa G, Gejyo F, Mitsuyama M, Suzuki H, Kodama T. 2001. Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Am J Pathol.* 158:179-88.
- Ito S, Ishii KJ, Gursel M, Shirotra H, Ihata A, Klinman DM.. 2005. CpG oligodeoxynucleotides enhance neonatal resistance to *Listeria* infection. *J Immunol.*174:777-82.
- Iyengar RD, Stuehr DJ, Marletta MA. 1987. Macrophage Synthesis of Nitrite, Nitrate and N-nitrosamines: Precursors and Role of the Respiratory Burst. *Pro. Natl. Academ. Sci. USA.* 84: 6369-73.
- Jakway JP y DeFranco AL. 1986. Pertussis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *Science.* 234: 743-746.
- Janssens S, Beyaert R. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 16:637-46.
-
- Kannenberg, E. L.; Carlson, R. W. 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* 39: 379-91.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K y Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11: 115-122.
- Kayal S, Lilienbaum A, Poyart C, Memet S, Israel A, Berche P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 1999: 31:1709-22.
- Kehrl JW, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB y Fauci AS. 1986. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* 137:3855-3860.
- Kelly JP and Bancroft GJ. 1996. Administration of Interleukin-10 abolishes innate resistance to *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* 26:356-364.
- Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. 2004. Prevotella intermedia lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res.* 39:424-31.

- Kobayashi F, Ishida H, Matsui T, Tsuji M. Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection. *J Vet Med Sci.* 2000 Jun;62(6):583-7.
- Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, Ghosh S. 1999. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* 13:2059-7.

Kretschmer, R.R..1996. [Impact of new methods on the study of parasites. VI. Could the eosinophil play a role in amebiasis? (in Spanish)]. *Gac. Méd. Méx.* 132: 492-495.

Lecuit M. A 2001. Transgenic Model for Listeriosis; Role of Internalin in Crossing the Intestinal Barrier. *Science*; 292: 1722-1725.

- Lecuit M, Cossart, P. Genetically-modified-animal Models for Human Infections; the Listeria Paradigm. 2002. *TRENDS Mol Med* 8:537-542.
- Leturco, D. J., A. M. Moriarty, G. Talbott, R. K. Winn, T. R. Martin, R. J. Ulevitch. 1996. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J. Clin. Invest.* 98:1533-8.
- Li J y Aderem A. 1992. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates. *Cell.* 70: 791-801.
- Lin JY and Chadee K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148:3999-4005.
- Lin JY, Seguin R, Keller K and Chadee K. 1994. Tumor Necrosis Factor Alpha Augments Nitric Oxide-Dependent Macrophage Cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by Enhanced Expression of the Nitric Oxide Synthase Gene. *Infect. Immun.* 62:1534-1541.
- Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. 1995. Transforming growth factor-beta 1 primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. *Immunology.* 85:400-7.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75.
- Madigan M. T, Martinko J. M, Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*, 8th ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, 67-87

- Madigan MT; Martinko J M; Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*, 8th ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1997. 110-128
 - Malefyt W, Hannen J, Spits H, Roncarolo MG, Te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H and Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174:915-924.
 - Martin LA, Pingle SC, Hallam DM, Rybak LP, Ramkumar V. 2002. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits LPS-stimulated TNF- α release by reducing calcium-dependent activation of NF- κ B and ERK1/2. *J Pharmacol Exp Ther.* In Press
 - Martinez-Gigena MP, Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Martinez-Palomo A. 1992. Histological changes during healing of experimental amebic liver abscess treated with metronidazole. *Arch Med Res.* 23:209-12.
 - Meerovich E and Chadee K. 1988. *In vivo* models for pathogenicity in amebiasis. In: Ravdin JL, edutor. *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica.* New York: Jhon Wiley & Sons, p. 177.
 - Mielke MEA, Ehlers S and Hahn H. 1993. The Role of Cytokines in Experimental Listeriosis. *Immunobiol.* 189:285-315.
 - Miethke, T., C. Wahl, K. Heeg, B. Echtenacher, P.H. Krammer, and H. Wagner. 1992. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 175:91-98.
- Miller R, Britigan, B.E. 1997. Role of Oxidants in Microbial Pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* :10: 1-18.
- Miyata H, Himeno K, Miake S, Nomoto K. 1981. Alterations of host resistance to *Listeria monocytogenes* in tumour-bearing mice and the effect of *Corynebacterium parvum*. *Immunology.* 44:305-10
 - Montroni M, Monforte AD. 2003. Genotypic resistance tests for the management of structured therapeutic interruptions after multiple drug failure. *Scand J Infect Dis Suppl.* 106:79-81.
 - Muhl H, Dinarello CA. 1997. Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. *J Immunol.* 159:5063-9.
 - Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M y Mantovani A. 1998b. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation

upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* 187: 2097-2101.

- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvenssen GS, y Dixit VM. 1998a. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273: 2926-2930.

Mwangi EK, Stevenson P, Ndung'u JM, Stear MJ, Reid SW, Gettinby G, Murray M. 1998. Studies on host resistance to tick infestations among trypanotolerant *Bos indicus* cattle breeds in east Africa. *Ann N Y Acad Sci.* 849:195-208

-
- Nathan CF and Hibbs JB. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunol.* 3:65-70.
- Nathan, C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- Neal RA, Harris WG. 1975. Proceedings: Attempts to infect inbred strains of rats and mice with *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 69:429-30.
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z y Matsumoto K. 1999. The kinase TAK-1 can activate the NIK- κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.* 398: 252-256.
- Novotney M, Chang Z, Uchiyama H y Suzuki T. 1991. Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochem.* 30: 5597-5604.
- O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW y Mui AL. 1998. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanism: evidence for Stat-3-dependent and-independent pathways. *EMBO J.* 17: 1006-1018.
- Ogawa R, Pacelli R, Espey MG, Miranda KM, Friedman N, Kim SM, Cox G, Mitchell JB, Wink DA, Russo A. 2001. Comparison of control of *Listeria* by nitric oxide redox chemistry from murine macrophages and NO donors: insights into listeriocidal activity of oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 30:268-276.
- Oh YK, Swanson JA. 1996. Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J Cell Biol.* 132:585-93.

Ohya S, Tanabe Y, Makino M, Nomura T, Xiong H, Arakawa M, Mitsuyama M. 1998a. The Contributions of Reactive Oxygen Intermediates and Reactive Nitrogen Intermediates to Listericidal Mechanisms Differ in Macrophages Activated pre- and Postinfection. *Infect Immun* 66: 4043-4049.

Ohya S, Xiong H, Tanabe Y, Arakawa M, Mitsuyama M. 1998b. Killing Mechanisms of *Listeria monocytogenes* in Activated Macrophages as Determined by an Improved Assay System. *J Med Microbiol* 47: 211-215.

- Palacios-Corona R. Identificación del factor inhibidor de la activación de macrófagos peritoneales presente en el líquido de ascitis del tumor murino L5871Y. 1996. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias Biológicas. UANL.
- Palacios-Corona R., Ortiz-Navarrete V.F., Said-Fernández S., Rodríguez-Padilla C. and González-Garza M.T. 1999. Detection of a Factor Released by L5178Y Lymphoblasts That Inhibits Mouse Macrophage-Activation Induced by Lipopolysaccharides. *Arch. Invest. Med.* 30: 298-302.
- Paul A, Pendreigh RH y Plevin R. 1995. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 114: 482-488.
- Peiser L, Gough PJ, Kodama T, Gordon S. 2000. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun.* 68:1953-63.
- Pfaff AW; Kirch AK; Hoffmann WH; Banla M; Schulz-Key H; Geiger SM; Soboslay PT. 2003. Regulatory effects of IL-12 and IL-18 on *Onchocerca volvulus*- and *Entamoeba histolytica*-specific cellular reactivity and cytokine profiles. *Parasite Immunology*, , 25:325-332(8)
- Portnoy DA. 1992. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr. Opin. Immunol.* 4:20-24.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. 2001. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol.* 167:5067-76.
- Ravdin JI, Murphy CF, Schlesinger PH. 1988. The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* 35:159-63.
- Remer KA, Jungi TW, Fatzer R, Tauber MG, Leib SL. 2001. Nitric oxide is protective in listeric meningoencephalitis of rats. *Infect Immun* 69:4086-4093.
- Rivero-Nava L, Aguirre-García J and Calderon J. 1997. Production of Amebic Intestinal Lesions in BALB/c Mice. *Arch. Med. Res.* 28: (Supl.):220-222.

Rogers H W, Callery M P, Deck B, Unanue E R. 1996. *Listeria monocytogenes* Induces Apoptosis of Infected Hepatocytes. *J Immunol* 156: 679-684.

Roitt, I., Brostoff J y Male D. 2001. *Immunology* Mosby. New York. pp 148-157

- Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane, HC y Fauci AS. 1986. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J. Immunol.* 136: 3916-3920.
 - Rossi A, Acquaviva AM, Iuliano F, Di Paola R, Cuzzocrea S, Sautebin L. 2005. Up-regulation of prostaglandin biosynthesis by leukotriene C4 in elicited mice peritoneal macrophages activated with lipopolysaccharide/interferon- γ . *J Leukoc Biol.* 78:985-91.
 - Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cardenas B, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez Rodríguez H. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Arch. Invest. Méd.* 82:249-253.
 - Salata RA, Martínez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Treviño N, Segovia ES, Murphy CF and Ravdin JI. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J. Immunol.* 136:2633-2641.
 - Salata RA, Murray HW, Rubin BY and Ravdin JI. 1987. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 72-78.
 - Salata RA, Pearson RD and Ravdin JI. 1985. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophages. *J. Clin. Invest.* 76:491-499.
 - Salimi A and Ghadirian E. 1993. Effect of recombinant tumor necrosis factor alpha on *in vitro* amoebicidal activity of murine kupffer cells. *Microb. Pathog.* 14:261-274.
- Salles J, Moraes L, Costa M. 2003. Hepatic amebiasis. *Brazilian J Infect Dis.* 7:96-110.
- Salyers AA and Whitt DD. 1994. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach.* American Society for Microbiology. Washington, pp. 182-189, 229-239.
 - Sánchez de la Rosa E, Rodríguez Hernández N. 2001. Interleucina-12 Vs Enfermedades Infecciosas. *Rev Cubana Med* 40:118-21
 - Sánchez-Ramírez, B.E., Ramírez-Gil, M., Vázquez-Moctezuma, I., Ramos-Martínez, E., and Talamás-Rohana, P. 2004. Cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters. *Exp. Parasitol.* 106:119-125.
 - Schutheis RJ and Keams RJ. 1990. *In vivo* administration of anti-asialo-GM1 antibody enhances splenic clearance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Immun. Cell. Growth Regul.* 9:376-386.

- Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. 1997. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun.* 65:2522-7.
 - Sehgal D, Bhattacharya A and Bhattacharya S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci.* 21:423-432.
 - Seydel KB, Li E, Swanson PE y Stanley SL Jr. 1997 Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to Infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect. Immun.* 65:1631-1639.
- Seydel K, Smith S, Stanley S. 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun.* 68:400-402.
- - Seykora JT, Ravetch JV y Aderem A. 1991. Cloning and molecular haracterization of the murine macrophage “68-kDa” protein kinase C substrate and its regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2505-2509.
 - Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S y Van Dyke TE. 1994. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL- 1β production by human monocytes. *J. Immunol.* 153: 1818-1824.
- Shen H, Tato C M, Fan X. 1998. *Listeria monocytogenes* as a Probe to Study Cell-Mediated Immunity. *Curr Opi Immunol* 10: 450-458.
- Shibayama M., Campos-Rodríguez R., Ramírez C., Pacheco-Yépez J. and Tsutsumi V. 2000. Studies on the Natural Immunity in Hamsters Using the Intraperitoneal Model of Amebic Liver Abscess. *Arch. Med. Res.* 31;S78-S79.
 - Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 1999;10:29-38.
 - Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, y Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolisaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189: 1777-1782.
 - Small PLC, Ramakrishnan L, Falkow S. 1994. Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science* 263: 637-639.
 - Stanley, S. 2001. Protective immunity to amebiasis: new insights and new challenge. *J Infect Dis.* 184:504-506.

- Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB y Horak ID. 1993. Lipopolisaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56 lyn. *J. Biol. Chem.* 268: 20725-20728.
- Stern JJ, Grabill R and Drutz DJ. 1984. Murine amebiasis: the role of the macrophages in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:372-380.
- Strassmann G, Bertolini DR and Eidelman O. 1991. Inhibition of murine reactions in vivo by liposome associated transforming growth factor (TGF) type beta 1. *Clin Exp. Immunol.* 86:532-536.
- Stuehr DJ, Marletta MA. 1985. Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to *Escherichia coli* Lipopolysacchride. 82: 7738-42.
- Stuehr DJ, Marletta MA. 1987. Induction of Nitrite/ Nitrate Synthesis in Murine Macrophages by BCG Infection, Lymphokines, or Interferon-. *J. Immunol.* 139: 518-25.
- Sweet, M.J., y Hume, D.A. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60: 8-26.
- Swierczynski B á M.-H. Bessieres á S. Cassaing S. Guy á I. Oswald á J.P. Seguela á B. Pipy. 2000. Inhibitory activity of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies on *Toxoplasma gondii* proliferation in mouse peritoneal macrophages cocultured with splenocytes from infected mice. *Parasitol Res* 86: 151-157.
- Szuro-Sudol A, Murray HW, Nathan CF. 1983. Suppresion of macrophage antimicrobial activity by a tumor cell product. *J. Immunol.* 131:384-387.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:335-76.
-
- Taniuchi S, Masuda M, Fujii Y, Izawa K, Kanegane H, Kobayashi Y. 2005. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Haematologica.* 90:1271-2.
-
- Thompson JE, Fortalenza S, Verma R. 1985. Amebic liver abscess: a therapeutic ap-proach. *Rev Inf Dis.* 7: 171-179
-
- Treviño MLC, Tsutsumi V and Martínez-Palomo A. 1990. The role of macrophages and T lymphocytes: the guinea pig's resistance to hepatic amebic infection. *Arch. Invest. Med.* 21:81-84.
- Tripp CS, Wolf SF and Unanue ER. 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon-gamma production by natural killer cells in

severe combined immunodeficiency mice with listeriosis and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3725-3729.

- Trissl D. 1982. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal host. *Rev Infect Dis.* 4:1154-1184
 - Tsutsumi V, Martinez-Palomo A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol.* 130:112-119.
 - Tsutsumi V. 1994. Los modelos experimentales *in vivo* en la amibiasis. *Gac. Med. Mex.* 130:450-453.
 - Tzung SP, Cohen SA. 1991. Endogenous interferon alpha/beta produced by Kupffer cells inhibits interleukin-1, tumor necrosis factor alpha production and interleukin-2-induced activation of nonparenchymal liver cells. *Cancer Immunol Immunother.* 34:150-6.
 -
 - Uetani K, Der SD, Zamanian-Daryoush M, de la Motte C, Lieberman B., Williams BR y Erzurum S.C. 2000. Central role of double-stranded RNA-activated protein kinase in microbial induction of nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 165: 988-996.
 - Ulevitch, R.J., y Tobias, P.S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13 :437-457.
 - Underhill, D.M., Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 103-110.
 - Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., y Aderem, A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophagephagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401: 811-815.
 - Valatas V, Kolios G, Manousou P, Notas G, Xidakis C, Diamantis I, Kouroumalis E. 2004. Octreotide regulates CC but not CXC LPS-induced chemokine secretion in rat Kupffer cells. *Br J Pharmacol.* 141:477-87.
- Ventura-Juarez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, Pineda-Vazquez A, Munoz-Fernandez L, Madrid-Reyes JI, Campos-Rodriguez R 2003. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells *Parasite Immunol.* 25:503-11.
- Viriyakosol y Kirkland. 1995. A region of human CD14 required for lipopolysaccharide binding. *J Biol Chem.* 270:361-8.
 - Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW y Nathan,C. 1993. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor-b. *J. Exp. Med.* 178: 605-613.

- Vohra H, Kaur U, Sharma AK, Bhalla V, Bhasin D. 2003. Effective human defense against *E. histolytica*: high amoebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. *Parasitol Int.* 52:193-202.
 - Wadsworth SL and H Goldfine. 1999. *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect Immun.* 67:1770-1778.
 - Wagner RD, Maroushek NM, Brown JF, Czuprynski CJ. 1994. Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect Immun.* 62:2345-53.
 - Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmidt JA, Hall G, Roberts AB. 1988. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 140: 3026-3032.
 - Walker SL, Redman JA, Elimelech M. 2004. Role of Cell Surface Lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport. *Langmuir.* 20:7736-46.
 - Walsh JA. 1986. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Inf Dis.* 8: 228-238.
- Wang W, Keller K, Chadee K. 1992. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun.* 60:3169-174.
- Wang W, Chadee K. 1992b. *Entamoeba histolytica* alters arachidonic acid metabolism in macrophages in vitro and in vivo. *Immunology.* 76:242-50.
- Wang W, and Chadee K. 1995. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect. Immun.* 63:1089-94.
 - Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke K, DeFranco AL, Pelech SL. 1992. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* 267:14955-62.
 - Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA y Lee ME. 2000. Transforming growth factor (TGF)-Beta1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J. Biol. Chem.* 275: 36653-36658.

Wu QL, Feng YH, Yang YF, Liu J, Zhou WL, He PL, Zhou R, Li XY, Zou JP. 2004. Kinetics of the phenotype and function of murine peritoneal macrophages following acute inflammation. *Cell Mol Immunol.* 1:57-62

WHO Meeting. Amoebiasis and its control. *Bull WHO* 1985; 63: 417–426.

- - WHO/PAHO/UNESCO report. 1997. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, *Epidemiol Bull.* 18:13-4.
 - Xaus J, Cardo M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J y Celada A. 1999b. Interferon gamma induces the expression of p21 waf1 and arrests macrophage cell cycle that prevents induction of apoptosis. *Immunity.* 11: 103-113.
 - Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada A. 2000. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 95:3823-31.
 - Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R y Celada A. 1999a. IFN- γ up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* 162: 3607-3614.
 - Xaus J, Valledor AF, Cardo M, Marques L, Beleta J, Palacios JM y Celada A. 1999c. Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27 Kip1 expression. *J. Immunol.* 163: 4140-4149.
 - Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. 2005. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J UOEH.* 27:1-10.
 - Yamate J, Machida Y, Ide M, Kuwamura M, Sawamoto O, LaMarre J. 2004. Effects of lipopolysaccharide on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in cisplatin-induced rat renal injury. *Exp Toxicol Pathol.* 56:13-24.
 - Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S y Kolesnick R. 1995. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature.* 378:307-310.
- Yang HM, Antonini JM, Barger MW, Butterworth L, Roberts BR, Ma JK, Castranova V, Ma JY. 2001. Diesel exhaust particles suppress macrophage function and slow the pulmonary clearance of *Listeria monocytogenes* in rats. *Environ Health Perspect.* 109:515-21
- Zhang J, Zhu J, Bu X, Cushion M, Kinane TB, Avraham H, Koziel H. 2005. Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages. *Mol Biol Cell.* Feb;16(2):824-34.

- Zhang X y Morrison DC. 1993. Pertussis toxin-sensitive factor differentially regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150: 1011-1018.