



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Departamento de Morfología

Neuroinmunomodulación en amibiasis hepática en hámster

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

Presenta:

LAQB. Martín Humberto Muñoz Ortega

Directores de Tesis:

Dr. Javier Ventura Juárez

Departamento de Morfología, UAA

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Departamento de Fisiología y Farmacología, UAA

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Mario García Lorenzana

Departamento de Biología de la Reproducción, UAM- Iztapalapa

Aguascalientes, Ags., julio 2010



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags. A 28 de junio de 2010.

Dr en C. Francisco Javier Álvarez Rodríguez,
Decano del Centro de Ciencias Básicas y presidente del
CONSEJO ACADEMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS,
Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Presente:

Por este conducto, hacemos de su conocimiento que el aspirante a Doctor en Ciencias estudiante del doctorado en Ciencias Biológicas L. A.Q.B Martin Humberto Muñoz Ortega, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado: **“Neuroinmunomodulación en amibiasis hepática en hámster”**, adicionalmente, los resultados de este proyecto fueron aceptados para ser publicados en la revista Parasite Immunology, en Inglaterra con el artículo: **“Modulation of Amebic Hepatic Abscess by the Parasympathetic System”** number PIM:-2009-0138; con lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias, de igual manera, los abajo firmantes hemos revisado el contenido de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente,

Dr Javier Ventura Juárez
Director de tesis

Dr en C. Andrés Quintanar Stephano
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Fisiol. y Farmacol.
Co-director de tesis

Vo Bo

Dr. En C. Mario García Lorenzana
Universidad Autónoma Metropolitana-I
Depto. De Biología de la Reproducción
Miembro del comité tutorial



Centro de Ciencias Básicas

**L.A.Q.B. MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) Muñoz:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulado: **“Neuroinmunomodulación en amibiasis hepática en hámster”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 20 de agosto de 2010
“LUMEN PROFERRE”
EL DECANO


DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



c.c.p.- Archivo

	P I M	1 2 4 5	B	Dispatch: 16.7.10	Journal: PIM	CE: Amsha
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 8	PE: Padma Lakshmi

Parasite Immunology, 2010, **32**, 1–8

DOI: 10.1111/j.1365-3024.2010.01245.x

Brief Definitive Report

1 Modulation of amoebic hepatic abscess by the parasympathetic system

M. -O. M. HUMBERTO,¹ Q. -S. ANDRÉS,² G. L. MARIO,³ C. -E. M. ROSARIO,¹ S. -B. MARCELO,⁴ A. -O. ARACELI,⁴ R. CAMPOS-RODRÍGUEZ,² M. G. RODRÍGUEZ² & V. -J. JAVIER¹

¹Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ²Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ³Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México Distrito Federal, México, ⁴Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, ⁵Departamento de Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México

SUMMARY

The neuro-immune network, in which the vagus nerve is involved, provides feedback between its afferent branches for signalling central nervous system from sites of injury through cytokines and its efferent branches, which release acetylcholine, an anti-inflammatory neurotransmitter. For gain insight into the parasympathetic mechanisms participating in the inflammatory response in the liver, we studied the effects of a vagotomy on the innate immune response in hamsters with amoebic liver abscess. At 7 days post-infection, compared to the control, a liver parasympathectomy resulted in a larger abscess size, a greater production of collagen fibres, fewer trophozoites, increased serum levels of IL-10 and IFN- γ and increased numbers of IL-10 and IFN- γ -positive cells in situ, with no change in the number of macrophages and NK cells. Data indicate that the vagotomy disrupted the inflammatory response, causing an increase in the response against infection, then could favour the innervation of the liver by the sympathetic nervous system and would then take the control of the immune response by stimulating the conversion of macrophages to epithelioid cells; and through increased IL-10 production would induce the hepatic stellate cells to become myofibroblast collagen producer cells, thus forming a barrier of collagen and blocking trophozoite migration.

Keywords amoebiasis, *E. histolytica*, hamster, vagotomy

Correspondence: Ventura-Juárez Javier, Avenida Universidad 940, Colonia Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes CP: 20100, Mexico (e-mail: jventur@correo.uaa.mx).
Disclosures: None.
Received: 27 December 2009
Accepted for publication: 29 June 2010

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Blackwell Publishing Ltd

INTRODUCTION

Amoebiasis is a worldwide public health problem caused by *Entamoeba histolytica*. This parasite has a great potential for invading and destroying tissues, especially in the intestine and liver. Between these two organs, the pathogenesis of an invasion by *E. histolytica* has been best described in respect to the liver (amoebic liver abscess; ALA) in both animal (1–3) and human (4,5) models.

It is well known that neutrophils and macrophages are the main defence against an *E. histolytica* invasion (1). Macrophages produce nitric oxide, an amoebicidal compound, and changes in its cytotoxic activity have been correlated with a diminished expression of the mRNA for iNOS, TNF- α and IFN- γ in organisms susceptible to an amoebic infection (6). During infection, neutrophils and macrophages are gradually replaced by epithelioid cells, which by 7 days post-infection develop a granulomatous structure. Amoebas are found within this structure between the palisade and the region of necrosis (7).

There is also a great deal of information about the mechanisms by which parasites can evade neutrophils and macrophages in susceptible organisms. For instance, amoebas release molecules that inhibit the respiratory burst (8) of neutrophils and induce their lysis by cysteine proteases, serine proteases and amoebapores (2,3,7). Moreover, it has been reported that amoebas produce the factor inhibitor of locomotion monocytes, which inhibits the chemotaxis and chemokinesis of macrophages (9).

During the immune process, cytokines are released that signal the central nervous system (CNS) by two ways, which begins the immuno-neuroendocrine interactions.

This signalling takes place by one hand, via blood until cross the blood-brain barrier; or on the other hand, the cytokines that activate the sensorial branch of the vagus nerve. Then, the CNS signals the immune system through two major mechanisms: (i) by the activation of one or more of several hypothalamic-pituitary axes (neuroendocrine axes), including the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes and (ii) by the activation of the peripheral nervous system or the autonomic nervous system (ANS), which in turn controls the immune responses (10).

The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is involved in the hormonal regulation of both the host immune response and the establishment of the parasite in the host. In terms of the immune response, androgens seem to decrease the immune response in men and estrogens seem to activate the immune response in women (11).

8 The ANS controls the immune system through two opposing mechanisms: the so-called anti-inflammatory reflex of the parasympathetic (cholinergic) system and the immune stimulating effects (10) of the sympathetic (noradrenergic) system. The immune system can also be regulated locally through the release of substance P and corticotrophin-releasing hormone (12,13) by the peripheral nerves of the CNS. All cells of the immune system have receptors for the hormones, neuropeptides and neurotransmitters hitherto described (14).

The parasympathetic nervous system (PNS) modulates the immune response at the regional level through the anti-inflammatory cholinergic vagal reflex as well as the afferent and efferent fibres in the vagus nerve. In the presence of peripheral inflammation, these fibres send signals to the brain through IL-1 receptors expressed in vagal paranglial structures (10). On the other hand, the anti-inflammatory cholinergic vagal reflex prevents the secretion of IL-1, IL-6 and TNF- α during toxic shock. Therefore, this pathway is important in preventing an excessive inflammatory response. This anti-inflammatory vagal reflex acts independently of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, released from macrophages or other cells (12,13,15).

The current work analyses the role of the PNS in modulating the immune response of vagotomized hamsters with ALA by quantifying liver polymorphonuclear cells (PMN), macrophages, NK cells, IL-10, IFN- γ and TNF- α producer cells, as well as determining IL-10, IFN- γ and TNF- α serum levels.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-six male golden hamsters (*Mesoerictetus auratus*) were divided into six groups of six animals each. There were three uninfected groups, including intact control

(IC), sham vagotomized (S-Vx) and vagotomized (Vx) animals, and three infected groups, including intact + ALA (I + A), SHAM + ALA (S + A) and vagotomized + ALA (Vx + A). Vagotomy was conducted in sterilized conditions by laparotomy, sectioning the hepatic vagal branch in a length of approximately 1 cm. All connections between the liver and the oesophagus, stomach and diaphragm were also eliminated (16). For the S-Vx, the hepatic vagal branch was only gently manipulated. The animals recovered from parasympathetic denervation surgery for 2 weeks, after which time they were inoculated with $30\text{--}40 \times 10^4$ trophozoites in the central hepatic lobe (3).

Seven days after trophozoite inoculation, animals were sacrificed; livers were dissected and weighed, and representative tissue samples were fixed in 10% neutral formalin or glutaraldehyde for histological or transmission electron microscopy studies. Tissue liver slides were stained with Haematoxylin-eosin, Masson trichromic methods (17). 4

To evaluate the cellular changes, tissue liver slides were incubated with 1.7 mg/mL of rabbit anti-human myeloperoxidase (MPO; Chemicon AB 1224) or 0.01 mg/mL mouse anti-rat CD68 (Chemicon MAB1435). Thereafter, they were incubated with goat anti-polyvalent Biotin-Streptavidin HRP (Thermo Scientific TP060-BN) for 1 h 5 6 at room temperature. The peroxidase activity was developed with diaminobenzidine. Control slides were prepared following the same protocol for each antibody, except that the primary antibody was substituted by an unspecific antibody (IgG).

NK cells were identified by immunofluorescence, applying mouse anti-rat NKR-PI antibody (Chemicon MAB3745) (0.02 mg/mL) in PBS, then incubated with a secondary goat anti-mouse antibody IgG TRITC conjugate (Sigma T5393) (100 μ M) for 1 h at 37°C. 7

Blood and tissue samples for cytokine measurements were obtained from animals of all experimental groups at three stages: (i) pre-surgery, (ii) pre-trophozoite inoculation and (iii) at 7 days post-amoebic inoculation. TNF- α (Invitrogen, KAC1751), IFN- γ (Biosource, KAC1231) and IL-10 (Biosource, KAC1322) serum levels were measured by the ELISA method. Immunohistochemical procedures were performed for TNF- α , IFN- γ and IL-10, following the protocol of Sierra Puente *et al.* (18). Briefly, rabbit polyclonal IgG antibodies were applied as primary antibodies: anti-TNF- α (sc-8301) at 2 μ g/mL; anti-IFN- γ (sc-8308) at 2 μ g/mL; and anti-IL-10 (sc-7888) at 2 μ g/mL. Afterwards, they were incubated with goat anti-polyvalent Biotin-Streptavidin HRP (Thermo Scientific TP060-BN) for 1 h at room temperature. For ELISA and immunohistochemical methods, antibodies against human interleukins were used (19). 8,9

RESULTS

Seven days after *E. histolytica* inoculation, there was a significant difference in liver weights in the three experimental groups: I + A, SHAM + A and Vx + A (5 ± 2.16 g, 8.5 ± 3.10 g and 16.75 ± 3.6 g, respectively; Figure 1C; $P < 0.05$). The histopathological liver pattern of the Vx + A group was characterized by larger abscesses as well as the presence of multiple granulomas, which

accounts for the greater liver weight. The areas surrounding the granulomas had a great quantity of collagen fibres but did not show necrosis (Figure 1F,I). In contrast, the I + A and S + A groups developed smaller abscesses with comparatively less collagen fibres around the necrotic areas (Figure 1D,E,G,H).

In the Vx + A vs. the I + A animals, there was a significantly lower quantity of amoebas in both the area of the abscess (1.5 ± 0.54 amoebas/ mm^2 vs. 5 ± 1.7 amoebas/

LOW RESOLUTION COLOR FIG

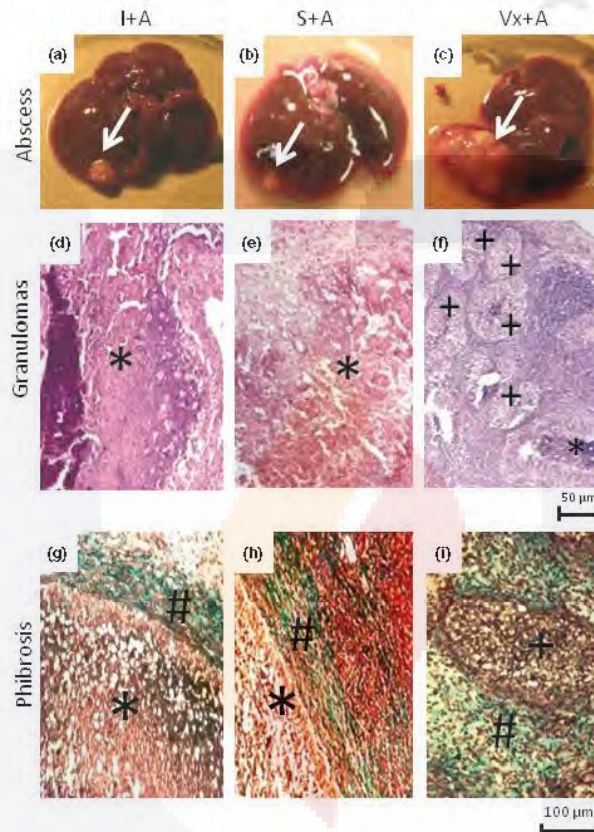


Figure 1 Amoebic abscesses 7 days post-inoculation are shown in intact (a), SHAM (b) and vagotomized (c) animals that were infected. Haematoxylin eosin stained section from intact-infected (d) and Sham-infected (e) animals showing the classical granuloma reaction (*). Note the different reaction to the amoeba infection: the multiple granuloma structures in vagotomized-infected animal (f). Observe the large abscess with necrotic areas (*) surrounded by scarce collagen fibres (#) from Intact- (g) and Sham- (h) infected animals. Slides were stained with Masson method. Picture (i) shows a typical abscess from a vagotomized and infected animal. Observe the granuloma (+) without necrotic areas and the huge amounts of collagen fibres (#) surrounding the granuloma. 14

mm²; $P < 0.01$) and its bordering zone (0.61 ± 0.42 amoebas/mm² vs. 2 ± 0.9 amoebas/mm²; $P < 0.01$). In addition, in the Vx + A animals, a distinct distribution of amoebas in the surrounding tissue was observed, with fragmented amoebas in the granuloma area and scarce inflammatory infiltrate (data not shown). In the Vx + A animals, the granuloma was composed of a great quantity of epithelioid cells around the trophozoites, whereas in the peripheral areas, cellular debris of PMN, hepatocytes and macrophages were apparent, as shown by electron transmission microscopy. In the I + A animals, there were a great number of amoebas within the necrotic areas and abundant inflammatory infiltrate on the border of the abscesses (data not shown).

Different patterns of immune cells were found in the liver abscesses of the Vx vs. the I + A animals. There was a decreased number of PMN cells in and around the abscesses in Vx + A vs. I + A animals (18 ± 3 /mm², Figure 2Aa,c, arrows, vs. 36 ± 2.6 /mm², Figure 2Aa,b,B,

$P < 0.01$). The PMN cells in the I + A animals were located mainly in the periphery of the abscesses.

Although the number of macrophages was similar in all three experimental groups, these cells were found surrounding the abscesses in the I + A and S + A groups (Figure 2Ad arrow), whereas they were mostly located into the granuloma in the Vx + A group (Figure 2Af,B, arrows).

NK cells were found in sinusoids and haemorrhagic areas of the abscesses of all infected groups, with no significant differences in the numbers of such cells (Figure 2Ag-i,B, arrows).

Seven days after trophozoite inoculation, an increased number of INF- γ -positive cells were found in the Vx-A vs. I + A animals (13.5 ± 2.12 cells/mm², Figures 3D and 4B, vs. 3 ± 1.41 cells/mm², Figures 3B and 4B; $P < 0.001$), which were principally located at the periphery of the granulomas, according to the histopathological study. A higher positive correlation between the number of INF- γ -positive cells and INF- γ serum levels was observed in the

LOW RESOLUTION COLOR FIG

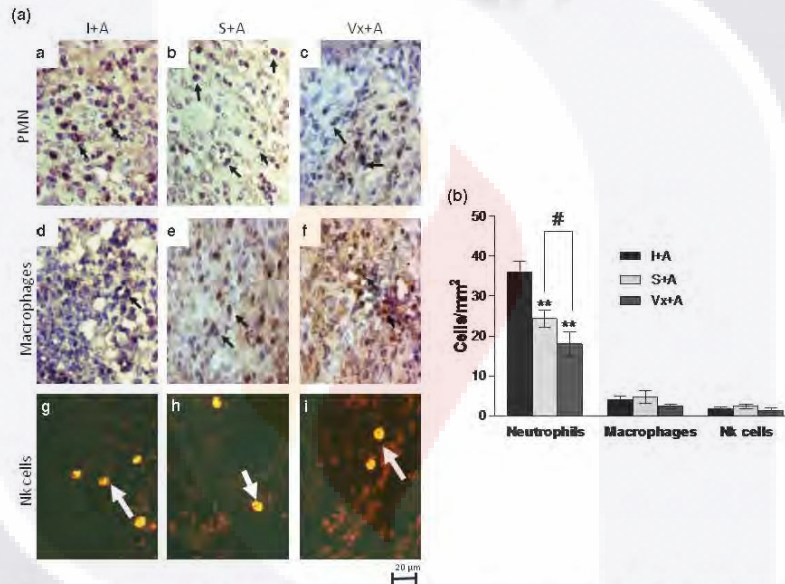


Figure 2 (A) Recruitment of immune cells to the liver in infected Intact, Sham and Vagotomized groups. Top pictures show marked myeloperoxidase cells (arrows) in the area surrounding the abscess (a-c). In the middle row pictures, CD68 cells (arrow) were randomly located around the abscess in Intact and Sham animals (d and e). In the vagotomized animals, CD68 cells were found in the centre of the granuloma (f). The bottom row of pictures shows NK-RP1 cells (white arrows) located in the abscess (g-i). (B) Number of polymorphonuclear (PMN) cells, macrophages and NK cells in the several infected groups. Vagotomy significantly reduced the presence of PMN cells but not the number of macrophages or NK cells. Each bar represents the mean \pm SD of counts obtained from four sections of the liver obtained from six animals (** $P \leq 0.01$ compared to Intact-infected, # $P \leq 0.05$ compared to Sham-infected animals).

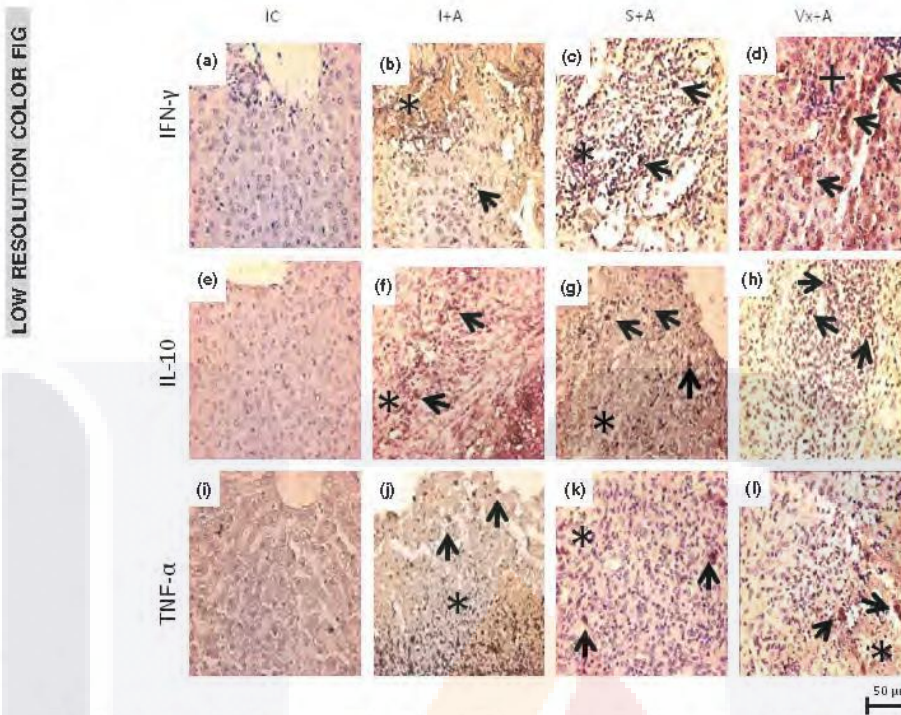


Figure 3 Liver immunohistochemistry for IFN- γ , IL-10 and TNF- α cells from infected Intact, Sham and Vagotomized hamsters. For comparisons, Intact and Sham noninfected animals were included; pictures A, E and I. Pictures B and C show images from the liver of infected Intact and Sham animals. Observe the IFN- γ cells (arrows) located in the infiltrate that surrounds the abscess (*). In d observe the IFN- γ cells (arrows) in the periphery of the granuloma from a vagotomized hamster. Pictures f and g are from the infected Intact and Sham animals. Observe the IL-10 cells (arrows) distributed along the surface of the infiltrate (*). Picture h shows IL-10 cells (arrows) in the inflammatory infiltrate from a recently vagotomized animal. Pictures j, k and l exhibit TNF- α producer cells (arrows) from infected Intact, Sham and Vagotomized hamsters. Observe the cells within the inflammatory infiltrate near the necrotic areas (*).

Vx + A vs. I + A groups (67.0 ± 3.5 vs. 34.5 ± 10.9 pg/mL, Figure 4Aa; $P < 0.05$). However, lower INF- γ serum levels were found in the Vx vs. IC group (44.5 ± 10 vs. 70.75 ± 12.37 pg/mL, Figure 4Aa; $P < 0.01$).

The vagotomy induced a significantly greater number of IL-10 cells in the Vx + A than I + A hamsters (16 ± 1.4 cells/mm², Figures 3H and 4B, vs. 10.5 ± 2.1 cells/mm², Figures 3F and 4B; $P < 0.5$), which correlated with the finding of higher IL-10 serum levels in the Vx + A than I + A group (13.1 ± 2.6 vs. 7.88 ± 1.06 pg/mL, Figure 4Ab; $P < 0.05$). These IL-10 cells were located mostly in the regions of the inflammatory infiltrate. On other hand, significantly greater IL-10 serum levels were also found in Vx than in the IC hamsters (32.38 ± 7.6 vs.

1.89 ± 0.33 pg/mL, Figure 4Ab; $P < 0.001$), whereas no differences between the IC and SHAM groups were observed in this respect.

Although no significant differences in TNF- α serum levels between the S-Vx and Vx groups were observed (63.43 ± 9.09 vs. 49.86 ± 12.12 pg/mL, Figure 4Ac), a significant difference was apparent in this parameter between the S-Vx and IC groups (63.43 ± 9.09 vs. 38.43 ± 5.15 pg/mL, Figure 4Ac; $P < 0.05$). Significantly lower TNF- α serum levels were found in I + A than IC animals (14.15 ± 6.06 vs. 38.43 ± 5.15 pg/mL, Figure 4Ac; $P < 0.01$). On the other hand no significant changes in the distribution of the TNF- α cells were noted between I + A, S + A and Vx + A groups (Figure 3J,K,L).

LOW RESOLUTION FIG

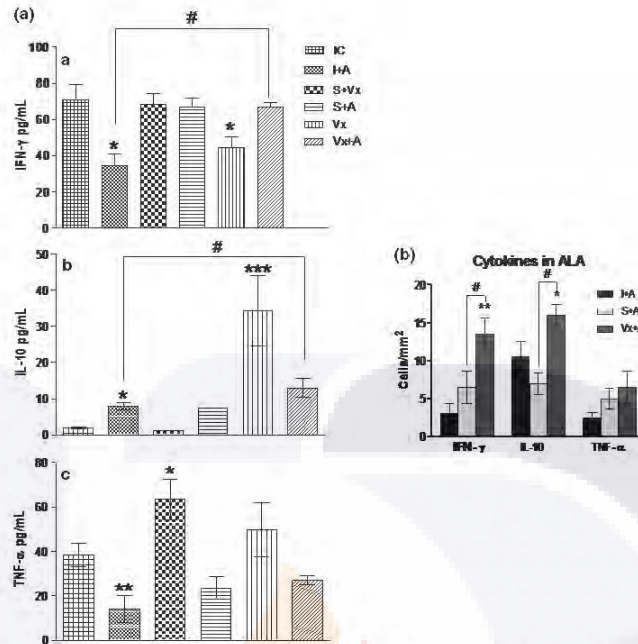


Figure 4 (A) IFN- γ , TNF- α and IL-10 serum levels from infected and noninfected groups. Note the increased IFN- γ and IL-10 levels in the vagotomized infected group (a and b). Values represent the mean \pm SD from six animals in each group. Measurements were performed in duplicate ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$ when compared to the intact control; $\#P \leq 0.05$, when compared with inoculated control). Mean values were statistically compared by the Tukey test. (B) IFN- γ , TNF- α and IL-10 cells were counted in the liver 7 days after amoeba inoculation. Observe the increased number of IFN- γ and IL-10 cells in the vagotomized-infected hamsters. Values represent the mean \pm SD from six animals in each group. Cell counts were made two times on different dates ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, compared to the inoculated control; $\#P \leq 0.05$, compared to inoculated sham). All the mean values were statistically compared by the Tukey test.

DISCUSSION

Nothing is known about the participation of the ANS in the regulation of the inflammatory process during ALA. Our results show that Vx + A hamsters developed several interesting characteristics: (i) multiple granulomas without necrosis, (ii) enormous amounts of collagen fibres around the granulomas, (iii) amoeba debris in the centre of the granulomas with scarce inflammatory infiltrates and large amounts of epithelioid cells surrounding the fragmented amoebas, (iv) a low number of PMN cells, (v) a relatively high number of IFN- γ and IL-10 cells, (vi) high IFN- γ and IL-10 serum levels and (vii) a normal quantity of TNF- α cells and normal TNF- α serum levels.

It is known that acetylcholine attenuates the production of TNF, IL-1, IL-6 and IL-18 by human macrophages at the post-transcriptional stage (20), without altering the release of IL-10. These facts together with the present

results suggest that a vagotomy may be responsible for the increased production of pro-inflammatory cytokines. However, it is unknown to what extent the remaining variables were influenced by the vagotomy or by the remaining untouched branches of the sympathetic system (which are also known to affect the immune responses). Thus, the increased size of the liver abscesses may be partially explained by the effect of noradrenaline (NA), which is known to increase the release of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α (21) from macrophages. At the same time, NA induces stellar cells to turn into myofibroblast cells (22), which in turn synthesize collagen fibres that delimit the zones of liver lesions and secondarily decrease the invasion of amoebas to the surrounding tissue. However, more experiments must be performed to explore these possibilities.

In previous studies on vagotomized animals, we observed that after 36-h post-inoculation, typical amoebic

hepatic abscesses had granulomatous structures with necrotic areas and abundant trophozoites (unpublished data). These lesions were surrounded by scarce epithelioid cells and a great quantity of macrophages and PMN cells. A similar picture has been described by other authors at 7 and 10 days after amoebic inoculation in hamsters and gerbils, respectively (7,23). This early response in vagotomized hamsters suggests that in our ALA model, the increased production of TNF- α and IL-10 by the macrophages and PMN cells, together with the conversion of stellar cells into myofibroblast-collagen producer cells by the sympathetic system, may more efficiently control the amoebic infection by permitting a faster immune response. In this work, it was found that the vagotomized animals studied 7 days post-inoculation had multiple small lesions without necrotic areas in the granuloma, as well as scarce PMN cells and abundant epithelioid cells around the fragmented trophozoites. Similar results were reported by Chadee and Meerovitch (23) in an ALA-gerbil model at 30 days post-inoculation.

The increased production of IFN- γ has been associated with an increased resistance to amoebic invasion of the liver and intestine, whereas a low production of IFN- γ has been related to a greater susceptibility to infection (18,24). The present results are in accordance with this view, because the increase in the number of IFN- γ cells in the peripheral of the inflammatory infiltrate of the granulomas in the vagotomized and infected animals may well explain the low amount of *E. histolytica* trophozoites in liver tissue and may constitute one of several factors involved in the resistance to amoebic invasion, as suggested by Guo *et al.* (24) and Sierra-Puente *et al.* (18). This view is also supported by *in vitro* data, which indicates that IFN- γ activates PMN cells and macrophages to eliminate *E. histolytica* (24).

Previous studies have reported that a vagotomy not only prevents the protective effect of vagus nerve stimulation (25) but also sensitizes the animal to the lethal effects of endotoxin (20). However, in this study, no significant increase in the amount of TNF- α in serum was found after a vagotomy. One possible explanation for this difference is the timing of the vagotomy. We collected samples at 2 weeks post-vagotomy. The vagotomy performed in our laboratory was at the anterior truncal below the diaphragm, whereas in other studies, it was performed at the cervical levels. Similar to our findings, Heider *et al.* (26) reported that an acute anterior truncal vagotomy did not increase the risk of the inflammatory response in surgical patients with a complicated ulcer disease.

The anti-inflammatory IL-10 exerts its effects on various cell types such as Th1 cells as well as monocytes/macro-

phages and regulates several PMN cells functional responses (27). In vagotomized-only animals, significantly higher IL-10 serum levels were observed in the vagotomized and infected animals, possibly because of the presence of amoebas and because of the positive balance of liver sympathetic activity, as suggested by the stimulatory effect of catecholamines on lymphocytes attracted by chemokines to the surgical area. Our results also show that vagotomized and infected animals had higher IL-10 serum levels than the intact and infected animals. Although we do not know the mechanism that could explain this result, it is possible that the higher production of IL-10 leading to greater serum levels comes from the lymphocytes drawn from circulation to the inflammatory area of the liver.

The augment of IL-10 inhibits ROS production, a major pro-inflammatory and bactericidal function of PMN. Dang Pham my-Chan *et al.* (27) showed for the first time that IL-10 selectively inhibits GM-CSF-induced P47 PHOX phosphorylation in a concentration-dependent manner in suspended and adherent PMN. This restraint is owing to inhibition of ERK1/2. In addition, the absence of IL-10 *in vivo* leads to an increase of basal ROS production in whole blood PMN, as shown by the comparison of IL-10 in knockout mice and their WT counterparts. This suggests that the anti-inflammatory cytokine IL-10 acts as a negative modulator of ROS generation both *in vitro* and *in vivo* models (27).

On the other hand, the greater IL-10 serum levels and the greater number of IL-10+ cells in the inflammatory infiltrate of amoebic lesions in Vx + A could have induced hepatic stellar cells to become myofibroblast cells (22,28), leading to a robust tissue repair process. This mechanism was mentioned by Garcia-Zepeda *et al.* (29), who described that IL-10 could orchestrate an anti-inflammatory pattern of cytokines and contribute to the scarce inflammation found in advanced lesions of invasive amoebiasis.

In conclusion, in the absence of parasympathetic innervation of the liver, there were changes in the signals sent to the CNS by the vagal afferent fibres, and the vagal motor response occurred through the remnant PNS. The vagotomy also induced a shift to the sympathetic control of the liver. Under these conditions, the immune response to amoebic infection was significantly changed, represented by the different cell organization in the liver abscess, the early death of the amoebas, the decreased number of PMN cells and the increased secretion of IL-10 and IFN- γ . The results also suggest that differences in the evolution of ALA in vagotomized hamsters may be because of an adaptation process of the nerve and immune systems with the aim of re-establishing homeostasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Biol. Fabiola del Rocío Villalobos-Gómez and Sandra Luz Martínez-Hernández for their skillful technical assistant and Dr. Roberto Rico Martínez and Bruce Allan Larsen for help in editing the use of the English language. The authors thank CONACYT for the grant number V49749-M, the Universidad Autónoma de Aguascalientes for grant number PIBB07-6N and to the SIP-IPN. Special thanks to the post-doctoral support from CONACYT given to PhD María Rosario Campos-Esparza through the 'Estancias posdoctorales y sabáticas vinculadas al fortalecimiento de la calidad del posgrado nacional 2008' program.

REFERENCES

- 1 Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R & Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Mol Pathol* 2002; **101**: 40-56.
- 2 Tsutsumi V & Shibayama M. Experimental amoebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res* 2006; **37**: 210-220.
- 3 Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R & Tsutsumi V. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. *Can J Microbiol* 2002; **48**: 123-131.
- 4 Ventura-Juárez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, et al. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and t cells. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 503-511.
- 5 Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Rodríguez-Martínez HA, Rodríguez-Reyes A, Martínez-Palomo A & Tsutsumi V. Human amoebic liver abscess: expression of ICAM-1, ICAM-2 and Von Willebrand factor endothelial cells. *Parasitol Res* 1997; **83**: 510-514.
- 6 Ramírez-Emiliano J, Flores-Villavicencio LL, Segovia J & Arias-Negrete S. Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. *Medicina (B Aires)* 2007; **67**: 167-176.
- 7 Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F & Martínez-Palomo A. Cellular basis of experimental amoebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; **117**: 81-91.
- 8 Arbo A, Hoefsloot M, Ramírez A & Santos JI. *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arch Invest Med* 1990; **1**: 57-61.
- 9 Kretschmer RR, Collado ML, Pacheco MG, et al. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 1985; **7**: 527-535.
- 10 Eskandari F, Webster JI & Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 2003; **5**: 251-265.
- 11 Cervantes-Rebolledo C, Moreno-Mendoza N, Morales-Montor J, De La Torre P, Lalette JP & Carrero JC. Gonadectomy inhibits development of experimental amoebic liver abscess in hamsters through downregulation of the inflammatory immune response. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 447-456.
- 12 Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 318-328.
- 13 Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; **69**: 1-32.
- 14 Heijnen CJ. Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: current knowledge and future perspectives. *Brain Behav Immun* 2007; **21**(1): 1-8.
- 15 Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ & Ju G. Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World J Gastroenterol* 2002; **8**: 540-545.
- 16 Tanaka K, Ohkawa S, Nishino T, Nijima A & Inoue S. Role of the hepatic branch of the vagus nerve in liver regeneration in rats. *Am J Physiol* 1987; **4**: 439-444.
- 17 Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods*. Institute of Pathology, Armed Forces, NY; 3rd edn. ????, McGraw-Hill, 1968: 121-122.
- 18 Sierra-Puente RE, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna RA, et al. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 384-391.
- 19 Bilbo SD, Drazen DL, Quan N, He L & Nelson RJ. Short day lengths attenuate the symptoms of infection in Siberian hamsters. *Proc Biol Sci* 2002; **269**: 447-454.
- 20 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; **405**: 458-462.
- 21 Heijnen CJ, Rouppe van der Voort C, Wulffraat N, van der Net J, Kuis W & Kavelaars A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol* 1996; **71**: 223-226.
- 22 Roskams T, Cassiman D, De Vos R & Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; **280**: 910-923.
- 23 Chadee K & Meerovitch E. The pathogenesis of experimentally induced amoebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol* 1984; **117**: 71-80.
- 24 Guo X, Stroup SE & Houpt ER. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-gamma. *Mucosal Immunol* 2008; **1**: 139-146.
- 25 Ghia JE, Bienerhasset P, El-Sharkawy RT & Collins SM. The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **293**: G711-G718.
- 26 Heider TR, Koruda MJ, Farrell TM & Behrns KE. Acute vagotomy does not augment the systemic inflammatory response in patients with peptic ulcer disease. *Am Surg* 2004; **70**(4): 342-346.
- 27 Dang PM-C, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidal MA & El-Benna J. Anti-inflammatory effect of interleukin 10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced P47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J* 2006; **20**: 1504-1506.
- 28 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, et al. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998; **28**(6): 1518-1524.
- 29 García-Zepeda EA, Rojas-López A, Esquivel-Velázquez M & Ostoa-Saloma P. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol* 2007; **29**(12): 679-684.

A Dios *Por darme la fortaleza y ayudarme en los momentos más difíciles de esta etapa de mi vida.*

Al Dr. Javier Ventura Juárez. *Por su valiosa ayuda durante cada escritura y cada experimento, y principalmente a la frase que me dio valor cuando me dijo el “El hombre nunca se cansa”, gracias doc.*

Al Dr. Andres Quintanar Stephano. *Por esas manos de un cirujano con grandes habilidades y por la enseñanza de la técnica quirúrgica, así como por sus consejos que me ayudaron durante mi etapa de preparación.*

Al Dr. Mario García Lorenzana. *Por su valiosa ayuda en la técnica de microscopía, y por los consejos durante los experimentos.*

A Dra. Maria del Rosario Campos Esparza. *Por contagiarme parte de esa mujer aguerrida y sin miedos, así como por su ayuda.*

A mis padres. *Una vez gracias papas por apoyarme durante esta etapa de mi preparación al igual que fue con la licenciatura.*

A los compañeros del lab. Sandra y Fabiola. *Por trabajar junto conmigo en este proyecto.*

A mi esposa Cintya *Porque en verdad este doctorado lo realizamos los dos al colaborar conmigo en cada fase de mi preparación y aparte gracias por la vida que me has dado, te amo.*

DEDICATORIAS

Este tabrajo de Tesis es dedicada A:

Mi Esposa

A mis hijos

A mis Padres

Al Dr. Javier Ventura Juárez

*A todos los compañeros del lab
Que me ayudaron mucho.
Sandra, Fabiola, Norma, Reno
Rosy.*

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes

Abreviaturas

RRP- Receptor Reconocimiento a Patrón	CAs- Catecolaminas
IgG – Inmunoglobulina G	NE- Norepinefrina
IgA- Inmunoglobulina A	NPY- Neuropeptido Y
IgE- Inmunoglobulina E	AR- Receptor Adrenérgico
IgM- Inmunoglobulina M	LPS- Lipopolisacarido
CD- Cluster of Differentiation	NKT- Linfocitos TNK
µm- Micrómetro	H&E- Hematoxilina-eosina
INF γ- Interferon Gamma	PAS- Ácido Peryódico de Schiff
NK- Natural Killer	NF- Neurofilamentos
TCR- Receptor de Células T	MPO- mieloperoxidasa
KIR- Receptor de Inhibición	ELISA- Enzimoinmunoanálisis
NKR-P1- Receptor de lisis	HHS- Hipotálamo-Hipófisis Suprarrenal
kDa- Kilodalton	HHG- Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa	HHT- Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo
AHA- Absceso Hepático Amibiano	ROS- Reactivos de Oxígeno
TAC- Tomografía Axial Computarizada	GM-CSF- Factor de Crecimiento granulocítico-monocítico
TNF α – Factor de Necrosis Tumoral alfa	MET- Microscopía Electrónica de Transmisión
FEC-1- Factor Estimulante de Colonias 1	
PMN- Polimorfonucleares	
FILM- Factor inhibidor de la Locomoción de Monocitos	
BCG- Bacilo Calmette Guerin	
NADPH- Nicotin Adenin Dinucleótido Fosfato	
IL- Interleucina	
C3, C1, C3a, C5a y C9 - Proteínas del Complemento	
Th- Células T cooperadoras	
SNC- Sistema Nervioso Central	
SNA- Sistema Nervioso Autónomo	
SNPe- Sistema Nervioso Periférico	
SNS- Sistema Nervioso Simpático	
SNP- Sistema Nervioso Parasimpático	
NF-κB- Factor Nuclear Kappa Beta	
JAK2, STAT3, SOCS3, Phox P47 y ERK- Factores de transcripción	
RANTES- (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)	
CCL2, CxCL8- Quimiocinas con el motivo C-C, ligando 2 y 8	
CAM- Moléculas de Adhesión Celular	

RESUMEN

El sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema inmune forman una red neuroinmune, en la que hay mecanismos de retroalimentación a través de las ramas aferentes neuronales que envían señales mediante citocinas pro-inflamatorias desde los sitios dañados hacia el Sistema Nervioso Central (SNC), y como respuesta el SNA libera acetilcolina y noradrenalina en sus ramas terminales eferentes, estos neurotransmisores son anti y/o pro-inflamatorios. Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos a través de los cuales el SNA participa localmente en un proceso infeccioso hepático, se estudiaron los efectos de la vagotomía y la simpatectomía sobre la inmunidad innata en el hámster con Absceso Hepático Amebiano (AHA). Los resultados mostraron que a los 7 días post-inoculación los hámsteres parasimpatectomizados presentaron: aumento del tamaño de los abscesos, gran cantidad de fibras de colágeno y presencia de pocos trofozoítos alrededor y en el centro de los granulomas; aumento sérico de IL-10 e IFN- γ , así como del número de células productoras de estas citocinas. Por otra parte, no se encontraron cambios en el número de macrófagos y células Nk. Por otro lado, los animales simpatectomizados mostraron: incremento en el tamaño de los abscesos con gran diseminación de trofozoítos, escasas fibras de colágena y pocos neutrófilos, aumento de los niveles séricos de IL-10 y disminución los de IFN- γ y TNF- α .

La denervación parasimpática y simpática alteró la respuesta de la inmunidad innata. La vagotomía provocó un aumento en la respuesta inflamatoria posiblemente por la activación temprana de neutrófilos y macrófagos, favoreció que el sistema nervioso simpático tomara el control de la respuesta inmune del hígado al estimular la diferenciación de macrófagos hacia células epitelioides y las células estelares hepáticas hacia miofibroblastos productores de colágena. Es posible que el aumento de IL-10 pudiera estar actuando sobre los miofibroblastos para incrementar la producción de colágena, formando una barrera que bloqueó la migración de trofozoítos. En contraparte, la ausencia del sistema nervioso simpático permitió una dispersión amplia de trofozoítos hacia el tejido periférico con escasa respuesta inflamatoria alrededor de la lesión y escasas fibras de colágena, así, podemos concluir que en ausencia del simpático, la mayor influencia del sistema nervioso parasimpático indujo una mayor inhibición de la respuesta inmune.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

1.- Introducción y antecedentes.....	1
1.1. Amibiasis	1
1.2. La Respuesta Inmune Innata	7
1.3. Inmunidad Celular frente a <i>E. histolytica</i>	10
1.4. Inmunidad Humoral frente a <i>E. histolytica</i>	15
1.5. Interacción Neuro-Inmune.....	17
1.5.1. El Sistema Nervioso Autónomo	20
1.6. Inervación del Hígado.....	22
1.7. Células Inmunes del Hígado	23
2.- Justificación.....	24
3.- Planteamiento del problema	24
4.- Hipótesis.....	25
5.- Objetivo general.....	25
6.- Objetivos particulares	25
7.- Material y métodos	25
7.1. Animales	25
7.2. Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en medio axénico.....	26
7.3. Vagotomía quirúrgica en el hámster	26
7.4. Simpatectomía química	26
7.5. Inducción de abscesos hepáticos amebianos por inoculación	27
intrahepática de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a hámsteres.	
7.6. Técnicas de Hematoxilina & Eosina (HE), Mason y PAS	27
7.7. Inmunohistoquímica para Neurofilamentos de bajo peso	
molecular (NF-68 kDa)	27
7.8. Inmunohistoquímica para Neutrófilos, Macrófagos y Células Nk.....	27
7.9. Inmunohistoquímica para amibas.....	28

7.10. Inmunohistoquímica para IFN γ , IL-10 y TNF α	28
7.11. Cuantificación celular	28
7.12. Cuantificación de glucógeno	28
7.13. Cuantificación de citocinas séricas por ELISA	28
7.14. Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión.....	29
7.15. Análisis estadístico	29
8.- Resultados.....	30
8.1. Inervación del parénquima hepático en hámster	30
8.2. Efecto de la vagotomía sobre la síntesis de glucógeno hepático.....	31
8.3. Efecto de la vagotomía sobre la morfología de los abscesos	31
8.4. Papel de la denervación parasimpática en la producción de INF- γ , TNF- α e IL-10 séricos en modelos de AHA	35
8.5. Citocinas en AHA	37
8.6. Efecto de la vagotomía sobre el AHA a las 36 horas post-inoculación	38
8.7. Efecto de la simpatectomía sobre la síntesis de glucógeno hepático	40
8.8. Efecto de la simpatectomía sobre la morfología del AHA.....	41
8.9. Papel de la denervación simpática sobre la producción de INF- γ , TNF- α e IL-10 en modelos de AHA.....	45
9.- Discusión	47
10.- Conclusiones.....	53
11.- Bibliografía	54
12.-Apéndices.....	63

1.- Introducción y antecedentes

1.1. Amibiasis

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es uno de los eucariontes más primitivos y es causante de la **amibiasis**. Esta enfermedad ha existido, con toda probabilidad, desde que el hombre empezó a poblar la corteza terrestre, y en el sentido biológico evolutivo el parásito debe habernos precedido por un largo periodo. A pesar de descripciones acerca de disenterías en escritos chinos, hebreos, griegos e incluso sánscritos, resulta difícil probar que se deban a *E. histolytica*, ya que pudieron haber sido causadas por otros agentes. En 1828 el médico inglés James Annesley ya describía la disentería complicada con absceso hepático, sin mostrarse seguro si el absceso era consecuencia de la disentería. A mediados del siglo XIX (1856), el médico mexicano Miguel Jiménez publicó su libro *Lecciones dadas en la escuela de medicina de México*, la explicación que dio de su libro fue: “Tengo que dar una atención más esmerada y volver con más frecuencia al examen de los abscesos en el hígado por dos razones principales siendo una de ellas que la enfermedad es muy común en nuestro país”. El descubrimiento de mayor trascendencia en la amibiasis fue en 1875 por el médico ruso Fedor Aleksandrovich Lesh, quién publicó su artículo “Desarrollo masivo de Amibas en el Intestino grueso”. Pero en 1890 nadie se atrevía a señalar a la amiba como agente patógeno. En ese año, William Osler observó el primer caso de absceso hepático amebiano en los Estados Unidos de América (Meza y cols., 1994).

E. histolytica pertenece al subfilum *sarcodina*, superclase *rhizopoda* de protozoos formadores de pseudópodos, clase *lobosea*, orden *amoebidae*, familia *entamoebidae*, género *Entamoeba* y especie *histolytica* (Martínez-Palomo, 1987).

En 1913 Kuenen y Swellengrebel informaron que *E. histolytica* tiene tres fases en su ciclo de vida: la invasora propiamente dicha, la comensal y la quística tetragena, siendo las dos primeras el trofozoíto, en diferentes grados de actividad, y la quística, por lo tanto *E. histolytica* puede existir en dos formas: trofozoíto y quiste (Ravdin y Kelsall, 1994).

El trofozoíto (fig. 1) es un anaerobio facultativo de 10-40 μ de diámetro, muy activo y pleomórfico, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: mitocondrias, sistema de lisosomas primarios y secundarios, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Martínez-Palomo, 1987), se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (Ortiz, 1994).

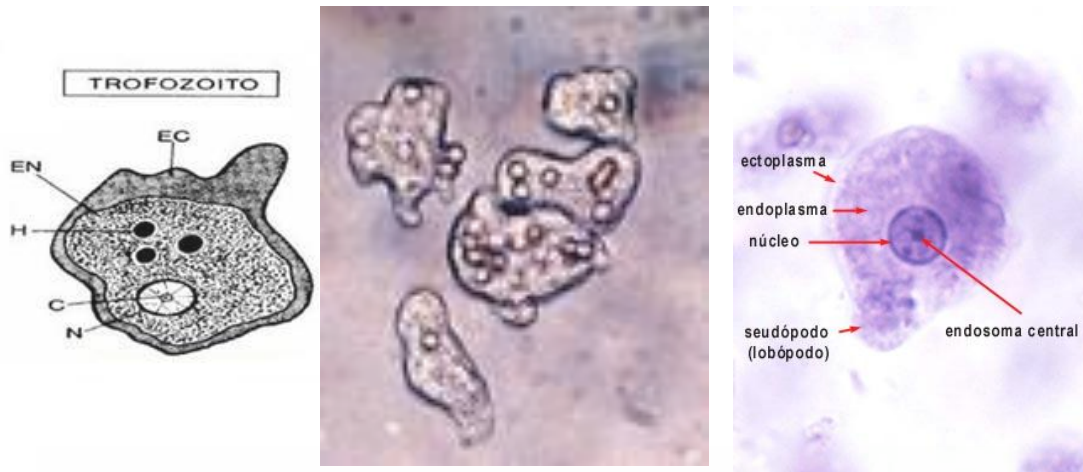


Figura 1. Trofozoítos de *E. histolytica* donde N: Núcleo, C: Centrosoma, H: Gránulos de glucógeno, EN: Endoplasma, EC: Ectoplasma (Tay-Lara, 2000).

Los quistes (fig. 2) son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μm de diámetro, las cuales, sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente. Su citoplasma es incoloro, lo que permite la visualización de los llamados cuerpos cromatoides y núcleos en número de uno a cuatro, los quistes son la forma de resistencia del parásito, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la amiba se da cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoítos. Aun hoy, poco se conoce de este proceso por la incapacidad de reproducir el fenómeno *in vitro*, sin embargo, se ha podido confirmar un papel importante de la quitina (polímero de *n*-acetilglucosamina unida por enlaces β (1-4), muy común en hongos, crustáceos e insectos, pero ausente en humanos); recientemente se describió la importancia de la quitina en la transformación *in vitro* del trofozoíto de *E. invadens* a quiste (Avron y cols., 1982).

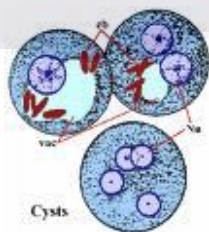


Figura 2. Quistes de trofozoítos de *E. histolytica*, tetranucleados (Tay-Lara, 2000).

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente sencillo (fig. 3). La infección se inicia con la ingesta de quistes (capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la exquistación, que consiste en la división del quiste tetranucleado que da origen a ocho

núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoítos que se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares; finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse completando el ciclo (Ravdin y Kelsall, 1994).

En la mayoría de los individuos infectados, *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (Ravdin y cols., 1990), pero en otros casos este parásito tiene la capacidad de invadir otros órganos fuera del intestino, dependiendo de la susceptibilidad del paciente y de los factores de patogenicidad del parásito (Espinosa-Cantellano y Martínez Palomo, 1991).

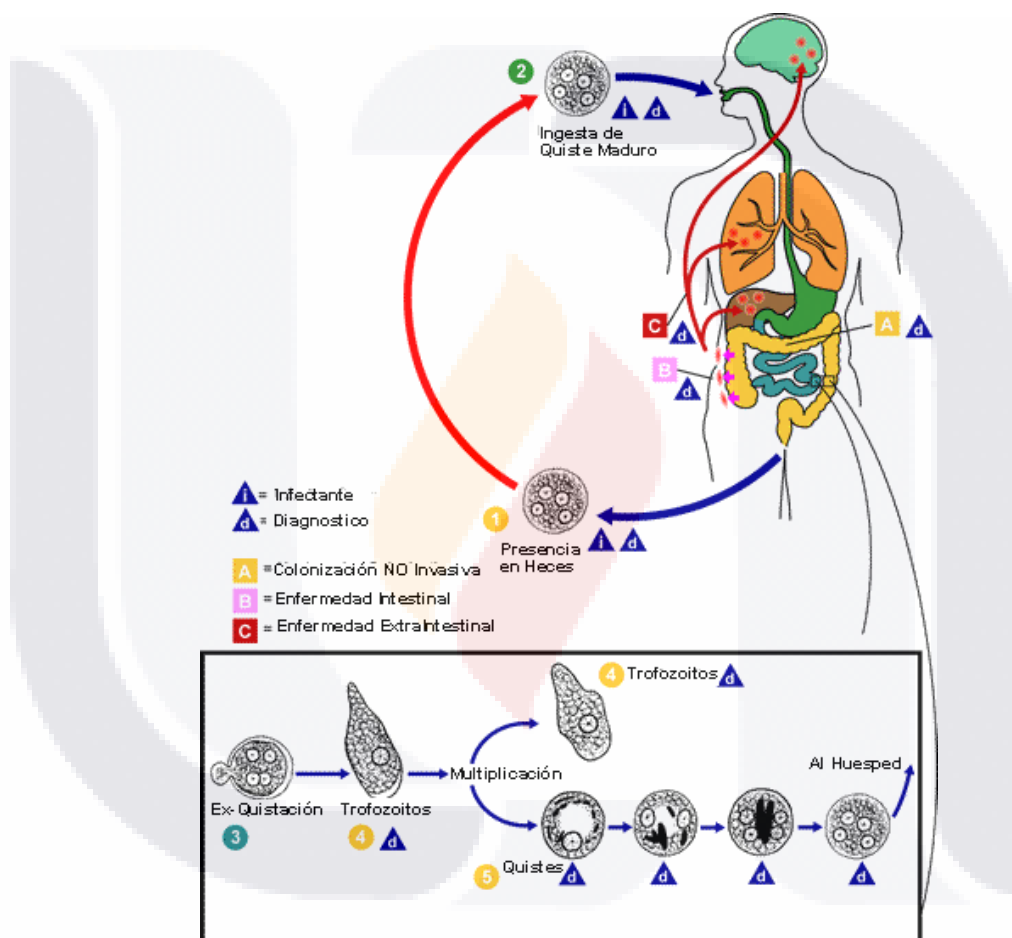


Figura 3. Esquemización del Ciclo Biológico directo de *E. histolytica* y cada uno de sus estadios (Tay-Lara, 2000).

Factores de patogenicidad de *E. histolytica*. Partiendo de los conocimientos básicos sobre cómo causan las amibas el daño, como lo son el proceso de invasión a través de las paredes del intestino o sus mecanismos de invasión al hígado, revisaremos algunas de las propiedades específicas de la amiba tales como: estructuras de su membrana, conjunto de enzimas que contribuyen a su capacidad patogénica (capacidad de causar enfermedad en el huésped) y virulencia, que es el grado de

patogenicidad. Se debe tener en cuenta que muchas de las propiedades responsables de la patogenicidad y virulencia de las amibas no están claras o son desconocidas. Sabemos, sin embargo, que si la capacidad de ataque del parásito supera las defensas del huésped, se produce enfermedad (Espinosa-Cantellano y Martínez Palomo, 1991).

Los factores de patogenicidad de *E. histolytica* son:

- **Adhesinas** tipo lectina de diferente peso molecular: 260 kDa, 170 kDa, 220 kDa, 112 kDa y 140 kDa. Estas moléculas le permiten adherirse al epitelio intestinal mucoso, al tejido hepático, células sanguíneas y a otros tejidos posiblemente invadidos. Éstas tienen afinidad por azúcares como la N-acetil D-Galactosamina, N-acetil D-Glucosamina. Como se observa, son azúcares de membrana de los eritrocitos, células inmunes y de matriz extracelular (Meza y cols., 1994). La lectina de 260 kDa conocida como Gal/GalNac, es una lectina que actúa de manera principal como adhesina hacia células del intestino, eritrocitos y células inmunes (Pacheco-Yépez y cols., 2000), a esta lectina de 260 kDa la componen 2 lectinas una de 35 kDa y una de 170 kDa, esta última es conocida como la lectina de Petri, donde él expone que la principal función de esta lectina es inhibir el complemento (Braga y cols., 1992). La lectina de 220 kDa, tiene afinidad principalmente por células inmunes, por lo cual se le caracteriza por su actividad inmunomoduladora disminuyendo citocinas Th1 y aumentando citocinas Th2 (Bekker-Mendez y cols., 2006). Las lectinas de 112 kDa y de 140 kDa se han descrito como lectinas tipo integrinas que participan en la migración e invasión ya que tiene afinidad por azúcares de matriz extracelular (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991).
- **Amebaporos:** moléculas secretadas por las amibas, capaces de ocasionar daño a las células del huésped debido a su inserción membranal para formar estructuras tipo canales y así provocar cambios osmóticos a nivel de membrana celular de las células del huésped.
- **Cistein-proteasas:** enzimas con capacidad para digerir proteínas del huésped constituyentes de la matriz extracelular, tales como la fibronectina y anticuerpos como la IgA.
- **Colagenasas, hialuronidasas y neuraminidasas:** enzimas encargadas de digerir matriz extracelular en procesos invasivos (Ventura-Juárez y cols., 2002).

- **Toxinas:** en células epiteliales ocasionan pérdida de adhesiones intercelulares con redondeamiento celular, en cultivos ocasionan desanclaje de las células epiteliales (Meza y cols., 1994).
- **Lipofosfolucanos y los lipoproteofosfolucanos:** se propone que estas moléculas le dan el carácter patogénico e invasor a *E. histolytica* sobre otras especies de amibas, debido a que ocasionan daño tisular.
- **Lectina semejante al CD59:** el CD59 es una molécula de algunas células del sistema inmune y otras células no inmunes que las protege contra la acción del complemento, por lo cual, esta lectina presente en el repertorio molecular de la amiba semejante al CD59 la protege contra la cascada del complemento y principalmente contra la del complejo de ataque a la membrana (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Ventura-Juárez y cols., 2009).

Con base en la virulencia de *E. histolytica* mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología celular y molecular del parásito a partir de la invención de medios sintéticos para su cultivo (Diamond, 1980).

Se ha planteado, con base en la respuesta inmune y la conducta del parásito, que existen distintas especies de *Entamoeba*, morfológicamente idénticas pero de diferente patogenicidad y/o virulencia o de si es una sola especie que expresa estas características sólo bajo ciertas circunstancias del medio o del huésped (Cohen, 1995). Al parecer, la información disponible hace suponer que existen distintas especies de *Entamoeba* que son morfológicamente idénticas. *Entamoeba dispar*, la especie más común, se asocia primeramente con el estado de portador asintomático. La especie patogénica, referida como *E. histolytica*, tiene la capacidad de invadir los tejidos y causar enfermedad sintomática. La existencia de especies distintas fue inicialmente sugerida por los estudios de zimodemos. Así, distintos zimodemos se asociaron con la enfermedad sintomática invasora (*E. histolytica*) o con el estado de portador asintomático (*E. dispar* o *E. histolytica*) (Ravdin y Kelsall, 1994). Utilizando sondas de RNA o DNA indicaron diferencias genéticas entre *E. dispar* y *E. histolytica*. Utilizando la técnica de PCR se han encontrado diferencias en fragmentos genómicos de DNA entre ambas especies. En lo que se refiere a diferencias antigénicas entre *E. dispar* y *E. histolytica* se han encontrado diferentes epítomos en la subunidad pesada de 170 kDa de la lectina inhibible por galactosa en *E. histolytica*, pero no en *E. dispar* (Petri y cols., 1990). Otra diferencia es la presencia de eritrocitos ingeridos por *E. histolytica*, lo que no sucede con *E. dispar* (Ravdin y Kelsall, 1994). Se estima que en el mundo, cuya población actual es de 6,474,660,025 habitantes (<http://www.npg.org/>), *E. histolytica* afecta alrededor de 500 millones de personas

cada año y que de ellas 110,000 mueren por complicaciones causadas por este agente, ya que las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como la colitis amebiana fulminante o la enfermedad extraintestinal más frecuente, el **Absceso Hepático Amebiano (AHA)** (Walsh, 1986). En México la magnitud de esta parasitosis es tan grande que en 2003 representó cerca del 1% de la población nacional estimada en 104 millones, es decir, 1'013'535 de casos diagnosticados con amibiasis intestinal (<http://www.ssa.gob.mx>), ocupando el quinto lugar en morbilidad a nivel nacional.

La patogénesis por *E. histolytica*, conocida como AHA, es la complicación extraintestinal más frecuente, típicamente los pacientes presentan un cuadro clínico agudo o crónico, con dolor abdominal en hipocondrio derecho asociado a síntomas generales (pérdida de peso, mialgias, malestar general y fiebre), los síntomas gastrointestinales y la ictericia son raros (Hughes y Petri, 2000). El diagnóstico del AHA se realiza por el cuadro clínico sugestivo y se confirma con evidencia imagenológica (ecografía o TAC), serología positiva para *E. histolytica* y respuesta al tratamiento con nitroimidazoles (Pinilla y cols., 2004; Zengzhun y cols., 1999).

Para poder esclarecer y conocer con mayor certeza los mecanismos de agresión de las amibas, se han realizado exhaustivos estudios *in Vitro* (Calderón y Tovar, 1986; Leippe y cols., 1995; Leroy y cols., 2000) e *in Vivo*: en modelos animales con AHA (Dennis y Chadee, 1989; Olivos-García y cols., 2004) o amibiasis intestinal (Haupt y cols., 2002), pacientes humanos con AHA (Diamantstein y cols., 1981; Salata y cols., 1985, 1986 y 1990; González Amaro y cols., 1994; Ventura-Juárez y cols., 1997 y 2003; Stanley y cols., 1998; Stanley, 2001) y amibiasis intestinal (Eliézer Masliah y Pérez Tamayo, 1984; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). La mayor parte de los estudios apuntan a que los mecanismos de defensa celular del humano, como los de activación de los macrófagos y linfocitos, son incapaces de abolir el proceso de invasión amebiana en los tejidos intestinales y hepáticos. No siendo así en modelos animales resistentes como el ratón y la rata, en donde se ha demostrado que dichos mecanismos son efectivos para abortar el proceso invasor parasitario en pocos días (Tsutsumi y cols., 1990; Jarillo Luna y cols., 2002). Por su parte, investigaciones acerca del papel de los neutrófilos, macrófagos y el complemento sérico como elementos de la respuesta inmune innata y posibles barreras para evitar la invasión de los parásitos, han arrojado resultados positivos en la explicación de los mecanismos de invasión (Guerrant, 1981; Calderón y Tovar, 1986; Campos Rodríguez y cols., 1995; Shibayama y cols., 2008).

Dependiendo del perfil genético e inmunoenzimático del parásito, los estudios histopatológicos del AHA han demostrado que inicialmente, por medio de enzimas proteolíticas que degradan la mucosa del colon y las paredes de los vasos sanguíneos del intestino, los trofozoítos ingresan al sistema portal-hepático y siendo resistentes a la lisis por el sistema del complemento invaden el hígado, (Bruchaus y cols., 2002; Ventura-Juárez y cols., 2003). Al llegar los trofozoítos al hígado son rodeados por neutrófilos, la lisis de los neutrófilos y de los hepatocitos de la periferia da origen a la necrosis, estas células son remplazadas progresivamente por macrófagos y células epiteloides hasta desarrollar un granuloma, lo que indica que el proceso de lisis de los hepatocitos es combinado y se debe tanto a la capacidad histolítica de la amiba como a la lisis de los neutrófilos. En la periferia del absceso se encuentra tejido hepático en destrucción y fibrosis, con linfocitos, plasmocitos y trofozoítos; el contenido, que no es purulento, consiste en un líquido de color café o amarillo rojizo, sin trofozoítos, ya que éstos no sobreviven al ambiente y por lo general permanece estéril, excepto cuando ocurre una infección secundaria. En los abscesos crónicos puede constituirse una cápsula de tejido fibroso que los aísla del tejido sano (Tsutsumi y cols., 1984; Ventura Juárez y cols., 2002; Pinilla y cols., 2004).

1.2. La Respuesta Inmune Innata (RII) forma parte de los mecanismos inespecíficos de defensa, representa el primer sistema defensivo del organismo y es de especial importancia para la protección contra las infecciones, ya sean de tipo bacteriano o viral. Como se sabe, los mecanismos que conforman la inmunidad innata están constituidos por las llamadas **barreras naturales** como la piel y mucosas, estas no sólo actúan aislando al individuo del exterior, sino también cuentan con función bactericida y promotora de la inflamación, debido a la presencia de múltiples moléculas, factores y células con actividad defensiva en estas barreras. Dentro de estas moléculas de la RII se encuentran ciertas citocinas, quimiocinas y factores del complemento. **Las citocinas** son moléculas solubles inmunomoduladoras clasificadas en dos tipos: 1) Pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ que poseen una acción relevante como elementos de la inflamación, contribuyendo al inicio de la respuesta inmune adaptativa y 2) Anti-inflamatorias como IL-10, IL-4 y TGF- β que modulan la respuesta inflamatoria. Dentro de las **quimiocinas** esenciales están IL-8 y RANTES, que intervienen atrayendo nuevas células al foco inflamatorio en caso de una agresión por patógenos. Con relación al **sistema de complemento**, está constituido por moléculas implicadas esencialmente en la defensa frente a infecciones. Parte de los factores del complemento potencian la *inflamación* y la *fagocitosis* y actúan produciendo la *lisis* de células y microorganismos. El sistema de complemento

puede ser activado a través de tres vías: 1) clásica, 2) alternativa y 3) de las lectinas (Abbas, 2002).

La inmunidad innata ha tenido avances notables durante los últimos años debido al descubrimiento de los **receptores tipo Toll** (TLR, proteínas transmembranales expresadas por células del sistema inmunitario innato) en los mamíferos y su participación en el reconocimiento de patógenos microbianos. La participación de los receptores tipo Toll (TLR) en la respuesta inmunitaria innata se describió por primera vez en un artrópodo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, estas proteínas de *Drosophila* originalmente fueron identificadas como un factor requerido para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral en el embrión en desarrollo. En la actualidad el estudio de estos receptores es de gran interés, sobre todo en medicina humana debido a que desempeñan un papel central tanto en el desencadenamiento de la inmunidad innata como en la coordinación entre la inmunidad innata y adaptativa. (Strieter y cols., 2002).

Mediante los receptores Toll el sistema inmunitario ha desarrollado diferentes métodos para discriminar moléculas propias de moléculas extrañas tales como ARN viral de doble cadena; dinucleótidos CpG no metilados comunes en el ADN bacteriano, pero escasos en el ADN de vertebrados; mananos de las levaduras; glicolípidos de las micobacterias; lipoproteínas de bacterias y parásitos; ácidos lipoteicoicos de bacterias grampositivas y LPS de bacterias gramnegativas, estas moléculas son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP).

La estrategia de reconocimiento microbiano se basa en la detección de estos patrones moleculares conservados mediante receptores ahora conocidos como Toll (fig. 4), que consisten en 10 miembros: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 (McGuinness y cols., 2003).

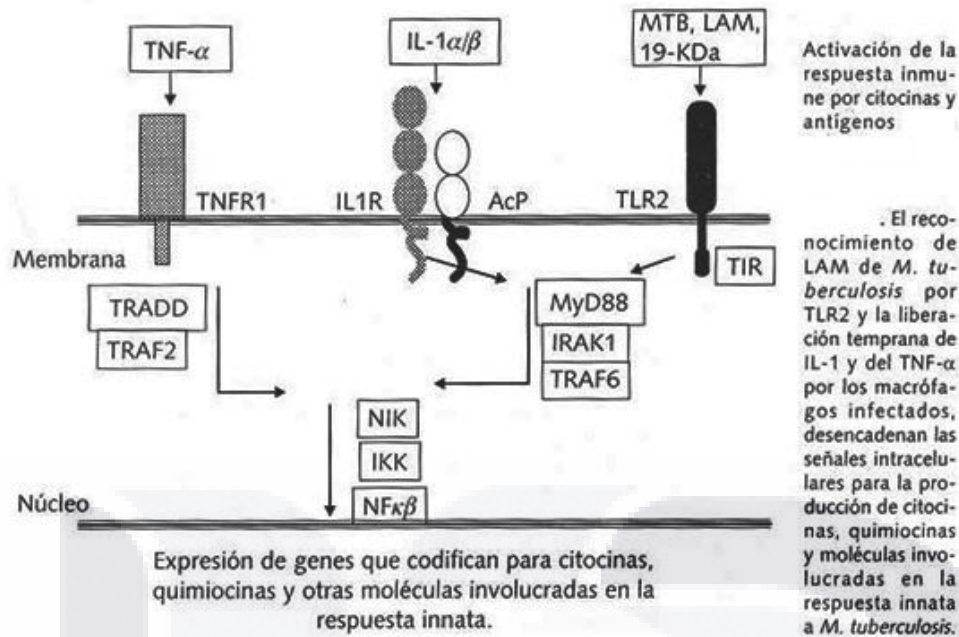


Figura 4. Activación de los receptores membranales de las células de la respuesta inmune activan segundos mensajeros tales como MyD 88, TRAF6 para sintetizar factores de transcripción tales como NF κ B, los cuales facilitan la transcripción de citocinas (Teixeira y cols., 2002).

Dentro de las **células de la RII** están los **neutrófilos**, cuyo diámetro es de unas 12 a 15 μ m, presentan numerosas proyecciones cuando se activan, son las células principales de la respuesta inmune aguda o temprana. En el humano los neutrófilos tienen un núcleo segmentado en tres a cinco lobulillos conectados, a los que debe el nombre de leucocitos polimorfonucleares. El citoplasma contiene gránulos de dos tipos, la mayoría, denominados gránulos específicos, los cuales contienen enzimas de degradación, como lisozima, colagenasa, **mieloperoxidasa** y elastasa, estas células poseen diferentes tipos de receptores como son proteínas del complemento, RRP, receptores para la región constante de anticuerpos tipo IgG y IgA, receptores para citocinas y quimiocinas, el **marcador principal de estas células es el CD15 (CD11a, CD11b)** (Abbas, 2002).

Los **monocitos** tienen un diámetro de 10 a 15 μ m y poseen núcleo en forma de frijol y citoplasma finamente granular con lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Cuando maduran se convierten en macrófagos, éstos pueden adoptar diversas formas, algunos tienen citoplasma abundante llamándose células epiteloides debido a su semejanza con las células epiteliales de la piel. Los macrófagos que se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos reciben nombres especiales para designar localizaciones específicas. Por ejemplo, en sistema nervioso central son las células de la microglía; los que revisten los capilares sinusoides del hígado se llaman células de Kupffer; en las vías aéreas pulmonares son

los macrófagos alveolares; y los fagocitos multinucleados del hueso se denominan osteoclastos.

Los **macrófagos** desempeñan papeles cruciales en la inmunidad innata y adaptativa y son importantes células efectoras en la eliminación de los microorganismos. Responden a los microorganismos con casi la misma rapidez que los neutrófilos, pero persisten mucho más tiempo en los sitios de inflamación. Por consiguiente, los macrófagos son las células efectoras dominantes de las fases tardías de la respuesta inmunitaria innata, uno o dos días después de la infección. Tienen una vida más prolongada que los neutrófilos y, a diferencia de éstos, no están terminalmente diferenciados y pueden dividirse en el sitio de la inflamación. Dentro de los receptores principales de estas células se encuentran las proteínas del complemento, RRP, receptores a la región constante de diferentes anticuerpos como son las clases de IgG e IgA, a citocinas, y a quimiocinas. **El marcador principal para estas células es la proteína de membrana llamada CD68** (Abbas, 2002).

Las **células Nk** son una subpoblación de linfocitos que destruyen células infectadas por virus y secretan citocinas, fundamentalmente interferón gama (INF- γ). La principal función de estas células es la defensa contra las infecciones por virus y por otros microorganismos intracelulares. Derivan de precursores en la médula ósea y son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos, por lo cual a veces se les denomina linfocitos grandes granulares. En función de su fenotipo de superficie y su estirpe, las células Nk no son linfocitos B ni T y no expresan receptores para el antígeno (TCR), estas células expresan otros tipos de receptores como son KIR, **NkR-P1**, receptores para la región constante de anticuerpos, receptores para citocinas y quimiocinas, **dentro de los marcadores celulares principales están el CD56 y el CD16**. Constituyen del 5-20% de las células mononucleares de la sangre, el bazo, y son poco frecuentes en otros órganos linfoides (Abbas, 2002).

1.3. Inmunidad Celular frente a *E. histolytica*

La invasión tisular por *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 supervivencia 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, neutrófilos y linfocitos T durante la infección y en respuesta a proteínas solubles de la amiba *in vitro*, esta deficiencia es clara en infecciones extraintestinales en el humano y en animales susceptibles como es el modelo del hámster, por otro lado, en animales

resistentes (ratón), en estudios *in vivo*, se ha encontrado que la inoculación intraperitoneal de trofozoítos de *E. histolytica* induce infiltrado inflamatorio intenso de larga duración, en donde predominan los neutrófilos activados; muchos de estos mecanismos continúan en investigación (Campbell y Chadee, 1997). Hay evidencia de que la respuesta celular en la infección amebiana está relacionada con inmunidad protectora, la cual emerge luego de la recuperación de la amibiasis invasiva (Trissl, 1982).

La modulación de la función de los **macrófagos** es multifactorial, tienen gran actividad amebicida cuando son activados *in vitro* por interferón gamma (INF- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lipopolisacáridos y factor estimulante de colonias 1 (FEC-1). Se ha observado en modelos animales con absceso hepático amebiano, como en el caso de animales susceptibles a la amibiasis hepática como el gerbo y el hámster, que la inoculación de amibas en hígado provoca la rápida aparición de infiltrado de leucocitos PMN y macrófagos, los cuales podrían participar en el daño hepático por la lisis de éstos (Mattern y Keister, 1977; Tsutsumi y cols., 1984). La infección por *E. histolytica* se asocia con alteración en la función de los macrófagos (Campbell y Chadee, 1997), la amiba patógena causa lisis directa de los macrófagos y otras células. Por el contrario, en animales resistentes, como el ratón, la inoculación de amibas en el hígado también provoca la rápida aparición de un infiltrado predominantemente de PMNs, los cuales rodean a las amibas, lo cual aparentemente contribuye a eliminarlas. Se ha observado que macrófagos activados con linfocinas destruyen un 55 % de amibas (3 h), pero un 40 % de los macrófagos son también destruidos. La muerte de los macrófagos parece más bien deberse al efecto deletéreo de los lisados amebianos que al efecto dependiente de contacto de las amibas. El mecanismo efector de los macrófagos es dependiente de contacto directo, dependiente de formación de H₂O₂ y de mecanismos no oxidativos, ya que los macrófagos activados de paciente con enfermedad granulomatosa crónica también son capaces de destruir amibas (Salata y cols., 1985).

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 interferón γ y lipopolisacáridos, está reducida la habilidad para presentar antígenos a linfocitos T por disminución en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II, aumento en la producción de metabolitos del ácido araquidónico, principalmente la prostaglandina E₂, leucotrienos C₄ y B₄ que disminuyen la producción de enzimas efectoras 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, adherencia y migración de neutrófilos,

modulación en la producción de metabolitos oxidativos (H_2O_2 , O_2^-) y no oxidativos (óxido nítrico, enzimas) e ineffectividad en la lisis amebiana (Campbell y Chadee, 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 ameba o sus productos (Campbell y Chadee, 1997; Ventura-Juárez y cols., 2002). *E. histolytica* produce un factor de bajo peso molecular que inhibe *in vitro* la quimiotaxis, quimioquinesis y desplazamiento al azar de monocitos humanos sin efecto sobre neutrófilos y eosinófilos. El factor es producido por amebas con diferentes grados de patogenicidad y virulencia, así como en cepas no patógenas, conocido como el factor inhibidor de la migración de monocitos (FILM) (Kretschmer y cols., 1985). El factor puede contribuir a la escasa reacción inflamatoria que se observa en las etapas avanzadas de la amebiasis invasora y posiblemente a la falta de tejido de cicatrización (Rico y cols., 2003).

En un caso de múltiples episodios de AHA, durante un periodo de 4 años, se encontró disminución en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno como ion superóxido, H_2O_2 , etcétera, mecanismos importantes de resistencia por parte de los macrófagos. En este mismo sentido, la depresión de la actividad de macrófagos inducida por sílica o por suero anti-macrófagos incrementa la severidad del AHA y su estimulación con BCG disminuye el daño tisular (Morán y cols., 2002).

Los **neutrófilos o PMN** tienen un papel relevante en la patogénesis del AHA, son la defensa celular más temprana frente a la ameba en el hígado, aparecen una hora luego de la inoculación. La interacción de los parásitos con los polimorfonucleares está dada entre otros factores por la lectina inhibible por D-Galactosa (Ravdin y Kelsall, 1994; Burchard y cols., 1993). Este paso es importante en la destrucción de las células blanco (Ravdin y Kelsall, 1994). La inhibición de la adherencia se acompaña de inhibición de la histólisis y fagocitosis de las células blanco (Burchard y Bilke, 1992) (Burchard y cols., 1993).

Los PMN humanos son incapaces de matar a las amebas de cepas virulentas, ya que se ha observado que *E. histolytica* puede lisar los neutrófilos *in vitro*, aun a una relación de 3,000 PMN por cada trofozoíto, ocasionando liberación de su contenido, lo que sugiere que parte del daño visto en el absceso hepático proviene de los mediadores liberados por los neutrófilos (Guerrant, 1981), aunque también se ha reportado lisis de leucocitos distantes a las amebas. Por lo tanto *E. histolytica* cuenta con dos mecanismos de citopatogenicidad: a) citólisis dependiente de contacto, que requiere de función intacta de microfilamentos (fagocitosis) y b) mecanismo amebicida

a distancia (Sustancias Liberadas tales como cistein–proteasas, amebaporos, toxinas, enzimas que degradan matriz extracelular, etcétera) (Ventura-Juárez y cols., 2002).

Estudios han evidenciado lesiones más grandes en ratones neutropénicos que en ratones normales a los 2 y 4 días luego de la inoculación, sin alcanzar significancia estadística a los 7 días y con ausencia completa del halo inflamatorio alrededor de la región necrótica, probablemente en este momento juegan un papel importante otros tipos celulares para el control de la infección como los macrófagos o linfocitos citotóxicos. Estos estudios muestran el papel de los neutrófilos en la resistencia a la infección y sugieren la capacidad de *E. histolytica* en la producción de daño hepático en ausencia de células inflamatorias (Velázquez y cols., 1998; Seydel y cols., 1997).

E. histolytica al parecer escapa a la actividad citotóxica de las moléculas liberadas por los neutrófilos a través de diversas enzimas como la superóxido dismutasa que liga hierro, la óxido reductasa de NADPH-flavina, la oxidasa de NADPH, generadora de H_2O_2 , y otros mecanismos aún no explicados. No hay evidencia de cómo el parásito escapa a las moléculas citotóxicas de los neutrófilos, alternativamente se ha especulado que los neutrófilos presentes en la lesión no se encuentran activados dado que se ha evidenciado su actividad amebicida cuando han sido previamente activados con INF- γ o TNF- α . Lo contrario ocurre con la *E. dispar* contra quienes son altamente efectivos en eliminarla en las primeras 96 horas luego de la inoculación. Todo lo anterior indica un papel crítico de los neutrófilos en resistencia temprana al AHA (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Seydel y cols., 1997).

Respecto a la participación de los neutrófilos en la destrucción de la amiba en el hígado de especies resistentes, se ha observado que los leucocitos no son necesarios para eliminar trofozoítos en hígado de rata. En ratas Wistar la inyección intraportal de *E. histolytica* virulenta provoca rápida acumulación de leucocitos alrededor de las amibas, las cuales desaparecen en cinco horas, sin daño hepático. Además, la leucopenia por radiación no modifica la evolución de las lesiones, excepto porque no hay leucocitos alrededor de las amibas, las cuales desaparecen al mismo tiempo (Pérez-Tamayo y cols., 1992). La radiación que disminuye la población de leucocitos circulantes (incluyendo monocitos) radio-sensibles no reduce la resistencia natural de la rata, lo cual sugiere que los polimorfonucleares y monocitos circulantes no contribuyen a la resistencia a la amibiasis. Estos resultados en conjunto sugieren que la inmunidad mediada por células no parece ser crítica para la defensa del ratón a la invasión hepática por la amiba (Jarillo Luna y cols., 2002). Sin embargo, estudios recientes parecen apoyar la idea de que los neutrófilos participan en la resistencia innata a *E. histolytica* en hígado de ratón. En un modelo de ratones SCID susceptibles a desarrollar amibiasis hepática (Seydel y cols., 1997), la reducción de los neutrófilos,

mediante anticuerpos monoclonales, incrementó el tamaño de los abscesos. No se observó el anillo de neutrófilos que rodean a los trofozoítos en los ratones SCID testigos. Estos datos sugieren que los neutrófilos desempeñan un papel protector en la respuesta temprana del hospedero a la infección hepática (Seydel y cols., 1997); esto fue confirmado en ratones Balb/c normales tratados con anticuerpo monoclonal antineutrófilos (Velázquez y cols., 1998). Sin embargo, las lesiones de necrosis lítica no alcanzan la magnitud de las que se observan en el hámster o jerbo, lo cual sugiere que otros mecanismos participan en la muerte de los trofozoítos.

Los **eosinófilos**, al igual que los neutrófilos y los macrófagos, son destruidos por *E. histolytica in vitro*, sin embargo, si los eosinófilos se encuentran activados son amebicidas. Los eosinófilos se encuentran en fases tempranas del AHA en contacto directo con el trofozoíto, la presencia de eosinofilia se asocia a la protección contra desarrollo de AHA y la presencia de eosinopenia se asocia con mayor mortalidad en estudios experimentales, sugiriendo una participación activa del eosinófilo en la protección de amibiasis invasiva (López-Osuna y cols., 2000). En otros estudios se ha observado que existe una disminución de la respuesta inmune celular en amibiasis humana (Morán y cols., 2002).

Experimentos *in vitro* han demostrado el papel de diversas citocinas (INF- γ , TNF- α , Factor Estimulante de Colonias uno (FEC-1), IL-2 y otras en la activación de macrófagos y neutrófilos para destruir *E. histolytica*. De igual forma se ha encontrado que el óxido nítrico 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 y Martínez-Palomo, 2000; Seydel y cols., 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 óxido nítrico sintetasa inducible (Campbell y Chadee, 1997).

La identidad de las moléculas amebianas involucradas en la modulación de la respuesta inmune del huésped es desconocida, los receptores y la interacción con éstos, 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 *E. histolytica* tienen efectos inmunoprotectores más que inmunosupresores debido a que contra estas moléculas se desarrolla respuesta inmune humoral (Campbell y Chadee, 1997).

En estudios recientes de lesiones amebianas intestinales observamos presencia de neutrófilos, macrófagos, células Nk, eosinófilos, mastocitos, células B y células T en cercanía a las amibas, en poca cantidad, pero nunca en contacto con los trofozoítos. Atención especial merecen los macrófagos, neutrófilos, células Nk, eosinófilos y mastocitos que disminuyeron su presencia en los tejidos humanos infectados, en comparación con tejidos de personas aparentemente sanas (Ventura-Juárez y cols., 2007).

1.4. Inmunidad Humoral Frente a *E. histolytica*

No hay duda que la infección por *E. histolytica* provoca una respuesta humoral, los anticuerpos son producidos en la amibiasis sintomática, pero también en la amibiasis asintomática, probablemente como resultado de la invasión subclínica controlada (Trissl, 1982; Ximenez y cols., 1993).

Se ha demostrado el aumento de anticuerpos circulantes en pacientes con AHA, predominantemente **IgG** que puede detectarse una semana luego de iniciados los síntomas en humanos y animales de experimentación (Martínez-Palomo, 1989). Estos anticuerpos, principalmente IgG, se mantienen años después de la amibiasis invasiva (Hughes y Petri, 2000; Ravdin y Kelsall, 1994), probablemente por la persistencia de antígenos amebianos en las células del sistema macrófago-monocítico (Ximenez y cols., 1993; Knobloch y Mannweiler, 1983; Salata y Ravdin, 1986; Valenzuela y cols., 2001). En síntesis, de todas las inmunoglobulinas, la IgG ha sido la más consistente en pacientes con amibiasis sintomática (Abioye y cols., 1972).

La IgE sérica también puede aumentarse, aunque en menor grado, no muestra correlación con amibiasis invasiva (AHA o colitis amebiana) (Abioye y cols., 1972). En otro estudio, 83% de los pacientes desarrolló IgA y 10% IgE séricas contra *E. histolytica*. Niveles elevados de IgM se correlacionan con pacientes con AHA ($p < 0,01$). En otro estudio se encontró IgM específica contra lectina de adhesión hasta en 45% de los pacientes con colitis amebiana (Abd-Alla y cols., 1998).

Niveles elevados de IgA secretoria se encuentran en pacientes con AHA, tanto en pacientes con enfermedad aguda como en pacientes con enfermedad ya tratada hasta 8 meses previos ($p < 0,002$) (Kelsall y cols., 1994). La IgA secretoria bloquea la adherencia de trofozoítos a las células epiteliales intestinales, se ha destacado su papel protector en resistencia a la reinfección, aunque de manera transitoria. Un

estudio reciente demostró que niños con IgA secretoria en el tracto gastrointestinal tienen 64 % menos infecciones por el parásito al compararse con pacientes que no la presentan, en contraste, la IgG no fue relacionada con protección (Stanley, 2001; Haque y cols., 2000). Se ha visto que las cisteinproteasas de *E. histolytica* degradan tanto IgA como IgG, lo cual puede limitar la efectividad de la respuesta humoral del huésped (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).

En otros estudios de AHA se han determinado niveles de IgM y se ha observado que su presencia no es tan marcada como ocurre con IgG, y por tanto no diferencia una infección pasada de una reciente (Jackson y cols., 1984); en el estudio de Pinilla y colaboradores se reporta una sensibilidad de 18% y especificidad de 100% para un punto de corte de 0,511 de ELISA IgM (Pinilla y cols., 2004); otro estudio utilizando detección de IgM específica contra lectina de adhesión tiene mayor sensibilidad (Sathar y cols., 1988). Es importante tener en cuenta que mediante las técnicas de biología molecular como el PCR se puede diferenciar una infección reciente de una pasada con reportes de sensibilidad y especificidad mayores del 90% (Zengzhun y cols., 1999; Haque y cols., 2000).

Se ha observado en el suero de pacientes con amibiasis invasiva previa o pacientes infectados que tienen títulos altos de anticuerpos contra el trofozoïto de *E. histolytica*, resulta ser amebicida a través de activación del complemento; en algunos pacientes con AHA se encuentran niveles bajos de C3 y normales de C1, un hallazgo que sugiere activación de la vía alterna del complemento (Salata y Ravdin, 1986), generando componentes que pueden lisar *E. dispar* y a los cuales escapa *E. histolytica*, su resistencia está dada en virtud a la lectina de adhesión de 170 kDa que tiene reactividad cruzada antigénica con la proteína CD59 de las células sanguíneas, proteína reguladora del complemento, al inhibir la inserción en la membrana de C9 (Petri y cols., 1991).

Por otra parte, las anafilotoxinas C3a y C5a (potentes estimulantes de respuesta inflamatoria) son degradadas por cisteinproteasas amebianas, mecanismos que se han implicado en la patogenia de la amibiasis, considerándose un factor necesario para la invasión o diseminación *in vivo* (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Reed, 2000). Se ha demostrado que cepas aisladas causantes de AHA son resistentes a lisis mediada por complemento y la inducción de depleción del complemento aumenta la susceptibilidad para desarrollar AHA (Salata y Ravdin, 1986).

La contribución de la respuesta humoral a la inmunidad protectora no ha sido establecida, aparentemente no previene infecciones posteriores que pueden ocurrir inclusive con títulos altos de anticuerpos, esto es sorprendente dado que estudios en ratones inmunodeficientes y realizando transferencia pasiva de anticuerpos contra proteína rica en serina y cisteína de *E. histolytica*, lipofosfoglicanos y lectina de adherencia de 170 kDa han resultado en protección contra la formación de AHA y reducción en tamaño del absceso de 24,5 % a 3,5 % ($p < 0,0001$) (Haque y cols., 2000; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Reed, 2000). Además, el suero inmune tiene efectos citolíticos sobre trofozoítos, inhibe su crecimiento, neutraliza la virulencia e inhibe la eritrofagocitosis, lo cual sugiere el papel protector de los anticuerpos, aunque para algunos autores esto es discutible, lo que no se pone en duda es su valor en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos de la amibiasis (Martínez-Palomo, 1989).

Con base en lo antes expuesto, se considera que tanto la inmunidad celular como la humoral no son efectivas contra *E. histolytica* invasiva, por lo que resulta de importancia estudiar mecanismos neuroinmunes mediados por el sistema nervioso autónomo en la regulación de la inmunidad innata durante el AHA.

1.5. Interacción Neuro-Inmune

En la década de 1970 Branislav D. JaNkovic un pionero de la neuroendocrino-inmunología, sostenía que el sistema inmune debería considerarse un multisistema integrado por elementos neuroendocrinos e inmunes (Correa y cols., 2007). Como se conoce, todos los órganos de la Respuesta Inmune están inervados y casi todos los receptores para neurotransmisores están presentes en las células inmunes. Estos hechos han creado la ciencia llamada neuroinmunología, que examina las interacciones homeostáticas entre los sistemas inmune y nervioso en los procesos de resistencia del hospedero. Hay mucha evidencia *in vitro* que muestra un papel regulador de diversos neurotransmisores sobre las células del sistema inmune; por ejemplo, en general los glucocorticoides, la acetilcolina y los andrógenos deprimen la respuesta inmune, mientras que los estrógenos, la hormona del crecimiento, la tiroxina, noradrenalina y la insulina hacen lo opuesto (Roitt y cols., 2003). Sin embargo, las comunicaciones complejas creadas por las interacciones inmuno-neurales en los sitios del reto antigénico y dentro de los órganos inmunes no pueden llevarse a cabo en cultivo de tejidos, por ejemplo en timo, bazo y ganglios linfáticos que están ricamente inervados por el sistema nervioso simpático. En estas terminales

nerviosas la enzima dopamina beta-hidroxilasa cataliza la conversión de dopamina en el neurotransmisor noradrenalina, que es liberada de las neuronas simpáticas a estos tejidos, este neurotransmisor tiene función quimiotáctica. Los ratones en los que se produjo la delección del gen de esta enzima por recombinación homóloga fueron más susceptibles a la infección por patógenos intracelulares, y en ellos hubo un mayor deterioro de la producción de citocinas tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α en respuesta contra la infección. Estas observaciones sugieren que la noradrenalina puede desempeñar un papel importante en la determinación de la potencia de la respuesta inmune. Por otro lado, se ha observado que los nervios simpáticos que inervan ganglios y vasos linfáticos están involucrados en la regulación del flujo de linfa y pueden participar en el control de la migración de las células dendríticas que tienen receptores beta-adrenérgicos, desde los sitios inflamatorios hasta los ganglios linfáticos locales (Roitt y cols., 2003). En experimentos previos se ha demostrado que la denervación simpática de la piel muestra una infiltración leucocitaria muy reducida en respuesta al daño local, lo que relaciona a este sistema con el reclutamiento de leucocitos (Roitt y cols., 2003; Correa y cols., 2007).

Estos hechos han enfocado la atención sobre sistemas de modelos *in vivo*. Los experimentos mostraron que los nervios son importantes reguladores de los órganos linfoides y también de las reacciones inflamatorias/inmunes. Así, el **Sistema Nervioso Central (SNC)** regula el sistema inmune a través de dos principales mecanismos: (a) la respuesta al estrés hormonal con producción de glucocorticoides mediante el eje hipotálamo hipófisis adrenal y (b) el **Sistema Nervioso Autónomo (SNA)**, con la liberación de noradrenalina y acetilcolina. El SNC puede también regular el sistema inmune de manera local, vía el **Sistema Nervioso Periférico (SNPe)**, con la liberación de neuropéptidos como la sustancia P y la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) liberada localmente (Crofford y cols., 1992). Por lo tanto, el SNC regula al sistema inmunitario a través de rutas sistémicas, regionales y locales; el **SNPe** provee una primera línea de activación de defensa al sitio local de la inflamación a través de la liberación de neuropéptidos que generalmente incrementan la respuesta inflamatoria local. El **Sistema Nervioso Simpático (SNS)** (ó adrenérgico) y el **Sistema Nervioso Parasimpático (SNP)** (o colinérgico) por lo general inhiben el proceso inflamatorio a nivel regional, a través de la inervación de órganos inmunes y donde se desarrolla el proceso inflamatorio. La respuesta neuroendocrina controla la respuesta inflamatoria a través de la activación de los ejes hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), por medio del efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides liberados por la corteza adrenal, por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) a través de hormonas liberadas desde los

ovarios y testículos y por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) por medio de hormonas tiroideas liberadas desde la glándula tiroides (Sternberg, 2006).

La conexión más conocida entre los sistemas inmune y neuroendocrinos, es la formada por el eje HHA, en el que cuando ciertos tipos celulares del sistema inmune en reacción a una respuesta a patógenos secretan las citocinas: IL-1, la IL-6 y el TNF- α , las cuales estimulan vías aferentes vagales que estimulan al hipotálamo, liberando corticotrofina (CRF), esta hormona a su vez estimula la hipófisis para secretar la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), la cual estimula las glándulas suprarrenales que secretan los glucocorticoides. Este eje de regulación se esquematiza en la figura 5. Los glucocorticoides regulan la actividad de las células Th1 y macrófagos, de modo que se completa el circuito de retroalimentación negativa (Lapid-Volosin y cols., 2004).

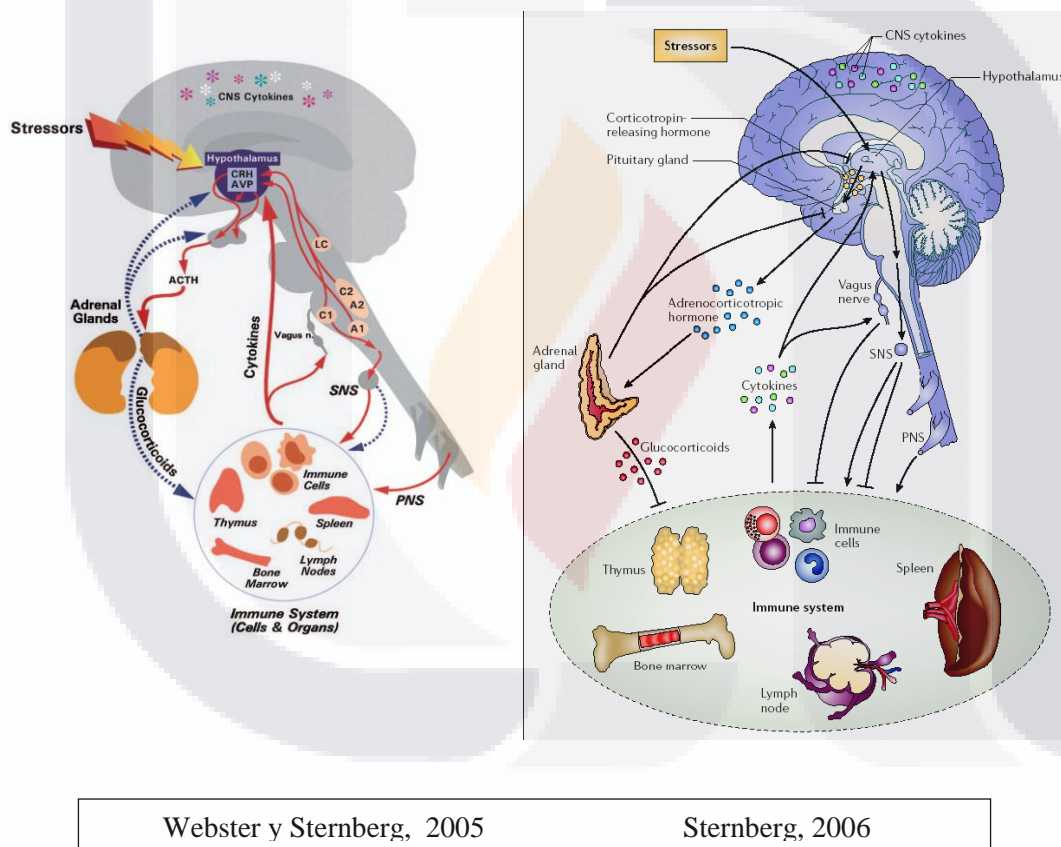


Figura 5. Comunicación bidireccional entre el sistema Inmune y el SNC. El eje hipotálamo- hipófisis- suprarrenal (HHS) regula las concentraciones sistémicas de cortisol producido por la glándula suprarrenal a través de la regulación del factor liberador de corticotrofina (CRF) y de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). A su vez, la vía neuronal regida por estímulos provenientes del hipotálamo y del sistema nervioso autónomo, influye sobre la función inmune a través de neurotransmisores y neuropéptidos que interaccionan con linfocitos T, B, células dendríticas y macrófagos. Por otro lado, las citocinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1 e IL-6 modulan funciones nerviosas a través de nervios sensoriales aferentes (Nervio Vago), localizados en órganos linfáticos secundarios y en los tejidos inflamatorios (Sternberg, 2006).

1.5.1 El Sistema Nervioso Autónomo

El sistema nervioso parasimpático (SNP)

El **SNP (o colinérgico)** es una división del sistema nervioso autónomo que consiste en fibras nerviosas proyectadas desde las porciones craneal y sacra del sistema nervioso central y que se extiende a células nerviosas (ganglio) en sitios específicos. Estas fibras son distribuidas a vasos sanguíneos, glándulas y otros órganos internos. Las funciones del parasimpático incluyen, entre otras, la disminución del gasto cardíaco, glucogénesis hepática, contracción de la vesícula biliar, secreción de insulina y jugos gástricos; dilatación de los vasos sanguíneos periféricos y contracción de los bronquios, constricción pupilar y estimulación del peristaltismo en el tubo digestivo.

El SNP modula la respuesta inmune a nivel regional a través de fibras eferentes y aferentes del nervio vago, este nervio también es el responsable de enviar la señal de aviso desde un sitio inflamado al cerebro, a través de receptores para IL-1 expresados por células paraganglionares localizadas en ganglios parasimpáticos (Sternberg, 2006).

El neurotransmisor parasimpático es la **acetilcolina** que se une a dos tipos de receptores; nicotínicos y muscarínicos; cada uno consiste en varias subunidades que heterodimerizan en las células y tejidos específicos para los diferentes efectos colinérgicos. Hay receptores colinérgicos en células inmunes, pero sólo receptores nicotínicos median específicamente efectos anti-inflamatorios en macrófagos y neutrófilos.

Dentro de los receptores colinérgicos, principalmente expresados en macrófagos y neutrófilos, está el nicotínico $\alpha 7$. La activación de este receptor sobre macrófagos inhibe la activación del factor de transcripción NF- κ B, inhibiendo a su vez la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, también se afecta o se inhibe JAK2 y de esta manera se inicia la acción de factores anti-inflamatorios como STAT3 y SOCS3.

Durante la fase de inflamación, las fibras colinérgicas liberan acetilcolina, que inhibe la producción de TNF- α por los macrófagos. Se ha descrito que durante el shock tóxico a través de la liberación de la acetilcolina desde el vago tiene un importante papel en prevenir el exceso de inflamación. Animales vagotomizados inyectados con lipopolisacárido, mueren por el llamado choque séptico, debido a la exacerbada respuesta inflamatoria secundaria a la elevada producción de TNF- α . En conclusión, la acetilcolina inhibe la producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias al contacto con un antígeno (Borovikova y cols., 2000; Sternberg, 2006).

El efecto del SNP sobre el tráfico de leucocitos es menos conocido; se ha demostrado que la acetilcolina estimula macrófagos e incrementa la producción de CCL2, quimiosina atrayente de linfocitos. Por otro lado, el estímulo del nervio vago y secreción de acetilcolina tiene efecto sobre receptores colinérgicos en el endotelio vascular, donde inhiben el reclutamiento de células por la supresión de la expresión de VCAM1 en células endoteliales (Sternberg, 2006).

Por otra parte, vías aferentes parasimpáticas proporcionan señales de retroalimentación hacia el SNC desde los sitios de daño, infección e inflamación. Por ejemplo, el nervio vago lleva de regreso las señales hacia el SNC desde los órganos viscerales, para posteriormente activar el eje HHA y modular la respuesta inmune a la infección mediante la liberación de glucocorticoides, como ya se había mencionado, (EleNkov y cols., 2000; Befus y cols., 1999).

El sistema nervioso Simpático (SNS)

El **SNS (o adrenérgico)** es la otra división del sistema nervioso autónomo, consiste en fibras que se proyectan desde el sistema nervioso central, a los ganglios paravertebrales de la médula espinal y algunos paraganglios, desde donde inervan a los órganos blanco, como: corazón, riñones, intestino, bazo, glándulas, etcétera. En general, los nervios simpáticos dilatan la pupila, constriñen los vasos sanguíneos periféricos e incrementan el gasto cardíaco (Sternberg, 2006).

Durante las infecciones y en paralelo con la respuesta de fase aguda, se activa el sistema nervioso simpático, incluyendo la liberación masiva de las Catecolaminas (Cas) adrenalina y noradrenalina, hacia la circulación general. Las Cas son reguladores importantes de la respuesta de fase aguda, que es una reacción de defensa de emergencia (Sternberg, 2006).

La **noradrenalina (NA)** y el **neuropéptido Y (NPY)** coexisten en las fibras adrenérgicas post ganglionares que llegan a los tejidos linfoides. Se ha descrito que la interacción de estos neurotransmisores con sus receptores específicos en las células inmunes, se hacen en dos principales patrones: la NA es activadora de las funciones celulares inmunes principalmente de las células Nk, macrófagos, linfocitos T y B; mientras que el NPY tiene funciones inhibitoras o inmunomoduladoras sobre las mismas células, principalmente sobre las Nk, las fibras nerviosas que contienen NPY acompañan a los vasos sanguíneos regulando el flujo sanguíneo. La administración de Cas en humanos induce al aumento de la migración de las células NK en las primeras

2-4 hrs, aunque a lo largo del tiempo induce una disminución de sus funciones, en mayor medida atrae a los granulocitos hacia los sitios específicos.

El efecto de las Cas sobre la inmunidad celular adquirida es inhibir la respuesta Th1 y activar la respuesta Th2 (inmunidad humoral). Como se sabe, el principal factor que gobierna el resultado de las infecciones es la selección de una respuesta Th1 o Th2 de la respuesta inmune adaptativa durante y después de la invasión inicial del huésped (EleNkov y cols., 2000), las Cas también afectan la inmunidad innata, al inhibir la fagocitosis y la liberación de enzimas lisosomales por los neutrófilos (Zurier y cols., 1974), a dosis bajas inhiben el estallido respiratorio de los neutrófilos asociado con la desgranulación (Nelson, 1987); aún más, la generación de superóxidos y la formación de radicales de oxígeno son suprimidos a concentraciones nanomolares de adrenalina, estos efectos se dan por la estimulación de receptores beta adrenérgicos (beta 2). Por otra parte, también se conoce que los efectos sobre la inmunidad innata y adquirida, son activados y modulados por las Cas si éstas interactúan con los receptores alfa adrenérgicos. En presencia de 2 potentes quimioattractantes, el leucotrieno B4 y el formil-metionil-leucil-fenilalanina, la estimulación de receptores beta también inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos humanos (EleNkov y cols., 2000).

En el estudio de los efectos del SNS se emplean bloqueadores de la síntesis de catecolaminas, entre los que destacan la 6-hidroxidopamina y la 5-hidroxidopamina, cuyo efecto es inducir la atrofia reversible de las terminales noradrenérgicas a través de una pérdida de la integridad de la membrana, provocada por la disminución de producción de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Picklo, 1997). Como resultado, los receptores adrenérgicos de los linfocitos no son activados modificando así las funciones de las células inmunes dependientes de este sistema (Ackerman y cols., 1991).

1.6. Inervación del Hígado

El hipotálamo se relaciona con el hígado a partir del núcleo ventromedial que envía señales simpáticas a través del ganglio celíaco; mientras que el área lateral hipotalámica le envía señales parasimpáticas por la vía del nervio vago. Los diferentes nervios que inervan el hígado liberan noradrenalina y acetilcolina, así como neuropéptidos como la sustancia P, Neuropéptido Y, polipéptido intestinal vasoactivo, somatostatina, glucagon, neurotensina, serotonina y galanina (Roskams y cols., 2004).

Los nervios aferentes al hígado llegan por la vena porta, la arteria hepática o el conducto biliar antes de entrar al parénquima. Los nervios somáticos se originan en los segmentos medulares espinales de T-7 a T-10 e inervan al hígado por vía del ganglio celíaco, mientras que las fibras parasimpáticas se proyectan al hígado desde el nervio vago (Winfried y cols., 2004)

1.7. Células Inmunes del Hígado

Las células inmunológicas más abundantes en el hígado son las células de Kupffer, que representan a los macrófagos residentes del hígado, bajo estimulación producen varias citocinas pro-inflamatorias: TNF α e IL-1. Las células T son del tipo CD4, CD8 y NKT1, éstas últimas representan del 20% de la población hepática de células T; también hay muchas células Nk que aumentan durante la inflamación hepática y se activan para inducir muerte por citotoxicidad. Las células dendríticas están concentradas en las áreas periportales y las venas hepáticas sublobulares, así como en la cápsula de Glison, es decir, en lugares opuestos a donde se localizan las células de Kupffer. Las células T se distribuyen a lo largo de las tríadas portales. Las moléculas ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina se activan en las células endoteliales por TNF α , por lo tanto promueven la migración leucocitaria a través de sus paredes. La hepatitis provocada en ratones a quienes se ha inducido degeneración de los nervios adrenérgicos por tratamiento previo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), sufren una fuerte exacerbación del proceso inflamatorio, indicado por una drástica elevación plasmática de TNF α , el efecto se puede revertir por el tratamiento con un inhibidor de 6-OHDA. Se ha demostrado la presencia de receptores adrenérgicos en células T, macrófagos, células dendríticas y también en los hepatocitos; el efecto de la adrenalina sobre las células inmunes a través de receptores β 2 es disminuir la producción de citocinas, mientras que en los hepatocitos es de aumentar la glicogenólisis (Winfried y cols., 2004).

2. Justificación

Existen dos tipos de respuesta inmune contra *E. histolytica*, la adquirida y la innata. Con respecto a la primera se sabe mucho acerca de componentes y mecanismos de modulación, incluso se ha visto que la respuesta humoral contra *E. histolytica* se desarrolla tanto a nivel sistémico (IgG) como local (IgA) en el ser humano (Ravdin y Kelsall, 1994; Stanley y cols., 1998; Stanley, 2001) y en modelos animales (Prabir y cols., 2000), lo que indica que la respuesta inmune adquirida se induce de manera temprana durante la invasión por el parásito, pero la contribución de la respuesta humoral a la inmunidad protectora no ha sido establecida. Y con relación a la respuesta inmune innata se conoce poco, ya que se ha demostrado que la función que pudiera estar desempeñando en los individuos, es específica contra este parásito, en una inmunidad protectora, esta respuesta es representada por las células NK, neutrófilos y macrófagos. Esta inmunidad innata contra *E. histolytica* no está del todo dilucidada. Con base en lo que se ha estudiado en diferentes modelos animales, sería importante conocer la posible influencia reguladora que puede tener el sistema nervioso autónomo sobre las células del sistema inmune innato en el hígado ante agresiones por parásitos en modelos susceptibles como la amibiasis hepática en hámster, este posible mecanismo es importante en la activación de células inmunes y su intervención en la inmunomodulación para alcanzar la homeostasis.

3. Planteamiento del Problema

Como se indagó con anterioridad, ciertas células del sistema inmune innato tales como neutrófilos y macrófagos pueden destruir *in vitro* a trofozoítos de *E. histolytica*, por otra parte, hay evidencias de que en animales resistentes tales como el ratón y la rata los neutrófilos son importantes para evitar la invasión amebiana del hígado. Por el contrario, en el hámster (modelo susceptible) los neutrófilos y macrófagos no parecen ser capaces de destruirla, al igual que pasa con el humano, ya que se han observado distintos compuestos que libera *E. histolytica* a distancia, los cuales inhiben la acción de estas células inmunes, aún más, estas células pueden ser responsables del daño de los hepatocitos y contribuir a la formación de los abscesos. Por lo tanto, la susceptibilidad del hámster puede depender de diferencias en los mecanismos y grados de activación de estas células, así como puede estar relacionado con diferentes grados de activación del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) por la liberación de ciertos neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas que pudieran tener efectos sobre el sistema inmune ante esta parasitosis.

4. Hipótesis

Si el Sistema Nervioso Autónomo (simpático y parasimpático) participa en la regulación de la respuesta inflamatoria a la infección hepática por *E. histolytica*, ocurrirán cambios en las características de la respuesta inflamatoria en los animales infectados parasimpatectomizados o simpatectomizados.

5. Objetivo General

Analizar la participación de los sistemas simpático y parasimpático en el proceso inflamatorio en la infección hepática por *E. histolytica* en el hámster.

6. Objetivos Particulares

1. Establecer las técnicas de denervación simpática y parasimpática.
2. Analizar los cambios morfológicos e histológicos del hígado durante la infección con trofozoítos de *E. histolytica*.
3. Evaluar los efectos de la simpatectomía y parasimpatectomía hepática sobre las células de la respuesta inmune innata durante la infección amibiana.
4. Correlacionar los efectos de la simpatectomía y parasimpatectomía hepática con citocinas anti y pro-inflamatorias durante el desarrollo de la infección amibiana

7. Material y Método

7.1. Animales

Hámsteres machos dorados (*Mesocricetus auratus*), de 6 a 8 semanas de edad, de 100 a 150 g de peso, fueron previamente tratados con metronidazol (7.5 mg/ kg/5 días) para eliminar parásitos intestinales. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz/oscuridad (12:12), la dieta consistió en trozos de Purina y agua *ad libitum*. Los animales fueron divididos en seis grupos de 6 animales cada uno: tres grupos se utilizaron para estudiar los efectos de la vagotomía: control (animal intacto), falsa vagotomía (sham-vagotomizado) y vagotomizado (vag) (con sección de las ramas aferentes vagales al hígado). Los tres grupos restantes se utilizaron para el estudio de los efectos de la simpatectomía química: control (animal intacto), falsa simpatectomía (sham+solución salina) y simpatectomía química (sim) (5-hidroxidopamina). Los animales fueron tratados de acuerdo con las reglas de la Comisión de bioética de la

Universidad Autónoma de Aguascalientes, acorde con la guía NHI para la investigación con animales (Guía para el cuidado y uso de animales del laboratorio, 2002).

7.2. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* en medio axénico.

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS (Fase V virulenta) se cultivaron en medio axénico de acuerdo con el procedimiento de Diamond (1978) (apéndice A).

7.3. Vagotomía quirúrgica en el hámster

El procedimiento quirúrgico de la vagotomía ha sido descrito por Tanaka y cols (1987). Brevemente, la vagotomía se realizó bajo microscopio de disección (Carl Zeiss West Germany OPMI 19-FC), seccionando la rama hepática vagal, la cual procede del tronco vagal anterior, que atraviesa la cara anterior del esófago, inmediatamente por debajo de su emergencia subdiafragmática. Una vez identificada la rama nerviosa que se dirige al hilio hepático se disecciona y se secciona en una longitud de un cm aproximadamente. Para completar la vagotomía de fibras procedentes de otras fuentes, se cortan las membranas que unen el hígado con el resto del esófago y el estómago.

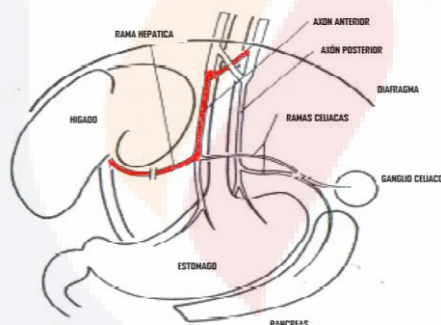


Figura 6. Se esquematiza el sistema abdominal vagal y por lo tanto las ramas axonales que inervan al hígado. La doble línea roja esquematiza la localización para seccionar la rama hepática del nervio vago (Tanaka y cols., 1987).

7.4. Simpatectomía química

El bloqueo de las funciones simpáticas se realizó químicamente administrando 5-hidroxitriptamina a dosis de 40 mg/kg/día/15 días/vía intraperitoneal (EleNkov y cols., 2000; Mircoli y cols., 2002). Al final del tratamiento, los animales se inocularon con los trofozoítos.

7.5. Inducción del absceso hepático amebiano (AHA). Inoculación intrahepática de trofozoítos de *E. histolytica*

Quince días después de la denervación vagal y simpática (Myrtha, 2006), los animales fueron infectados. Brevemente, cada animal fue inoculado con 300,000 trofozoítos

suspendidos en 100 µl de medio de cultivo en el parénquima del lóbulo derecho del hígado, que de forma previa fue expuesto por incisión por planos de las paredes abdominales en condiciones de asepsia. Una vez realizada la inoculación, se procedió a inhibir la hemorragia local con un trozo pequeño de Gelfoam estéril, al final se cerró la pared abdominal por planos. Los animales se sacrificaron a los 7 días como tiempos máximos de infección amebiana. Al sacrificio, se tomaron muestras de tejido hepático, se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina, se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación (Leica RM 2125RT) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE), Mason, PAS (Luna, 1968) e inmunohistoquímica. Otros fragmentos del hígado se fijaron en glutaraldehído, y se procesaron para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Ventura-Juárez y cols., 2002).

7.6. Técnicas de HE, Mason y PAS

Cortes de tejido hepático se tiñeron con HE, Mason y PAS. Apéndices B, C y D (Luna, 1968).

7.7. Inmunohistoquímica para neurofilamentos de bajo peso molecular (NF-68 kDa)

Para esta técnica se requirió realizar fijación del hígado por perfusión cardiaca. Para esto se aplicó solución salina por el ventrículo izquierdo, y posteriormente se cortó el ventrículo derecho para eliminar la sangre de los vasos sanguíneos, una vez que la solución salina que salía por el ventrículo derecho estaba libre de sangre, se pasó una solución de paraformaldehído al 4% para fijación in situ, después se obtuvo el hígado del animal perfundido y de éste la región del hilio, posteriormente la muestra se sumergió en un crioprotector (tissue teck) y se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente obtener cortes de 5 micras en el criostato. Por inmunohistoquímica (apéndice E) se buscó la presencia de neurofilamentos (68 kDa) en fibras nerviosas en esta región del hígado.

7.8. Inmunohistoquímica para neutrófilos, macrófagos, células Nk

Se utilizaron anticuerpos específicos para neutrófilos (Anti-MPO), macrófagos (Anti-CD68) y células Nk (Anti-NKR-P1) (apéndice F).

7.9. Inmunohistoquímica para amibas

Para la inmunotinción de los trofozoítos de *E. histolytica* se utilizó un anticuerpo policlonal conejo anti amiba (anti HM1-IMMS) preparado en nuestro laboratorio (apéndice G).

7.10. Inmunohistoquímica para IFN γ , IL-10 y TNF α

En cortes de 5 μm procesados por parafina, por inmunohistoquímica se identificaron las células positivas para las citocinas TNF- α (sc-8301), IFN- γ (sc-8308) e IL-10 (sc-7888) (apéndice H).

7.11. Cuantificación celular

Para la cuantificación de los diversos tipos celulares se utilizaron las laminillas teñidas con los anticuerpos específicos para cada uno. Se seleccionaron 3 laminillas de cada tipo celular por grupo. Se estudiaron con un microscopio de luz y fluorescencia (Zeiss Axioscope 40/40 FL) y las imágenes se procesaron con el editor de imágenes Image Pro Plus software Versión 4.5.1. El conteo se reportó como la media \pm DE (Desviación Estándar) de los tipos celulares y amibas por unidad de área (mm^2). Las amibas se buscaron tanto dentro como fuera del absceso.

7.12. Cuantificación de glucógeno

Muestras de hígado de aproximadamente 250 mg, fueron obtenidas a los 15 días post-vagotomía y post-simpatectomía y se determinó el contenido de glucógeno utilizando el método de Chan y Exton, 1976 (apéndice I).

7.13. Cuantificación de citocinas séricas por ELISA

Para la determinación sérica de las diferentes citocinas, los animales fueron sangrados en los siguientes tiempos:

- a) Vagotomizados y Sham-Vagotomizados
 - Antes de la intervención quirúrgica
 - A los 15 días post cirugía
 - Al sacrificio (7 días post infección)
- b) Simpatectomizados y Sham-Simpatectomizados
 - Antes del tratamiento con 5-hidroxiopamina ó solución salina
 - A los 15 días de tratamiento farmacológico
 - Al sacrificio (7 días post infección)

- c) A los controles
 - Antes de la inoculación
 - Al sacrificio (7 días post infección)

Las citocinas se midieron utilizando el método de ELISA. Los anticuerpos específicos para cada interleucina están dirigidos contra interleucinas humanas, los cuales detectan también interleucinas de hámster de una manera sensible y confiable (Bilbo y cols., 2002).

En los sueros de todos los animales se determinaron las siguientes interleucinas: TNF- α (Invitrogen, KAC1751), IFN- γ (Biosource, KAC1231) e IL-10 (Biosource, KAC1322), la actividad enzimática de la peroxidasa fue medida a 490nm con un lector de ELISA (microplate reader model 550 Bio-Rad) (apéndice J).

7.14. Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El procedimiento para la impregnación de tejidos en resina LR White se llevó a cabo según lo descrito por Ventura y cols., (2002). Se obtuvieron cortes de 80 nanómetros con un micrótomo Ultracut Leica (R-GA-D/E-1/00), luego se colocaron en rejillas de níquel de 300 cuadros y se contrastó con acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 1%, y se observaron las muestras en el MET (Carl Zeiss TEM EM-910) (apéndice K).

7.15. Análisis estadístico

Los valores se expresan como las medias \pm desviación estándar (DE). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma versión 3.0, utilizando la prueba de t-student y la significancia estadística con la prueba de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se considera diferencia significativa.

8.- Resultados

8.1. Inervación del parénquima hepático en hámster

Se identificó la inervación en el hígado del hámster por cortes seriados en el crióstato, desde el hilio hepático hasta el parénquima hepático, encontrando que la inervación acompaña principalmente a los vasos sanguíneos del tracto portal (Vena Porta, Arteria Hepática y conducto Biliar) hasta el parénquima hepático, como se observa en las figuras 1a y 1b, donde se identifican fibras nerviosas positivas para neurofilamentos de bajo peso molecular (68 kDa). No obstante, en las figuras 1c y 1d se observan fibras positivas para neurofilamentos que se distribuyen entre la red de hepatocitos.

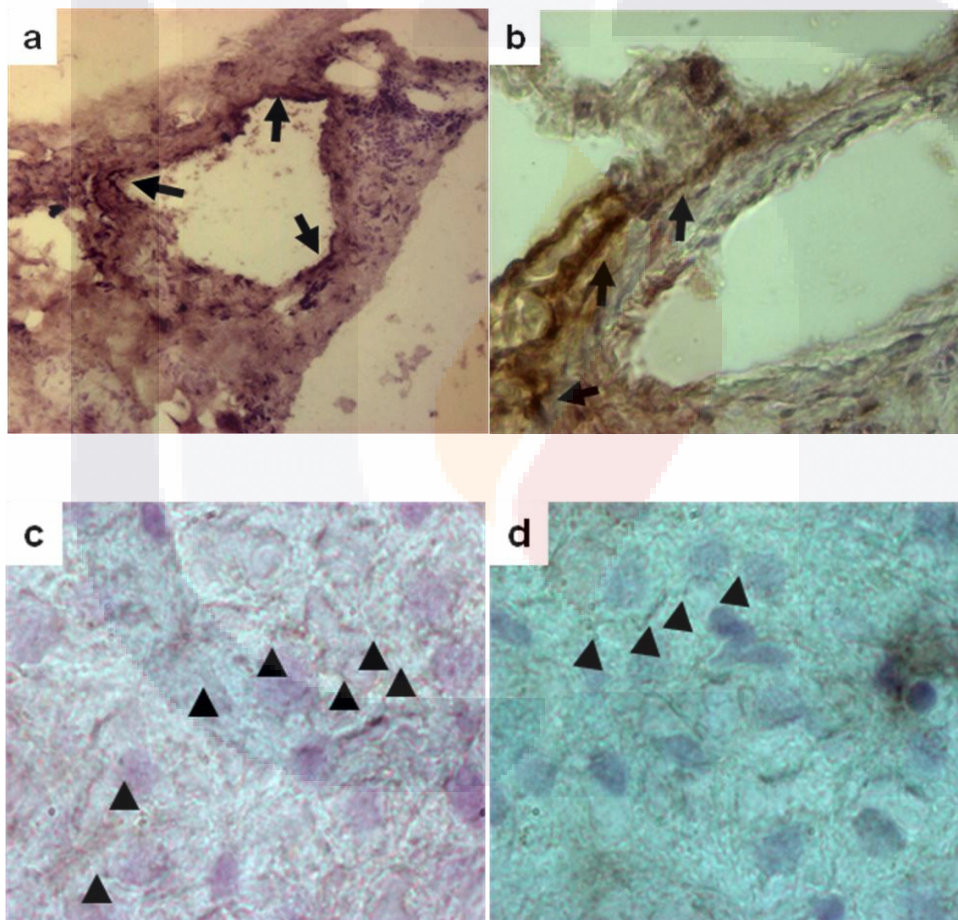


Figura 1. Inervación del hígado de hámster: presencia de fibras positivas para neurofilamentos de bajo peso molecular (Nf-68 kDa) asociadas a vasos sanguíneos del tracto portal (**a y b**); presencia de fibras para este mismo tipo de neurofilamentos en el parénquima entre las laminas de hepatocitos (**c y d**).

8.2. Efecto de la vagotomía sobre la síntesis de glucógeno hepático

Se sabe que la acetilcolina incrementa los depósitos de glucógeno hepático (Gerhard, 2004), por lo que si la vagotomía está bien realizada los depósitos deberán disminuir. Por lo que en este trabajo se decidió incorporar la medición de este parámetro tanto a nivel histológico (tinción de PAS) como su determinación bioquímica (Chan y Exton, 1976). En comparación con los cortes histológicos de los diferentes grupos control y sham, (figs. 2Aa y 2Ab) los animales vagotomizados mostraron una menor intensidad en la reacción histoquímica para el glucógeno (fig. 2Ac) (Luna, 1968). La cuantificación de glucógeno mostró que en comparación con los grupos control y sham, los animales vagotomizados tuvieron significativamente menores niveles de glucógeno ($3,8 \pm 0,13$ mg/ml, versus $4,3 \pm 0,08$ mg/ml de los grupos control fig. 2B) en el grupo vagotomizado, la disminución es corroborada con la técnica histoquímica de PAS, debido a que se observó una menor intensidad en la coloración de los tejidos (fig. 2Ac). Estos resultados sugieren fuertemente que la denervación parasimpática del hígado estuvo bien realizada.

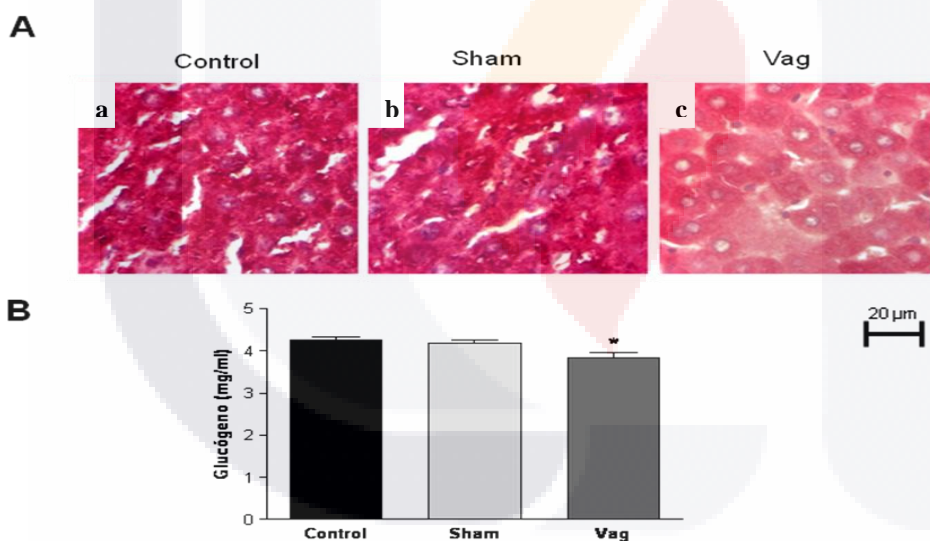


Figura 2. La vagotomía reduce el depósito de glucógeno. **A:** Una visión general de la detección histoquímica de glucógeno por la técnica de PAS (a-c), el depósito de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos disminuyó, 15 días post-vagotomía. **B:** la cuantificación enzimática de glucógeno en 250 mg de tejido hepático muestra una caída significativa en los animales vagotomizados. Los valores representan las medias \pm DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado ($n = 6$) * $p \leq 0,05$ en comparación con el control (t-student).

8.3. Efecto de la vagotomía sobre la morfología de los abscesos

A los 7 días post inoculación de trofozoítos, los animales vagotomizados presentaron abscesos hepáticos de mayor tamaño que los encontrados en los grupos control y sham. La figura 3B muestra la comparación de los pesos hepáticos entre los diferentes

grupos, mostrando que los abscesos indujeron un mayor peso del hígado de los animales vagotomizados ($16,75 \pm 1,79$ g, de los vagotomizados versus $8,5 \pm 1,5$ g, $5 \pm 1,3$ g de los grupos control y sham respectivamente (figs. 3Aa, 3Ab, 3Ac y 3B). La histología hepática de los grupos intacto y sham se caracterizó por presentar un absceso alrededor de la zona de inoculación de los trofozoítos formado por escasas fibras de colágeno alrededor de las áreas de necrosis y abundantes trofozoítos en la periferia (figs. 3A d, e, g, h). A diferencia de los grupos control y sham, los vagotomizados presentaron un solo absceso en el sitio de inoculación de los trofozoítos y un gran número de granulomas no confluentes alrededor del absceso, rodeados por una gran cantidad de fibras de colágeno (figs. 3A f, i).

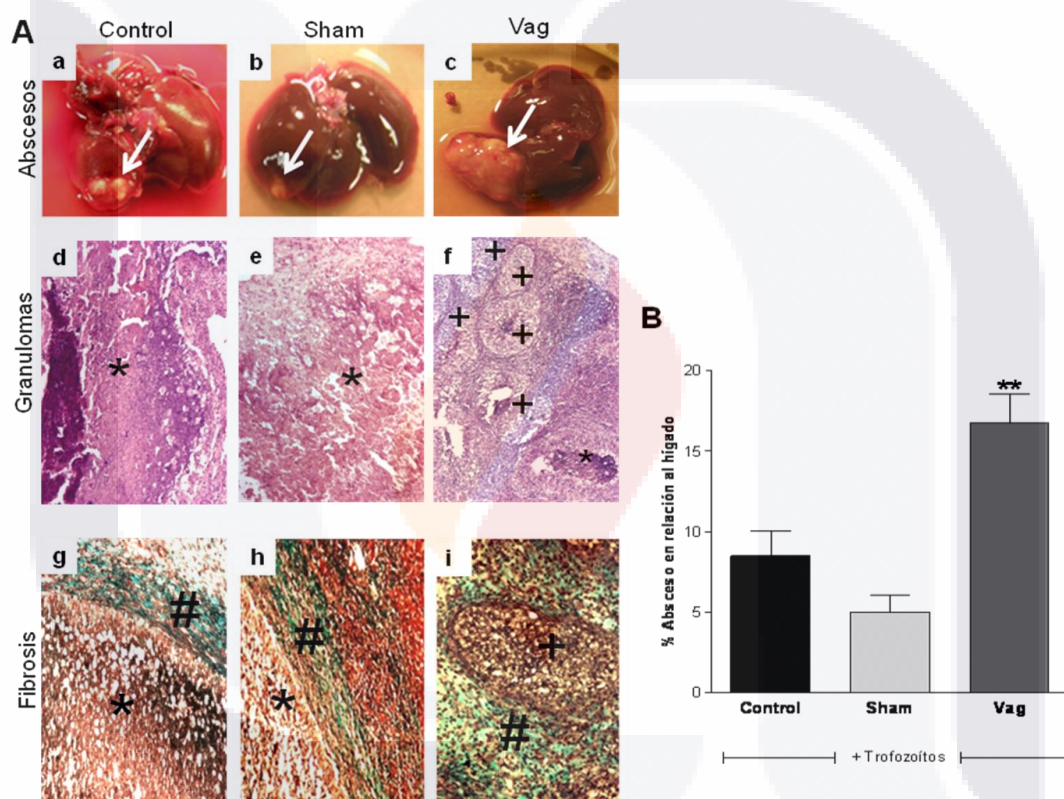


Figura 3. La ausencia del sistema parasimpático permite la formación de múltiples estructuras tipo granuloma-modificado. **A:** El tamaño de las lesiones amibiana, 7 días post-inoculación, se muestra en las figuras a-c. En los cortes histológicos encontramos lesiones tipo granuloma (*) (d y e) y múltiples estructuras tipo granulomas-modificados (+) (f). Las figuras g y h muestran lesiones tipo granuloma con áreas de necrosis (*), rodeadas por fibras de colágeno (#), en la figura i hay una estructura tipo granuloma modificado (+) delimitado por abundantes fibras de colágeno (#), con la ausencia de áreas necróticas. **B:** Porcentaje de peso de AHA en relación con el peso total del hígado. El peso en los animales vagotomizados fue significativamente mayor con relación al control. Los valores representan las medias \pm DE de seis animales diferentes (**p \leq 0.01 comparado con los controles) (t-student).

La cuantificación de amibas en los abscesos y en el tejido circundante así como en las zonas granulomatosas, mostró una disminución significativa en el número de amibas en los animales vagotomizados ($0,61 \pm 0,17/\text{mm}^2$ versus $1,5 \pm 0,22/\text{mm}^2$ del grupo

intacto. fig. 4B). También se observaron diferencias en los patrones de distribución de las amibas dentro y fuera del los abscesos, así, en comparación con el grupo control, en los animales vagotomizados se observaron fragmentos amibianos en la superficie interna del absceso (figs. 4A c, f) y escaso infiltrado inflamatorio (flechas dobles) alrededor de los granulomas. En los grupos intacto y sham se encontraron gran cantidad de amibas, principalmente en la zona marginal del absceso, mientras que en el tejido sano de la zona periférica, se observaron escasas amibas diseminadas ($5 \pm 0.7/\text{mm}^2$ y $2 \pm 0,37 \text{ mm}^2$, respectivamente; fig. 4B). Rodeando a la zona de necrosis se encontró infiltrado inflamatorio bien organizado (flechas dobles, fig. 4A d).

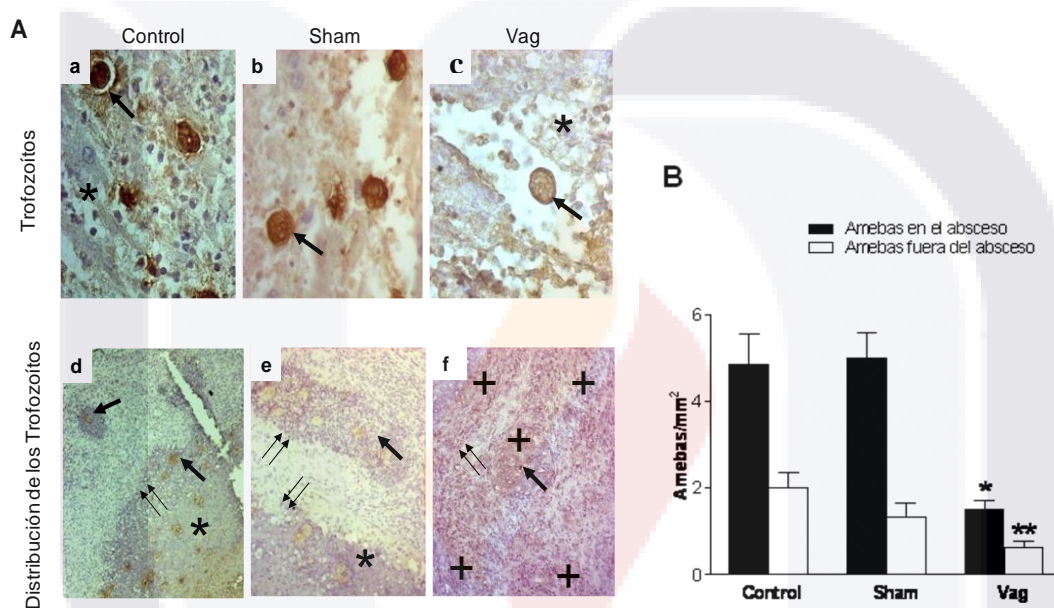


Figura 4. Distribución de trofozoítos de *E. histolytica* en lesiones amebianas. **A:** en las figuras a-c, encontramos amibas (flechas) en el absceso (*). En las figuras d y e se muestra una distribución clásica de trofozoítos (flecha), los cuales se encuentran dentro y fuera del absceso (*), rodeado por abundante infiltrado inflamatorio (doble flecha). La figura f muestra múltiples estructuras tipo granuloma-modificado (+) que contiene fragmentos de amibas (flechas), en presencia de muy poco infiltrado inflamatorio. **B:** Cuantificación de trofozoítos de *E. histolytica* dentro y fuera de las lesiones amebianas. Hemos observado que la ausencia del nervio vago impide la invasión y la proliferación amebiana en comparación con el control. Representa los valores medios \pm DE de tres animales distintos. Los Experimentos se realizaron por cuadruplicado (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ en comparación con el control de animales) t-student.

La microscopía electrónica de los animales vagotomizados mostró a los granulomas constituidos básicamente de células epiteloides, rodeando los fragmentos de trofozoítos (flecha, figs. 5a y 5b).

En la periferia, se encontraron restos de neutrófilos (flechas), hepatocitos reactivos que con una gran cantidad de vacuolas citoplásmicas (fig. 5c) y macrófagos (flecha corta, fig. 5d). Estas observaciones muestran que la vagotomía induce una respuesta inmune temprana que resulta en una disminución de la invasión amebiana.

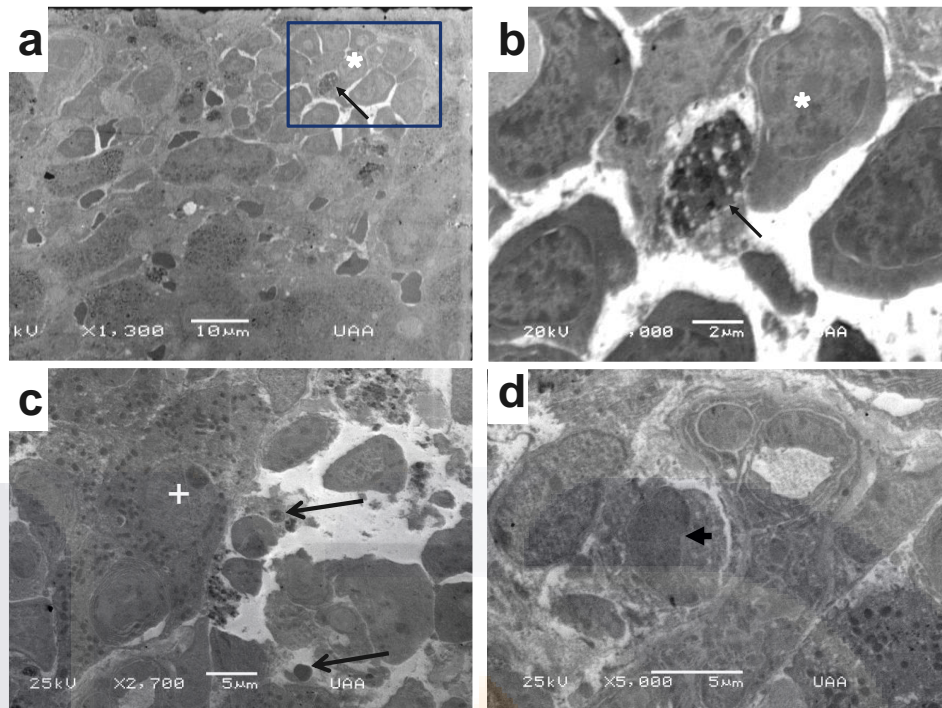


Figura 5. La ausencia del nervio parasimpático promueve la encapsulación de fragmentos amibianos por las células epitelioideas. A través de las preparaciones por MET se muestra las estructuras tipo granuloma-modificado. En las figuras **a y b**, se muestra un fragmento de una amiba (flecha), rodeada por células epitelioideas (*). La figura **c** muestra varios hepatocitos granulosos (+) y neutrófilos (flechas). En la figura **d** se observan macrófagos cercanos a las estructuras tipo granulomas (flecha corta).

El estudio histológico de las células de la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos y células Nk), mostró diferentes patrones de número y distribución en los diferentes grupos de animales experimentales.

En el grupo control se encontró un aumento del número de neutrófilos ($36 \pm 1.5/\text{mm}^2$; fig. 6B), los cuales se ubicaron en la periferia de los abscesos, marginando a las amibas (flecha doble, fig. 4A a). En comparación, el grupo vagotomizados mostró una disminución significativa en el número de neutrófilos ($18 \pm 1.7/\text{mm}^2$) ($p < 0.01$ control versus vagotomizado) (figs. 6Ac y 6B), los cuales se localizaron principalmente alrededor y en el centro de los granulomas (fig. 4Af).

La comparación entre el grupo control con el vagotomizado, no mostró diferencias significativas en el número de macrófagos. En cuanto a su distribución, en los animales control los macrófagos se encontraron en el parénquima próximo al absceso (flecha en la fig. 6A d), mientras que en los vagotomizados, los macrófagos se localizaron en el interior de los granulomas (flecha en figs. 6Af y 6B). En relación con las células Nk, estas se encontraron en los sinusoides hepáticos y en las áreas necróticas de

loscesos en todos los grupos, sin diferencias significativas entre los diferentes grupos (flechas en las figs. 6A g-i y 6B).

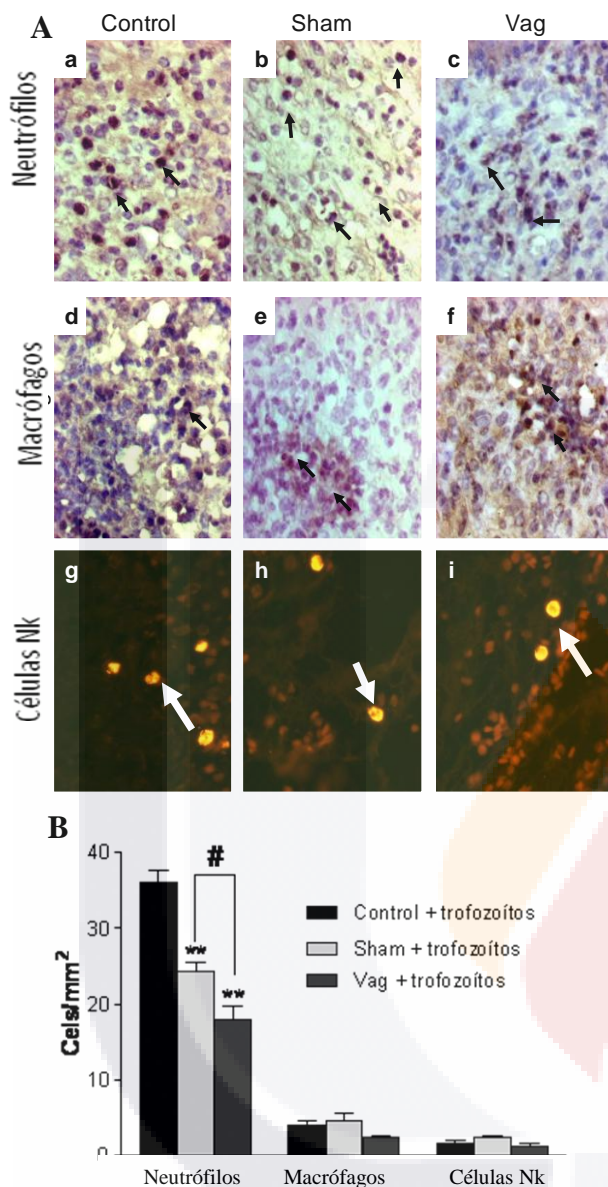


Figura 6. Reclutamiento de células inmunes. **A:** las figuras a, b y c muestran células marcadas para mieloperoxidasa (flechas) (neutrófilos) rodeando el AHA. Las figuras d, e y f muestran células marcadas para CD68 (flecha), ubicadas en forma aleatoria en la periferia del AHA en los animales control (d y e) y en el centro de estructuras granuloma-modificado en animales vagotomizados (f). Las figuras g, h, i muestran células marcadas para NKR-P1, que corresponden a células Nk (flechas blancas), ubicadas en el AHA.

B: Cuantificación de células inmunes en AHA. La vagotomía reduce significativamente la presencia de neutrófilos, pero no el número de macrófagos o células Nk. Los valores representan las medias \pm DE de tres animales distintos. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado (# $p \leq 0,05$, con respecto a los animales sham, ** $p \leq 0,01$ en comparación con el control). Prueba de Tukey.

8.4. Papel de la denervación parasimpática en la producción de INF- γ , TNF- α e IL-10 séricos en modelos de AHA

El sistema inmune está regulado por el SNA a través de la respuesta inmune celular Th1 y Th2. La Inmunidad Th1 se caracteriza por la expresión de citocinas pro-inflamatorias, como INF- γ , IL-2 y TNF- α , que conducen a diferenciación de macrófagos, células Nk y células T citotóxicas. La inmunidad Th2 o inmunidad humoral se caracteriza por la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13, que estimulan la diferenciación de eosinófilos, mastocitos y linfocitos B, para una

defensa mediada por anticuerpos contra antígenos extraños. El principal inductor de la inmunidad Th1 es IL-12, esto puede inducir la expresión de INF- γ e inhibir la expresión de IL-4, que desempeña un papel crítico en la respuesta inmune Th1 (Sierra-Puente y cols., 2009).

En sueros de hámsteres se cuantificaron varias citocinas para determinar la respuesta inmune mediada por estas. Fue analizado INF- γ en relación con la respuesta Th1, IL-10 como indicador de la respuesta Th2 y TNF- α para la reacción pro-inflamatoria.

Siete días post-inoculación, en hámsteres con vagotomía + trofozoítos se produjo aumento significativo de INF- γ ($67 \pm 2,5$ pg/ml) en comparación con el control + trofozoítos ($34,50 \pm 6,29$ pg/ml). Sin embargo, en hámsteres vagotomizados sin trofozoítos disminuyó INF- γ ($44,5 \pm 5,77$ pg/ml) en relación con el grupo control sin trofozoítos ($70,75 \pm 8,75$ pg/ml; fig. 7a). La ausencia del SNP posiblemente se asoció con una inmunidad protectora, mediante la regulación de INF- γ . Se ha reportado que valores altos de INF- γ se asocian con una inmunidad protectora ante la amibiasis (Guo y cols., 2008), evitando así la proliferación de *E. histolytica* y después posiblemente una liberación de glucocorticoides o la activación del SNS suprimió el sistema inmune innato, proporcionando una retroalimentación negativa para restaurar la homeostasis (Sternberg, 2006).

En hámsteres con vagotomía + trofozoítos se produjo un aumento significativo de IL-10 ($13,1 \pm 1,87$ pg / ml) en comparación con el grupo control + trofozoítos ($7,88 \pm 0,75$ pg/ml; fig. 7b), se sabe que IL-10 ejerce efectos anti-inflamatorios en células Th1 y monocitos/macrófagos, y regula varias respuestas funcionales de PMN. Por ejemplo, se ha demostrado que IL-10 inhibe de forma potente a neutrófilos humanos y la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS, LPS + INF- γ y TNF- α (Dang y cols., 2006). La denervación parasimpática también promueve la activación de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, ya que posiblemente fué la responsable del decremento en el número de neutrófilos una vez que se eliminó el agente causal. Sin embargo, en animales vagotomizados sin trofozoítos se encontraron altos niveles de IL-10 ($34,26 \pm 6,87$ pg/ml) en relación con el control sin trofozoítos ($1,89 \pm 0,24$ pg / ml). La vía neuronal colinérgica refleja también en los procesos inflamatorios una disminución de las concentraciones séricas de TNF- α durante el shock tóxico, a través de la liberación de acetilcolina del nervio vago, lo que indica que esta vía tiene un papel importante en la prevención del exceso de las respuestas inflamatorias. En consecuencia, la vagotomía exagera la respuesta inflamatoria en cuanto a TNF- α a los estímulos antigénicos (Sternberg, 2006), aunque en nuestro caso no hubo ninguna diferencia significativa en los niveles de TNF- α en los animales Sham ($63,43 \pm 6,43$

pg/ml) y con vagotomía, ambos grupos mostraron una diferencia significativa en comparación con animales control sin trofozoítos ($38,43 \pm 2,97$ pg / ml).

Sin embargo, durante el proceso inflamatorio inducido por amibas (control + trofozoítos), se observó una inhibición significativa de TNF- α ($14,15 \pm 4,28$ pg/ml) en relación con animales control sin trofozoítos ($38,43 \pm 2,97$ pg / ml; la fig. 7c).

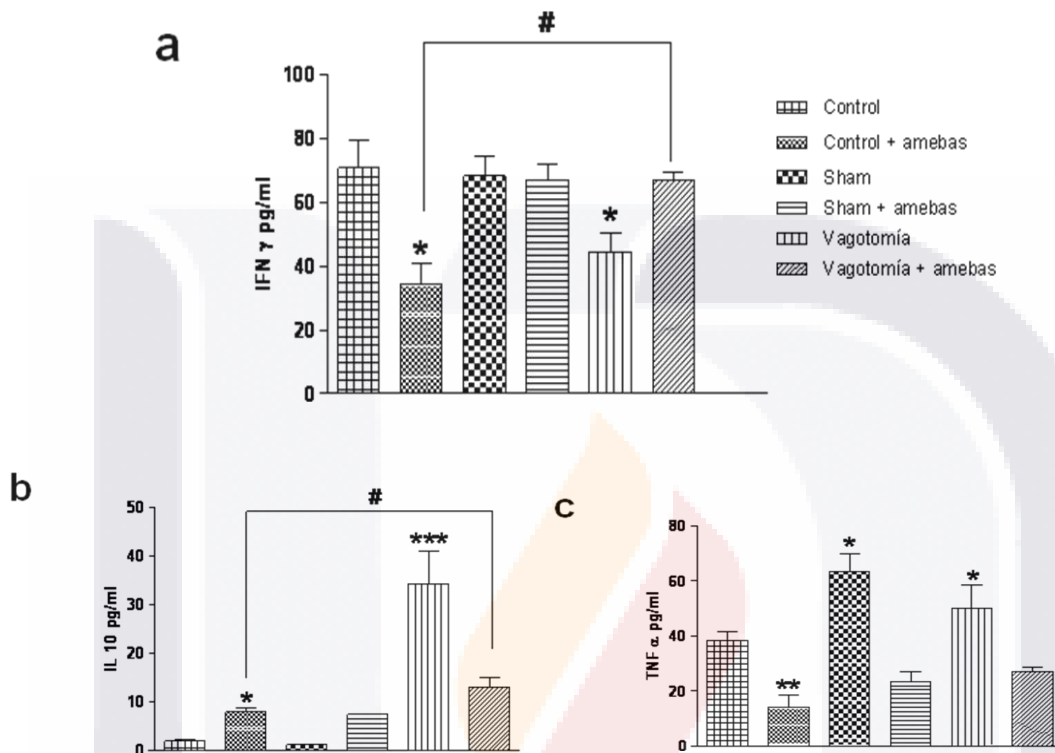


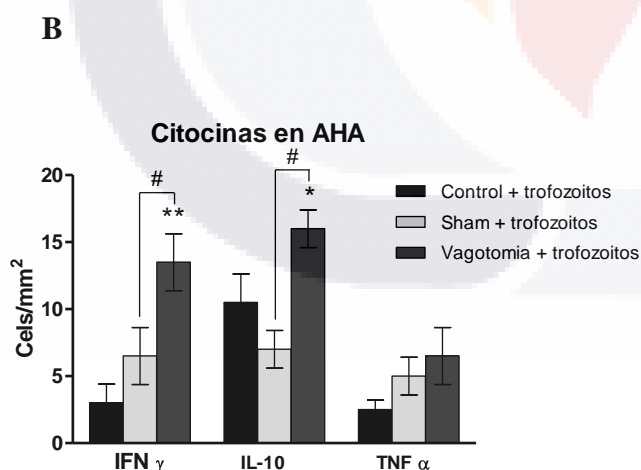
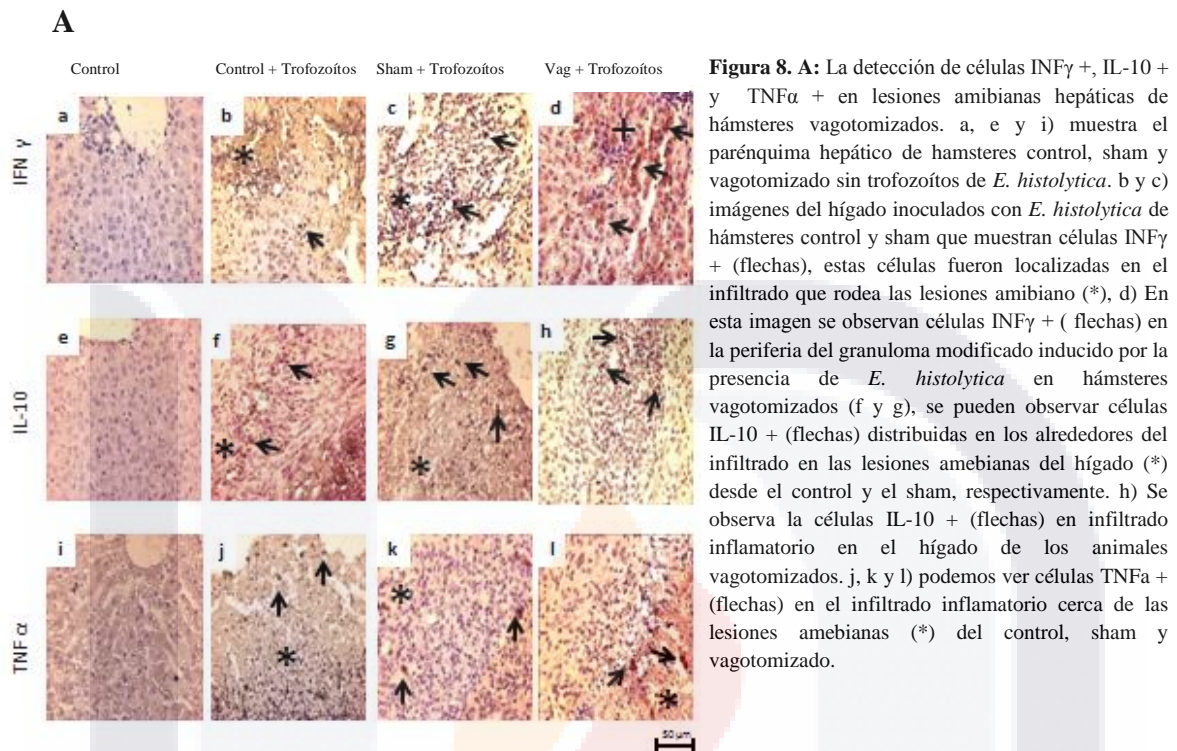
Figura 7. Papel de las citocinas en el proceso inflamatorio causado por *E. histolytica*. INF- γ , TNF- α e IL-10 fueron cuantificados por ELISA. La ausencia del SNP en el modelo de AHA inhibió los niveles de INF- γ (a) y aumentó los de IL-10 (b). No hubo cambios significativos en los niveles de TNF- α entre sham y vagotomizados (c). Los valores representan las medias \pm DE de cinco animales diferentes. Los experimentos se realizaron por duplicado ($p \leq 0,05$, con respecto al control inoculado, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ en comparación con el control). Prueba de Tukey.

8.5. Citocinas en AHA

Siete días post-inoculación se detectó un incremento de células INF- γ + alrededor del granuloma en los hámsteres vagotomizados + trofozoítos, mientras que en los hámsters infectados control y sham se encontraron menos células positivas ($13,5 \pm 2,12$ y $3 \pm 1,41$ cels/mm², respectivamente, figs. 8Ad y 8B y las figs. 8Ab y c y 8B, respectivamente).

Se observaron más células IL-10+ en hámsteres vagotomizados infectados con respecto al grupo control y sham infectados ($16 \pm 1,4$ contra $10,5 \pm 2,1$ cels/mm², respectivamente; figs. 8Ah y 8B y las figs. 8Af y 4B, respectivamente). IL-10 ejerce sus

efectos antiinflamatorios en diversos tipos celulares (linfocitos Th1 y macrófagos), también regula funciones de PMN. Por otra parte, no hubo cambios en el número de células TNF- α in situ entre los grupos control, sham y vagotomizados infectados, en todos los casos encontramos células positivas en la periferia del absceso (figs. 8A_{j, k y l})



B: Papel de citocinas INF- γ , TNF- α y IL-10 en el proceso inflamatorio provocado por los trofozoítos de *E. histolytica*. Las barras representan la media \pm DE del número de células positivas para las citocinas cuantificadas por el método de inmunohistoquímica. La ausencia del sistema nervioso parasimpático en el modelo AHA aumenta los niveles de INF- γ y de IL-10. No hubo cambios significativos en los niveles de TNF- α entre el control y los animales vagotomizados. Los valores representan la media \pm DE de seis animales diferentes. Los experimentos se realizaron por duplicado, (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, en comparación con el control inoculado; # $p \leq 0,05$, en comparación con el falso inoculado). Todas las medias fueron comparadas estadísticamente mediante la prueba de Tukey.

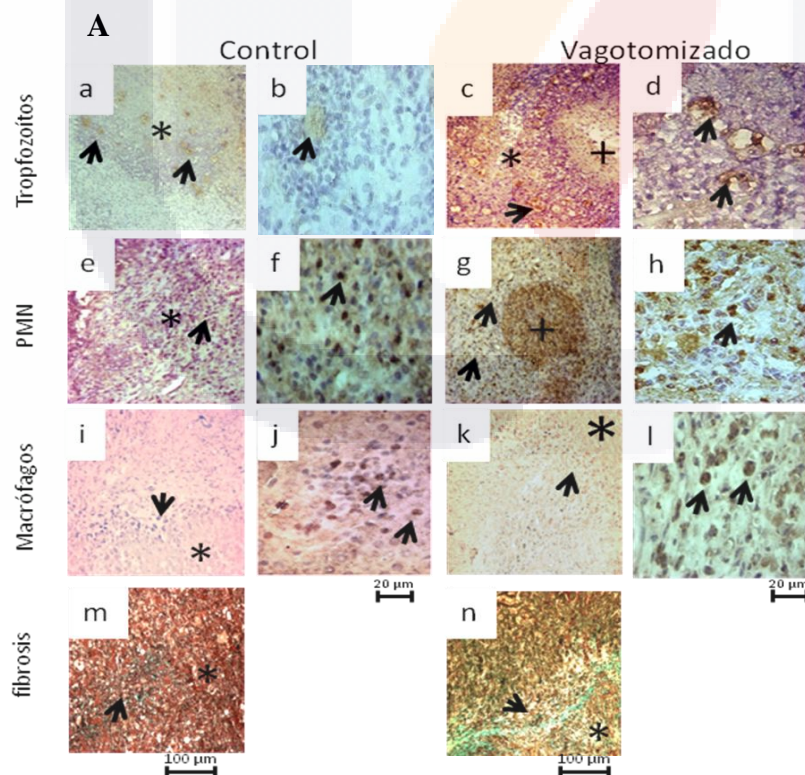
8.6. Efecto de la vagotomía sobre el AHA a las 36 horas post-inoculación

A nivel histológico se analizó la distribución de las amibas en los abscesos a las 36 horas de evolución, encontrando una alta cantidad de éstas en el hámster

vagotomizado y en el hámster control ($18 \pm 2.4/\text{mm}^2$ y $14 \pm 1.2/\text{mm}^2$, respectivamente; fig. 9B). La localización de las amibas en los animales vagotomizados fue principalmente en el tejido circundante (flecha), contrariamente a los controles donde las amibas se localizaron tanto en la región del absceso como en los granulomas (figs. 9A c, d), también se detectó un amplio infiltrado inflamatorio (flechas) en la cercanía de estas estructuras granulomatosas (fig. 9A g). Los macrófagos fueron más abundantes en los hámsteres vagotomizados en relación con el control, distribuidos en la periferia de las estructuras granulomatosas (figs. 9A k, i).

Con relación a los animales control, se encontró una gran cantidad de amibas principalmente en la zona marginal del absceso (figs. 9A a y b), especialmente en la zona de necrosis. En estos animales también encontramos la distribución de un infiltrado inflamatorio ya establecido tanto de neutrófilos como macrófagos ordenados en la periferia del absceso (flechas en figs. 9A e, f, i y j).

Por último, se encontró indicios de tejido de reparación en animales vagotomizados que delimitaba la zona del absceso y los granulomas (fig. 9A n), a diferencia del control en el cual encontramos escaso colágeno delimitando la lesión (fig. 9A m).



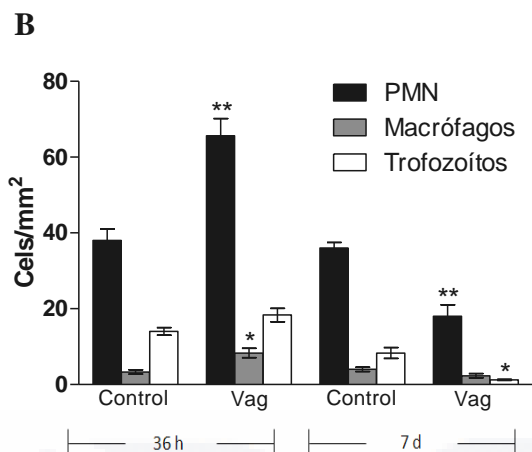


Figura 9. A: Histología de la AHA a las 36 horas para el control y el animal vagotomizado. Las figuras superiores muestran los trofozoítos de *E. histolytica* (flechas) en la periferia del AHA, en los hámsteres de control (A y B) y en los granulomas en el hámster vagotomizado (c y d). Las figuras de en medio muestran PMN (flecha) situado en la periferia del AHA (*) en el control (e y f) y alrededor del granuloma en el animal vagotomizado (g y h). Los macrófagos se encuentran en la periferia de las lesiones en los animales control (i y j), y en la periferia de los granulomas t en los animales vagotomizados (k y l) y, finalmente, en la fila inferior muestran el depósito de colágeno el cual es muy bajo en el hámster control (m) en comparación con el abundante en los animales vagotomizados (n). **B:** Cuantificación de células inmunes en el AHA. El hámster vagotomizado aumentó significativamente la presencia de neutrófilos, y el número de macrófagos a las 36 horas, mientras que a los 7 días descendió ambas células y se encontraba un tejido de reparación organizado, con relación al control el número de estas células permanece significativamente constante a las 36 horas y a los 7 días. Los valores representan las medias \pm DE de tres animales distintos. Los experimentos se realizaron por duplicado (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, con respecto a los animales control) aplicando la prueba de Tukey.

8.7. Efecto de la simpatectomía sobre la síntesis de glucógeno hepático

Para confirmar la eficacia del procedimiento de la simpatectomía se cuantificó el glucógeno para analizar el papel modulador del sistema nervioso simpático, como vemos en la figura 10A, hay diferencia en los depósitos de glucógeno en los animales simpatectomizados (fig. 10Ac) respecto al grupo control (figs. 10Aa y b) por la técnica de PAS (25). La cuantificación de glucógeno por un método enzimático (glucosa oxidasa biosistem 11504) muestra un aumento de glucógeno ($5,7 \pm 0,13$ mg / ml) en el grupo simpatectomizado (fig. 10B), estos resultados muestran una correlación con la reacción histoquímica de PAS en los tejidos donde presenta mayor intensidad de la reacción. Por lo tanto, se confirma la eficacia de la simpatectomía debido a un incremento en la actividad de síntesis de glucógeno por la ausencia del sistema nervioso simpático.

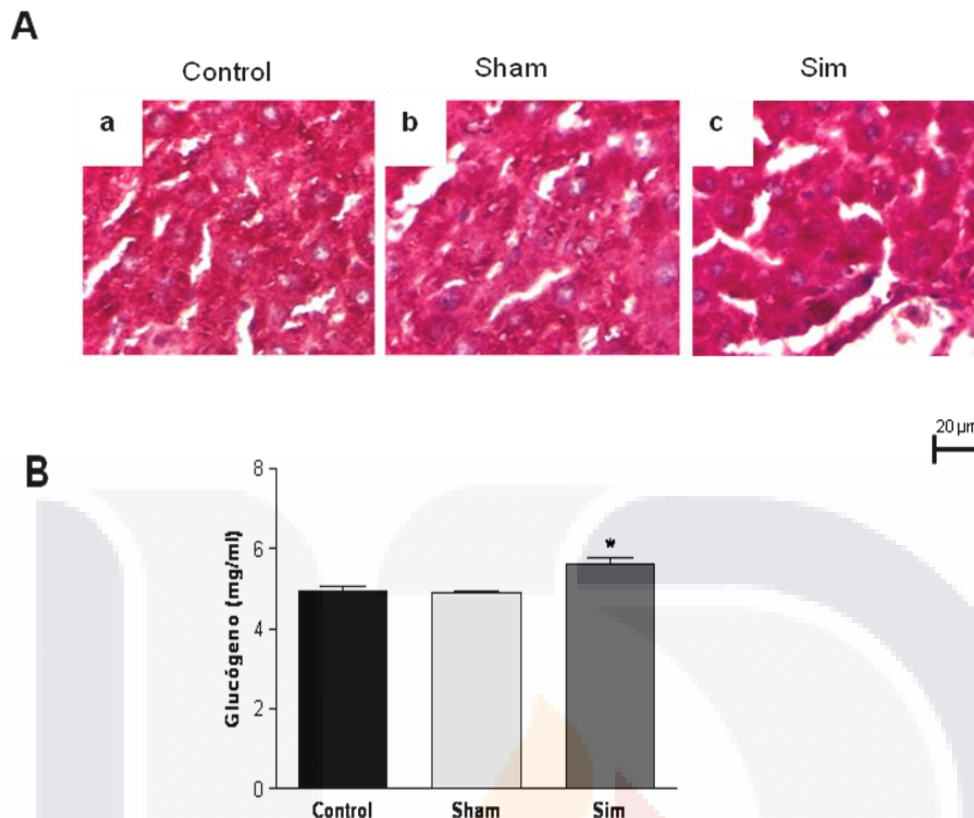


Figura 10. La simpatectomía aumenta la producción de glucógeno. **A:** visión general de la detección histoquímica de glucógeno por la técnica de PAS (a-c), como se puede observar, el depósito de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos se incrementó a los 15 días post-simpatectomía. **B:** La cuantificación enzimática de glucógeno en 250 mg de muestra de tejido hepático muestra un aumento significativo en los animales simpatectomizados. Los valores representan las medias \pm DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado ($n = 6$) * $p \leq 0,05$ en comparación con el animal control. Se aplicó la prueba de la t-student.

8.8. Efecto de la simpatectomía sobre la morfología del AHA

A siete días post-inoculación, los animales simpatectomizados desarrollaron grandes abscesos ($12,50 \pm 1,5$ g) (fig. 11B), caracterizados por amplias zonas de necrosis hemorrágica rodeada por pocas fibras de colágeno (# en figs. 11A f,i), a su vez, en el hámster control los abscesos fueron menores ($8,2 \pm 1,31$ g) (fig. 11A a, y en fig. 11B), donde hubo lesiones granulomatosas (*) delimitadas por fibras de colágeno (# en figs. 11A d,g), semejante a lo descrito por otros investigadores (Ventura y cols., 2002; Tsutsumi y cols., 1984).

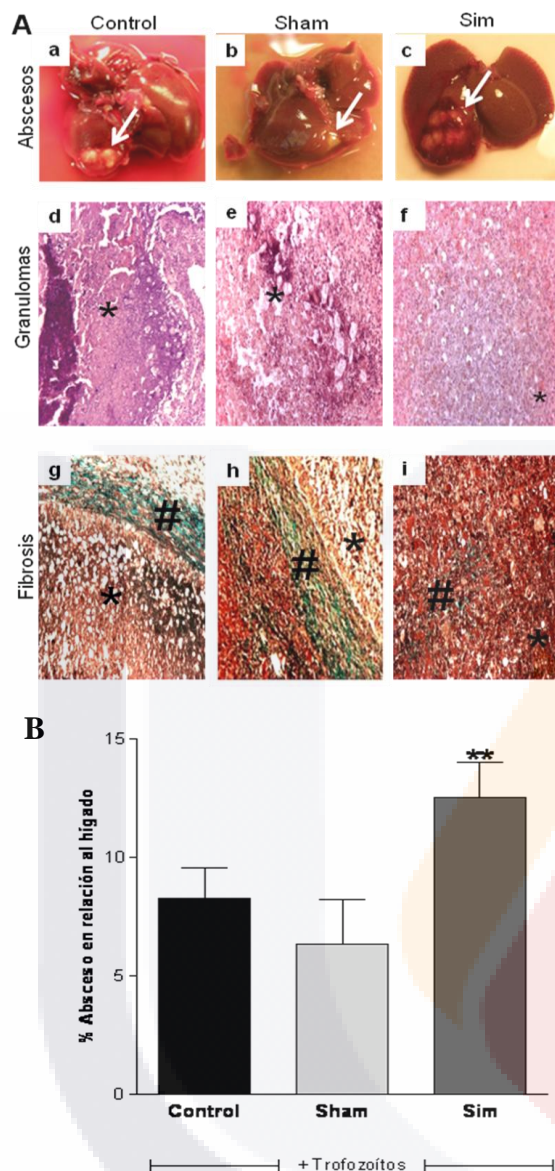


Figura 11. La ausencia del nervio simpático induce un proceso invasivo muy amplio de los trofozoítos en el AHA: **A:** el tamaño de las lesiones amebianas a 7 días post-inoculación se muestra en las figuras (a-c); a nivel histológico observamos el AHA con lesiones tipo granuloma (*) (d y e) y una diseminación amplia de trofozoítos sin la presencia de un granuloma en el simpatectomizado (f). Las figuras g y h muestran lesiones tipo granuloma con áreas de necrosis (*), rodeado por fibras de colágeno (#); en la figura i) se observa una escasa cantidad de colágeno rodeando el área necrótica (#).

B: porcentaje del AHA con relación al peso total del hígado. El peso en los animales simpatectomizados fue significativamente mayor en relación con los animales control. Los valores representan las medias \pm DE de seis animales diferentes (\leq (** p 0.01 comparado con el animal control). La prueba aplicada es la t-student.

En los animales con simpatectomía, la diseminación de trofozoítos fue más amplia hacia la periferia de la lesión y pocas en la región del absceso, por lo tanto, entre ambas zonas se encontró un aumento significativo de amibas ($5,34 \pm 0,7/\text{mm}^2$, $1,34 \pm 0,34/\text{mm}^2$ amibas, respectivamente) (fig. 12B) en relación al control.

Los animales simpatectomizados presentaron amibas muy diseminadas en el tejido (flecha) y escaso infiltrado inflamatorio (figs. 12A c,f), al contrario del control, donde los trofozoítos se localizaron en zonas necróticas (*) ($2 \pm 0,36/\text{mm}^2$ y $4,83 \pm 0,7/\text{mm}^2$ amibas) (fig. 12B), y en el infiltrado inflamatorio que rodea al tejido dañado (flechas dobles) (fig. 12A d).

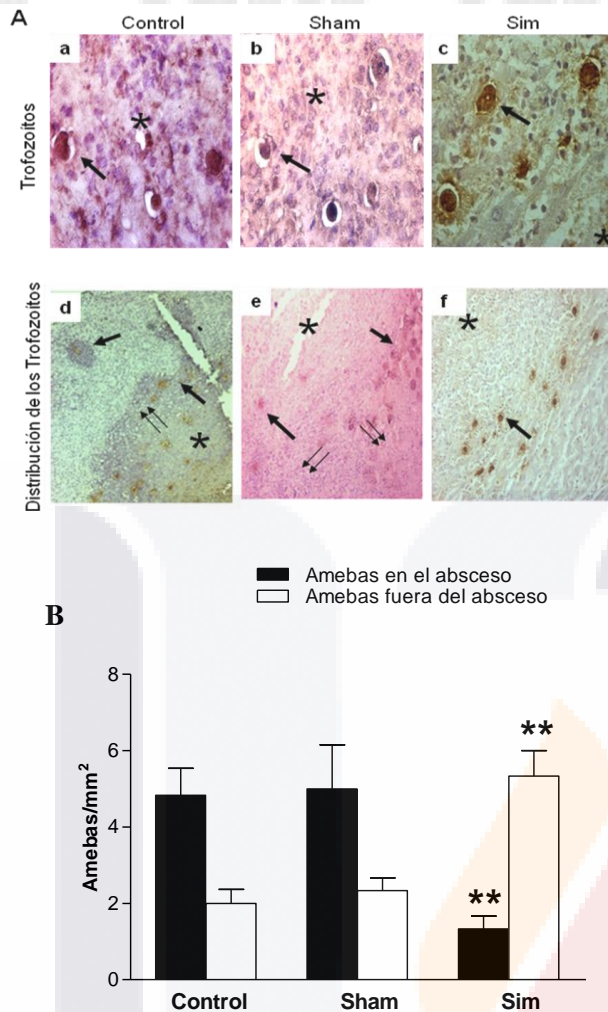


Figura 12. Distribución de los trofozoítos de *E. histolytica* en lesiones amebianas. **A:** en las figuras a-c, encontramos amebas (flechas) en el absceso (*). En d y e, encontramos la distribución clásica de los trofozoítos (flecha) dentro y fuera del absceso (*), rodeado de abundante infiltrado inflamatorio celular (flecha doble). En f se observa una amplia distribución de amebas en el tejido hepático por lo tanto más invasivas (flechas), en presencia de poco infiltrado inflamatorio celular.

B: Cuantificación de trofozoítos de *E. histolytica* dentro y fuera de las lesiones amebianas. Hemos observado que la ausencia del nervio simpático permite un aumento en la invasión y la proliferación amebiana en comparación con el control. Representa los valores medios \pm DE de tres animales distintos. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado (** $p \leq 0,01$ en comparación con el control). La prueba aplicada fue t-.student.

A nivel de microscopía electrónica del tejido lesionado en animales simpatectomizados, se observaron varios trofozoítos (flecha) rodeados por algunos PMN (flecha gorda) y macrófagos (cabeza de flecha) (figs. 13a y b), (fig. 13d), en la figura 13c se observa contacto de un trofozoíto (flecha) con un PMN (cabeza de flecha), los trofozoítos presentaron abundantes vacuolas que probablemente representen alta actividad de secreción de adhesinas y otros productos liberados, que en conjunto manipulen la función de las células inmunes y dañen el tejido, donde a su vez los PMN estén contribuyendo al daño mediante la secreción de cistein-proteasas. La simpatectomía induce disminución de la respuesta inmune innata y escasa síntesis de colágeno, permitiendo aumento en la proliferación e invasión amebiana.

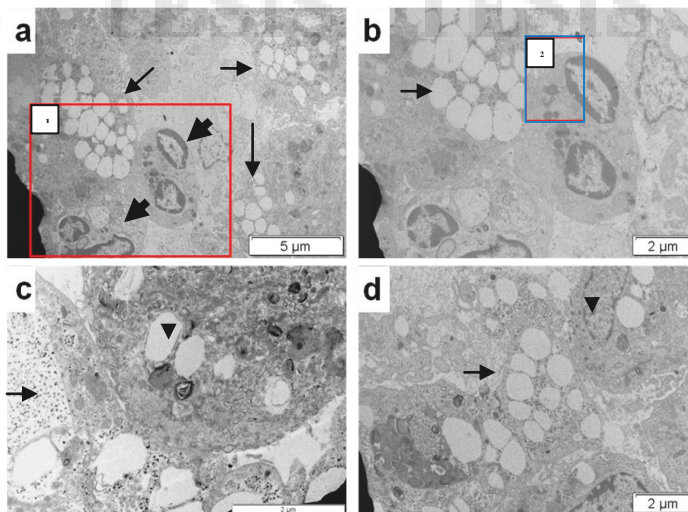


Figura 13. La ausencia del nervio simpático promueve una incapacidad de la respuesta inmune innata temprana principalmente de los neutrófilos para eliminar a las amibas. A través del MET se muestran los detalles de la lesión. En las figuras a, b y 1 se observan amibas activas (flecha), rodeadas por algunos neutrófilos (flecha gorda). La figura c y recuadro 2 muestran a mayor aumento de una amiba (flecha) en contacto con un neutrófilo (flecha gorda), la amiba presenta gran cantidad de vacuolas de secreción. En la figura d se muestran macrófagos (cabeza de flecha) en contacto con las amibas.

Se analizó la presencia de células de la respuesta inmune innata a 7 días post-inoculación en los grupos control y experimental. En el grupo simpatectomizado se observó disminución de PMN (flechas) ($8,34 \pm 0,9/\text{mm}^2$) (figs. 14Ac y 14B), localizados alrededor de la zona de necrosis; a diferencia del control, donde su número fue mayor ($36 \pm 1,52/\text{mm}^2$) (fig. 14B), localizados en la periferia de los abscesos (flecha en fig. 14A a). Los macrófagos en los animales simpatectomizados (fig. 14B) se localizaron en el área de necrosis (flecha en fig. 14A f) y en los hámsteres control, en el parénquima, cercano al absceso (flechas en la fig. 14A d). Por último, las células Nk se detectaron en todos los grupos (fig. 14B) tanto en sinusoides como en áreas hemorrágicas del absceso sin cambios en la distribución y número (flechas en figs. 14A g-i).

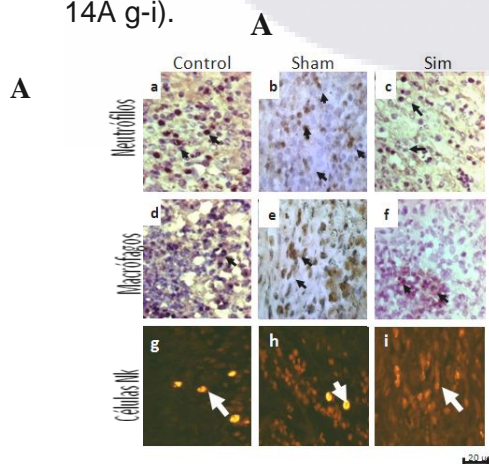
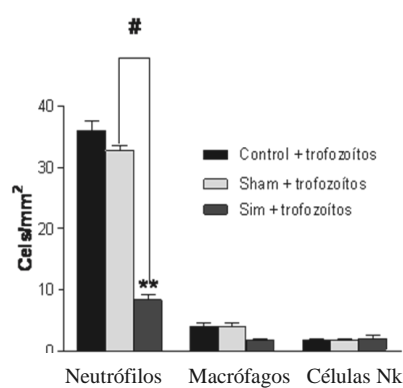


Figura 14. Reclutamiento de células inmunes. **A:** las figuras a, b y c muestran células marcadas para mieloperoxidasa (PMN) (flechas) rodeando el AHA. Las figuras d, e y f muestran células marcadas para CD68 (macrófagos) (flechas), ubicados en forma aleatoria en la periferia de la AHA en el control (d) y en los animales simpatectomizados (f). Las figuras g, h i muestran células Nk, (flechas blancas), ubicadas en el AHA.

B



B: Cuantificación de células inmunes en el AHA. El hámster simpatectomizado mostró reducción significativa de neutrófilos, pero no de macrófagos o células Nk. Los valores representan las medias \pm DE de tres animales distintos. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado (# $p \leq 0,05$, con respecto a los animales sham, ** $p \leq 0,01$ en comparación con el control). Prueba de Tukey.

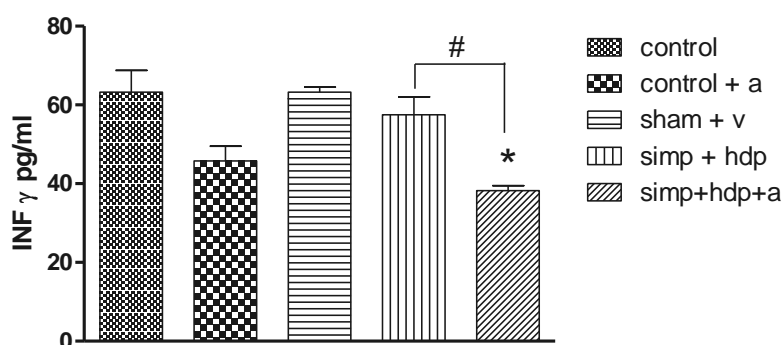
8.9. Papel de la denervación simpática sobre la producción de INF- γ , TNF- α e IL-10 en modelos de AHA

En los sueros de los hámsteres simpatectomizados y parasimpatectomizados se cuantificaron las citocinas IFN- γ , IL-10 y TNF- α para determinar la respuesta inmune mediada por citocinas.

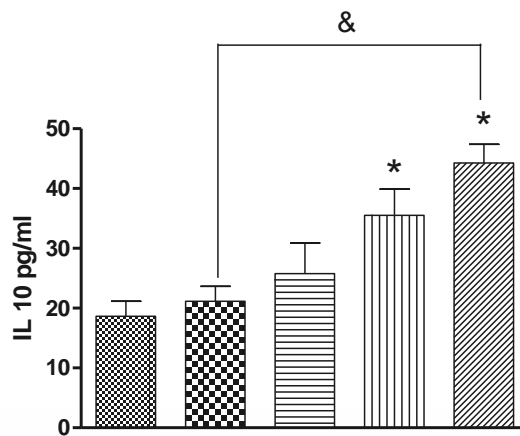
En animales simpatectomizados experimentales, siete días después de la inoculación observamos disminución de IFN- γ ($38,25 \pm 1,25$ pg/ml) con respecto al control ($63,25 \pm 5,5$ pg/ml) (fig. 15a). IL-10 se encontró aumentada en simpatectomizados ($44,26 \pm 3,1$ pg/ml) con respecto al control ($21,13 \pm 2,5$ pg/ml) (fig. 15b). Asimismo, animales simpatectomizados no inoculados presentaron altos niveles de IL-10 ($30,51 \pm 9,4$ pg/ml) con respecto al control ($18,63 \pm 2,5$ pg/ml)

En este modelo se observó que la ausencia del simpático no tiene ningún efecto sobre los niveles de TNF- α ($55,09 \pm 5,5$ pg/ml) con respecto al control ($42,72 \pm 4,3$ pg/ml). No obstante, durante el proceso inflamatorio por *E. histolytica* en hámsteres simpatectomizados observamos una disminución significativa de TNF- α ($25,57 \pm 2,97$ pg/ml) al igual que sucedió con el control ($42,72 \pm 4,3$ pg/ml) (fig. 15c).

a



b



c

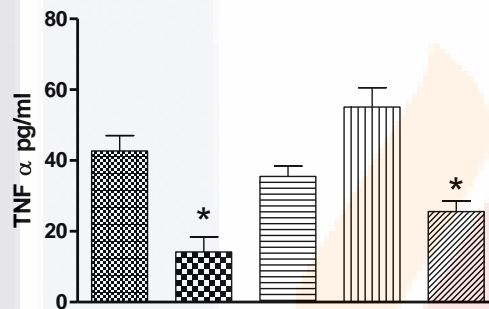


Figura 15. Papel de las citocinas en el proceso inflamatorio causado por trofozoítos de *E. histolytica*. INF- γ , TNF- α e IL-10 fueron cuantificados por ELISA. La ausencia del sistema nervioso simpático en el modelo AHA disminuyó los niveles de INF- γ (a), y se aumentaron los niveles de IL-10 (b). La infección indujo niveles bajos de TNF- α (c). Los valores representan las medias \pm DE de cinco animales diferentes. Los experimentos se realizaron por duplicado (& $p \leq 0,05$, con respecto al control inoculado, * $p \leq 0,05$ en comparación con el control y la $p \# \leq 0,05$ en comparación con el animal simpatectomizado sin amibas). Prueba de Tukey.

c

9.- DISCUSIÓN

Se sabe que el Sistema Nervioso Central regula la respuesta inmune innata a través de rutas hormonales mediadas por los ejes HHA, HHG, HHT, así también mediante diferentes rutas neuronales, mediadas por el SNA integrado por las vías simpática y parasimpática, éstas generalmente inhiben la respuesta inmune innata, tanto a nivel local como sistémico, y por otra parte, el sistema nervioso periférico tiende a amplificar la respuesta inmune local. Estos sistemas trabajan juntos, primero activando y amplificando la respuesta inflamatoria y después inhibiéndola para restablecer la homeostasis (Sternberg, 2006). Este proceso se ha analizado y reportado en modelos de rata con hepatitis (Tiegs y cols., 1999) e infectadas con salmonella (Wang y cols., 2002).

En esta contribución exploramos el modelo de infección hepática crónica con *E. histolytica* para analizar el papel del Sistema Nervioso Parasimpático y Simpático en la modulación de la respuesta inmune local y sistémica a través de fibras aferentes y eferentes del nervio vago y vías simpáticas.

Inicialmente, se desarrollaron estudios en animales con denervación parasimpática mediante la vagotomía específica del hígado de hámster, en esta fase se verificó la denervación mediante el análisis de la acción fisiológica del nervio vago sobre la glicogénesis, que en su ausencia indujo un incremento en la actividad glicogenolítica y, por lo tanto, se encontró disminución de este polisacárido (Gerhard, 2004). Otros investigadores se han basado en pesar los estómagos de los animales vagotomizados, los cuales cuentan con un incremento en el peso con relación al control para probar la eficacia de la vagotomía (Werner y cols., 2003).

Poco se sabe acerca de la regulación del proceso inflamatorio y de la destrucción tisular durante la invasión amibiana, por lo que el sistema nervioso podría tener alguna influencia en el desarrollo de esta interacción huésped–parásito. Se detectaron algunos cambios en la respuesta inmune contra el parásito en hámsteres con ausencia del SNP. Los abscesos hepáticos fueron más grandes en los hámsteres vagotomizados infectados en comparación con los animales control infectados, lo cual posiblemente se debió a un gran depósito de fibras de colágeno durante el proceso de reparación. La síntesis de colágeno por las células estelares hepáticas es modulada por la acción coordinada del sistema simpático y parasimpático. En nuestro modelo, la ausencia del sistema nervioso parasimpático probablemente indujo a las células estelares hepáticas a diferenciarse en miofibroblastos (Roskams y cols., 2004), estas

células aumentan la síntesis de colágeno que delimita la zona de lesión y posiblemente influye en la disminución de la invasión de las amibas, contribuyendo así al proceso de reparación.

En estudios hechos en animales con ausencia del SNP, previamente observamos (figs. 9 A y B) que a las 36 horas post-inoculación ya había un absceso hepático amebiano bien desarrollado, representado por lesiones amebianas típicas con estructuras granulomatosas en áreas necróticas y abundantes trofozoítos. Estas lesiones estaban rodeadas por escasas células epiteloideas y una gran cantidad de neutrófilos y macrófagos. Estas estructuras son similares a las descritas por Tsutsumi y cols. (1984) en el modelo de AHA en hámster después de 7 días de inoculación y por Chadee y Meerovitch, (1984) en un modelo de AHA en gerbos, 10 días después de la inoculación.

En el presente estudio se encontró que a los 7 días post-inoculación, la ausencia del SNP indujo la presencia de múltiples lesiones pequeñas tipo granuloma sin área necrótica, con abundantes células epiteloideas en la periferia, fragmentos de trofozoítos en el centro y presencia de pocos neutrófilos. Estos resultados son semejantes a los que reporta Chadee y Meerovitch, (1984) en un modelo de AHA en gerbo 30 días después de la inoculación.

Por otra parte, se conoce que las fibras aferentes del nervio vago envían información al SNC a través de varias citocinas (IL-1, IL-6 and TNF- α), mientras que las fibras eferentes liberan acetilcolina, la cual modula la respuesta inmune (Sternberg, 2006; Blalock, 1989). También se sabe que el nervio vago tiene propiedades regulatorias a través de efectos colinérgicos sobre neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Sternberg, 2006; Werner y cols., 2003) y que una sobre-estimulación de macrófagos por agentes infecciosos induce la formación de granulomas como sucede en una respuesta inmune crónica (Tsutsumi y cols., 1984). Basándonos en los resultados, se propone que la ausencia de la actividad colinérgica en el hígado durante la fase aguda del AHA provoca una activación temprana de los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata contra *E. histolytica*. Por lo tanto, se sugiere que la actividad de los neutrófilos sea la responsable de destruir a *E. histolytica* (Jarillo y cols., 2002).

Algunos autores sugieren que durante una invasión amebiana del hígado y el intestino la presencia de una alta cantidad de INF- γ está relacionado con la resistencia a la infección, mientras que bajas cantidades de INF- γ están asociadas con una gran susceptibilidad (Guo y cols., 2008; Sierra Puente y cols., 2009). Datos experimentales

han mostrado *in vitro* que INF- γ activa neutrófilos y macrófagos para eliminar el parásito (Guo y cols., 2008). No obstante, en este modelo de AHA en ausencia del SNP se observó una disminución en el número de trofozoítos y neutrófilos en las áreas de la lesión. Mientras que la cantidad de TNF- α no fue significativamente diferente en los hámsteres vagotomizados infectados en comparación con el sham infectado. Ahora, en este estudio se observó en los vagotomizados un aumento de INF- γ , esto es una posible explicación a la baja cantidad de trofozoítos en los tejidos, indicando que el aumento de esta citocina constituyó uno de varios factores de resistencia ante las amibas como lo sugieren Guo y cols., (2008) y Sierra-Puente y cols., (2009).

En estudios previos se mostró que la vagotomía no sólo previene el efecto protector de la estimulación del nervio vago (Ghia y cols., 2007), por su modulación en TNF- α , sino también ante la sensibilización de animales con endotoxinas se produce un efecto letal por shock tóxico debido al incremento de TNF- α en animales vagotomizados (Borovikova y cols., 2000); sin embargo, no se pudo encontrar algún incremento significativo en suero de la cantidad de TNF- α después de la vagotomía en el presente estudio. Una explicación de los diferentes resultados puede estar relacionada con el tiempo de haberse efectuado la vagotomía. Se colectaron muestras 15 días post-vagotomía, esta cirugía fue realizada en nuestro laboratorio, donde fue disecado el tronco vagal anterior por debajo del diafragma y cortado; trabajos semejantes se realizaron por vagotomías pero a nivel cervical, donde Heider y cols., (2004) encontraron algo muy similar a lo que reportamos: la vagotomía troncal anterior no incrementó el riesgo de la respuesta inflamatoria por TNF- α en pacientes con complicaciones por úlceras (Heider y cols., 2004).

Otros estudios importantes arrojan evidencia sobre los mecanismos moleculares por los que IL-10 inhibe la producción de ROS (Intermediarios reactivos de Oxígeno), principal agente pro-inflamatorio y bactericida de los neutrófilos. Dang y cols., (2006), muestran que IL-10 inhibe selectivamente la inducción de GM-CSF mediante la no fosforilación de P47 PHOX, pero no altera la inducción de TNF- α mediante la fosforilación de p47 PHOX. Esta IL-10 induce inhibición de la fosforilación de p47 PHOX debido a la inhibición de ERK1/2. En paralelo, IL-10 reduce la producción de ROS, ya que se ha observado que hay una alta concentración de ROS en ratones knockout para IL-10 comparado con controles intactos y en cultivos de neutrófilos sanguíneos en ausencia de esta citocina. Esto sugiere que la citocina anti-inflamatoria IL-10 actúa como un modulador negativo en la generación de ROS en modelos tanto

in vitro como *in vivo* (Dang y cols., 2006). Se encontró que la vagotomía induce la producción de IL-10, y cuando se inoculan las amibas este aumento, aunque es menor con respecto al vagotomizado sin amibas, es mayor que en el control con amibas, lo que permite sustentar los hallazgos histológicos en la disminución de neutrófilos y es probable que esta citocina sea la responsable de inducir a las células estelares hepáticas a especializarse en miofibroblastos (Roskams y cols., 2004; Thompson y cols., 1998) para un proceso reparador más enérgico, como lo establece García-Zepeda y cols., (2007) al describir que IL-10 podría orquestar un patrón de citocinas anti-inflamatorias y contribuir a la escasa inflamación encontrada en lesiones avanzadas de amibiasis invasiva.

Con relación al trabajo desarrollado en animales con ausencia del Sistema Nervioso Simpático (SNS), se simpatectomizaron con 40 mg/kg de peso de 5 hidroxidopamina vía intra-peritoneal; para verificar la eficiencia de este procedimiento algunos autores determinan por inmunohistoquímica la presencia de noradrenalina en ramas terminales simpáticas, la cual no se encontraría en estas condiciones (Tiegs y cols., 1999). Se evaluó el efecto fisiológico de la rama eferente simpática sobre la glucogenólisis, donde el simpático estimula la degradación de glucógeno y en ausencia de esta rama la cantidad de este polisacárido aumenta (Gerhard, 2004).

Se encontró también que el SNS tiene influencia en el desarrollo de la respuesta inmune durante la interacción huésped-parásito, pues detectamos algunos cambios en el reclutamiento de células de la respuesta inmune contra el parásito e incremento en el tamaño del absceso, éste presentaba amplias áreas hemorrágicas, muy diferente a lo encontrado en hámster control o vagotomizado, en los cuales se detectó gran cantidad de fibrosis. Las áreas hemorrágicas diseminadas tal vez se debieron a una mayor distribución amibiana, posiblemente esta diseminación fue causada posiblemente por la escasa cantidad de colágeno (tejido fibrótico) encontrada rodeando el sitio de la lesión con relación al control donde fue abundante la cantidad de colágeno. La colágena en el hígado es sintetizada y secretada por las células estelares hepáticas, este proceso es modulado por la acción coordinada de los sistemas parasimpático y simpático; en nuestro modelo de simpatectomía en el AHA, la ausencia de las fibras simpáticas posiblemente indujo a una inhibición de la especialización de las células estelares hepáticas a miofibroblastos, y por ende a una baja en la síntesis y secreción de colágeno (Roskams y cols., 2004), por lo tanto, este fenómeno relacionado con la colágena, probablemente ocasionó una falta en la

delimitación de las zonas de lesión y quizá permitió, ente otros factores, la invasión y proliferación amibiana.

En la actualidad se conoce que las terminaciones nerviosas simpáticas eferentes tienen propiedades regulatorias cuando actúan sobre receptores beta adrenérgicos y activadoras cuando actúan sobre receptores alfa adrenérgicos en diferentes tipos celulares como neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Stenberg, 2006; EleNkov y cols., 2000 y 2008), es probable que durante las fases tempranas de la infección, el neurotransmisor noradrenalina posiblemente tenga su efecto sobre receptores alfa para desarrollar una respuesta inmune de mayor actividad y eliminar el agente causal, posteriormente, una vez eliminado el agente causal durante una fase tardía, se activarían los receptores beta para disminuir la respuesta inmune y lograr la homeostasis (Miao y cols., 2000; Sternberg, 2006; EleNkov, 2008). Basándonos sobre los resultados, se propone que la ausencia de la actividad adrenérgica sobre receptores alfa en el hígado durante la fase aguda del AHA, posiblemente inhiba el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos frente a *E. histolytica*, permitiendo el desarrollo de la infección con una amplia diseminación de los parásitos.

Está descrito que durante el proceso del AHA se activan mecanismos compensadores de la respuesta inmune innata para eliminar a *E. histolytica* y restablecer el daño tisular.

Se sabe que la inhibición en la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias como INF- γ y TNF- α pueden contribuir a la invasión temprana de la amiba en el hígado, y paulatinamente en la inflamación tardía predominando el AHA necrótico (Campbell y Chadee, 1997). De igual manera, se conoce que hay una transición de la respuesta inflamatoria inicial por neutrófilos a una tardía por células mononucleares que es congruente con una inflamación normal, probablemente orquestada por IL-6. (Guo y cols., 2008). Pero, en este modelo, los bajos niveles de IFN- γ podrían estar asociados con susceptibilidad aumentada para la amibiasis hepática e intestinal, acorde a lo descrito por Guo y cols., (2008). También se observó que la ausencia del sistema simpático permitió un aumento en el número y diseminación de trofozoítos, asociado a una disminución de neutrófilos en el área de la lesión, esto probablemente debió asociarse a que la infección cursó con niveles bajos de INF- γ y TNF- α en los sueros de los hámsteres simpatectomizados, diferente a lo encontrado en los hámsteres control. Posiblemente el efecto colinérgico sobresaliente evitó un aumento de los valores de TNF- α , ya que se ha reportado que la acción colinérgica en procesos

inflamatorios impide el aumento de concentraciones séricas de TNF- α durante el shock tóxico, a través de la liberación de acetilcolina del nervio vago, lo que indica que esta vía tiene un papel importante en la prevención del exceso de la respuesta inflamatoria (Sternberg, 2006).

Por otra parte, se ha reportado un aumento en los niveles de IL-10 durante la infección por *E. histolytica* que probablemente esté inhibiendo la actividad de macrófagos, facilitando así la invasión amebiana (Bansal y cols., 2005). Con relación a esto, se encontró en animales con ausencia del efecto simpático, un incremento de IL-10 dos veces más que en animales íntegros. Probablemente esto se asocie a lo reportado de que en ausencia del sistema simpático, la actividad colinérgica sobre receptores nicotínicos ante un proceso inflamatorio, se inhiben los macrófagos e incrementa la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 (EleNkov, 2008; Miao y cols., 2000; Sternberg, 2006); además de estar asociada a una respuesta Th2, IL-10 se encuentra altamente vinculada con una alteración de la respuesta Th1 (Jan Vilcek, 2003). Como se comentó, animales simpatectomizados con AHA cursaron con niveles altos de IL-10, posiblemente evitando así una respuesta efectiva contra *E. histolytica* y disminuyendo la acción efectora de ésta, permitiendo así una amplia diseminación de los trofozoítos por el tejido.

10.- Conclusiones

La vagotomía indujo un control simpático, ocasionando cambios en la respuesta inmune en el AHA como fueron:

- a) Disminución temprana del número de amibas debido a una respuesta inflamatoria más eficaz, la cual cursó con un incremento de neutrófilos y de IFN- γ .
- b) Aumento de IL-10, la cual puede orquestar un panorama de citocinas anti-inflamatorias y contribuir a la escasa inflamación encontrada en la lesión avanzada, así como inducir un proceso reparativo mediante la diferenciación de las células estelares hepáticas que se especializan a miofibroblastos.

Por otra parte, proponemos que bajo la ausencia del SNS existió prevalencia parasimpática durante el desarrollo del AHA, ocasionando:

- a) Un estado inmune deprimido por una disminución en el reclutamiento de las células de la respuesta inflamatoria.
- b) Una disminución en las citocinas pro-inflamatorias como INF- γ y TNF- α permitiendo aumento en la proliferación e invasión amebiana a través del tejido hepático
- c) Elevación de IL-10, posiblemente la responsable de la regulación de la respuesta inmune efectora contra *E. histolytica*.

11.- Bibliografía

Abbas KA. (2002). *Inmunológica Celular y Molecular*, Cuarta Edición, Editorial McGraw, USA. Pp. 280- 300.

Abd-Alla M, Jackson T, Ravdin J. (1998). Serum IgM antibody response to the galactose-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg.* 59:431-434.

Abioye A, Lewis A, McFarlane H. (1972). Clinical evaluation of serum immunoglobulins in amoebiasis. *Immunol.* 23:937-945.

Ackerman KD, Madden KS, Livnat S, Felten SY, Felten DL. (1991). Neonatal sympathetic denervation alters the development of in vitro spleen cell proliferation and differentiation. *Brain Behav Immunol.* 5:235-61.

Arvid B, Maunsbach and Björn Afzelius A. (1999). *Biomedical Electron Microscopy. Illustrated Methods and interpretations.* Academic Press. USA. 254-266

Avron, B, Duestsch, RM. and Mirelman, D. (1982). Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by *Entamoeba* trophozoites. *Biochem Biophys Res Commun.* 108, 815-821.

Bansal, DR, Sehgal, Y, Chawla, N. Malla, and Mahajan, R. C. (2005). Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasit Immunol.* 27:37-43.

Befus AD, Mathison R. and Davison J. (1999). Integration of neuro-endocrine immune responses in defense of mucosal surfaces. *Am J Trop Med Hyg.* 60:26-34.

Bekker-Mendez VC, Pérez-Castillo VL, Rico-Rosillo MG, Pérez-Rodríguez M, Arellano-Blanco J, Kretschmer-Schmid RR, Talamás-Rohana P. (2006). Downregulation of selected cytokines in amebiasis. *Arch Med Res.* 37:556-8.

Berczi I, and Szentivanyi A. (2003). *Cytoquines and Chemokines.* En: *The immune-neuroendocrine Circuitry.* Edited by I. Berczi and A. Szentivanyi. Elsevier Science, USA. pp 191-220.

Bilbo SD, Drazen DL, Quan N, He L, Nelson RJ. (2002). Short day lengths attenuate the symptoms of infection in Siberian hamsters. *Proc Biol Sci.* 269: 447-54.

Blalock JE. (1989). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev.* 69:1-32.

Borovikova LV, Ivanova SZ, Yang MH, Botchkina GI, Watkins LR. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 405: 458-62.

Burchard GD, and Bilke R. (1992). Adherence of pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. *Parasitol Res.* 18:146-153.

Burchard GD, Prange G, Mirelman D. (1993). Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and the human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. *Parasitol Res.* 79:140-145.

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 90:1131-7.

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.

Calderón J, and Tovar R. (1986). Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HM1 by treatment with human serum. *Immunol.* 58:467-471.

Campbell, D, and K. Chadee. (1997). Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor-alpha responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis.* 175:1176-83.

Campos-Rodríguez R, Shibayama-Salas M, Pacheco-Yépez J, Martínez Palomo A. and Tsutsumi V. (1995). Passive immunization during experimental amebic liver-abscess development. *Parasitol Res.* 81:86-88.

Chadee K, Meerovitch E. (1984). The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol.* 117: 71-80.

Chan, TM, and Exton JH. (1976). A rapid method for the determination of glycogen content in small quantities of tissue or isolated hepatocytes. *Anal Biochem.* 71:96-105.

Cohen, JA. (1995). Stubborn amoeba takes center stage. *Science.* 267, 822-824.

Correa SG, Maccioni M, Rivero VE, Iribarren P, Sotomayor CE, Riera CM. (2007). Cytokines and the immune-neuroendocrine network: What did we learn from infection and autoimmunity? *Cytokine Growth Factor Rev.* 18:125-34.

Crofford LJ, Sano H, Karalis K, Webster EL, Goldmuntz EA, Chrousos GP, Wilder RL. (1992). Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 90:2555-64.

Dang Pham my-Chan, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidallo MA, and El-Benna J. (2006). Anti-inflammatory effect of interleukin 10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced P47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J.* 20: 1504-6.

Dennis M, and Chadee K. (1989). Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha kill *E. histolytica* trophozoites in vivo. *J Leukoc Biol.* 46:270-4.

Diamantstein T, Klos, Gold D, and Hahn H. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. *J Immunol.* 126: 2084-2086.

Diamond LS. (1978). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science.* 134: 336-337.

Diamond LS. (1980). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: progress and problems. *Arch Invest Méd.* 11: 47-54.

EleNkov Ilia J. (2008). Effect of catecholamines on the immune response. En: NeuroImmune Biology, Istvan Berczi and Andor Szentivanyi, elsevier, 1^a edition, Canada and USA. Pp- 189-203.

EleNkov IJ Wilder RL. Chrousos GP. and Vizi ES. (2000). The sympathetic Nerve – An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System. *Pharmacol Rev.* 52:595-638.

Eliézer M, Pérez Tamayo R. (1984). Nota sobre la histopatología de la amibiasis invasora del intestino grueso. *Patología*, Vol. 22: 233-245.

Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (1991). The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. *Biol Cell.* 72:189-200.

Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13: 318-331.

García-Zepeda EA, Rojas-López A, Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P. (2007). Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol.* 29:679-84.

Gerhard PP. (2004). Control of Hepatocyte Metabolism by Sympathetic and Parasympathetic Hepatic Nerves. *The Anatomical Record Part A.* 280: 854–867.

Ghia JE, Biennerhasset P, El-Sharkawy RT, and Collins SM. (2007). The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293: G711-G718.

Goldstein J, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Lifshin E, Sawyer LC, and Michael JR. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X Ray Microanalysis* Springer Sci New York, USA 689.

Gonzalez-Amaro R, Andrade S, Baranda L, Abud-Mendoza C, Portales D P, Moncada B, Llorente L. (1994). Plasma levels and in vitro production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with amebic liver abscess. *Rev Invest Clin.* 46: 209- 13.

Guerrant D. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest.* 68:1305-13. *o* infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol.* 169:4496-503.

Guo X, Stroup SE, Houghton ER. (2008). Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-gamma. *Mucosal Immunol.* 1: 139-46.

Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, EubaNks A, Lysterly D, Petri WA. Jr. (2000). Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol.* 38:3235-3239.

Hayat MA. (2002). *Microscopy, Immunohistochemistry and Antigen Retrieval Methods.* For light and electron microscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp 256.

Heider TR, Koruda MJ, Farrell TM, Behrns KE. (2004). Acute vagotomy does not augment the systemic inflammatory response in patients with peptic ulcer disease. *Am Surg.* 70:342-6

Haupt ER, Glemboczi DJ, Obrig TG, Moskaluk CA, Lockhart LA, Wright RL, Seamer RM, Keepers TR, Wilkins TD, Petri WA. Jr. (2002). The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol.* 169:4496-503.

Hughes M, Petri W. (2000). Amebic liver abscess. *Infect Dis Clin N A.* 14:565-82.

Jackson T, Anderson C, Simjee A. (1984). Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 78:342-345.

Jan Vilcek. (2003). The cytokines: an overview. Ed: W. Thomson and Michael T. Lotze. *The cytokine handbook.* 4th edition, volume I, Academic press. USA. Pp- 3-19.

Jarillo-Luna RA, Campos Rodríguez and V. Tsutsumi. (2002). *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experiment Parasit.* 101:40-56.

Kelsall B, Jackson T, Gathiram V, Salig S, Vaithilingum M, Pearson RD, Ravdin JI. (1994). Secretory immunoglobulin A antibodies to the galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. *Am J Trop Med Hyg.* 51:454-459.

Knobloch J, Mannweiler E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg.* 4:727-732.

Kretschmer RR, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López Osuna M, Lecuona M, Castro EM, Arellano J. (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.* 7:527-541

Lapid-Volosin M, Gaston Calfa, Silvia Kademian, Darilo Ceschin y Gabriel A. Rabinovich. (2004). *Depresión Mayor, Estrés, Trastornos Afectivos y su Influencia en la Respuesta Inmune, Inmunopatología Molecular,* Editorial panamericana. Pp 123-250.

Leippe M, Sievertsen HJ, Tannich E. and Horstmann RD. (1995). Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.* 111:569-574.

Leroy A, Lauwaet T, De Bruyne G, Mareel M. (2000). *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *Faseb J.* 14: 1139-1146.

López-Osuna M, Cárdenas G, Isario J, Arellano J, Fernández-Diez J, Kretschmer R. (2000). Increased susceptibility to experimental amebic abscess of the liver (EAAL) in Gerbils (*Meriones unguiculatus*) with Induced eosinopenia. *Arch Med Res.* 31:108-109.

Luna LG. (1968). En: *Manual of Histologic Staining Methods.* Institute of Pathology, Armed Forces, NY, 3rd edition, McGraw-Hill; pp 121-122.

Martínez-Palomo A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol Today*; 3: 111-118.

Martinez-Palomo A. (1989). Amibiasis. Primera edición. Panamericana, México. 125-140.

Mattern CF, and Keister BD. (1977). Experimental amebiasis, *Am J Trop Med Hyg.* 26:402- 411.

Meza I, Torres G, Gorrero H.K, Meraz A.M. (1994). Organización Molecular de *Entamoeba histolytica*. En. Amibiasis, Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*, Kretschmer RR, editorial Trillas, primera edición, México. Pp. 39-55.

McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol*; 19:312-9.

Miao FJ, Janig W, and Levine JD. (2000). Nociceptive neuroendocrine negative feedback control of neurogenic inflammation activated by capsaicin in the rat paw: role of the adrenal medulla. *J Physiol.* 3:601-10.

Mircoli L, Fedele L, Benetti M, Battista GB, Radaelli A, Perlini S, Ferrari A. (2002). Preservation of the Baroreceptor Heart Rate Reflex by Chemical Sympathectomy in Experimental Heart Failure. *Circulat.*106:866-872.

Morán P, Rico G, Ramiro M, Olvera O, Ramos F, González E, Valadez A, Uriel O, Melendro EI, Ximenez C. (2002). Defective production of reactive oxygen intermediates (ROI) in a patient with recurrent amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg.* 67:632-635.

Myrtha Arnold. (2006). Gut Vagal Afferents Are Not Necessary for the Eating-Stimulatory Effect of Intraperitoneally Injected Ghrelin in the Rat. *Nut Med.* 23: 456-67.

Nelson CP. (1987). Beta-adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocytes respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *J Immunol.* 139: 2392-2397.

Olivos-Garcia A, Nequiz-Avendano M, Tello E, Martinez RD, Gonzalez-Canto A, Lopez- Vancell R, Garcia de Leon MC, Montfort I, Perez-Tamayo R. (2004). Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Exp Mol Pathol.*77:66-71.

Ortiz L. (1994). Parasitic infections and the immune system. En: Amebiasis. Kierszenbaum, F. ed. Ac. Press, San Diego, CA. Pp. 145-162.

Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Serrano-Luna J, Espinosa-Cantellano M, Petri WA, Tsutsumi V, Shibayama M. (2000). *Entamoeba histolytica*: localization Of theGal/GalNAc adherence lectin in experimental amebic liver abscess. *Arch Med Res.* 31:S242-4.

Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A. (1992). Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int J Parasitol.* 22:125-9.

Petri WA, Jackson TFHG, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, and Mirelman D. (1990). Pathogenic and nonpathogenic strains of

Entamoeba histolytica can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. Infect Immun. 58, 1802-1806.

Petri WA Jr, Jackson TFHG, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, Chapman MD, Keren Z, and Mirelman D. (1991). Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infect Immun. 58:1802-1806.

Picklo MJ. (1997). Methods of sympathetic degeneration and alteration. J Auton Nerv Syst. 17:111-25.

Pinilla AE, López MC, Castillo BC, Morales O, Reyes P, De la Hoz FP, Nicholls RS y Duque S. (2004). Estandarización de la prueba de ELISA para la detección de IgM en el diagnóstico de absceso hepático amebiano. Infectio. En: Memorias del IV Encuentro Nacional de Investigaciones en enfermedades Infecciosas. 82:140.

Prabir KG, Ventura J, Gupta S, Serrano J, Tsutsumi V and Ortíz-Ortíz L. (2000). Experimental amebiasis: Immunohistochemical Study of Immune cell Populations. J Eukaryot Microbiol. 47:395-399.

Ravdin IJ, Jackson TFHG, Petri WA Jr, Murphy CFM, Unger BL, Gathiram V, Skilogiannis J, and Simjee AE. (1990). Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis. 162: 768-772.

Ravdin IJ, and Kelsall BL. (1994). Role of mucosal secretory immunity in the development of an amebiasis vaccine, Am J Trop Med Hyg. 50: 36-41.

Reed S. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 13:196-206.

Roitt IM, Delves PJ. (2003). Fundamentos Inmunología, Editorial Panamericana, Décima Edición, Impreso en Argentina. Pp 241-244.

Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR. (2003). The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. Parasitol Res. 90(4):264-7.

Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. (2004). Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 280: 910-23.

Salata RA, Martinez-Palomo A, Canales L, Murria HW, Trevino N, Ravdin JI. (1990). Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. Infect Immun. 58: 3941-6.

Salata RA, Pearson RD, and Ravdin JI. (1985). Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent ameba by the activated macrophage. J Clin Invest. 76: 491-499.

Salata RA, and Ravdin JI. (1986). Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. Rev Infect Dis. 8:261-269.

Sathar M, Simjee A, Nel J, BredeNkamp B, Gathiram V, Jackson T. (1988). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *S Afr Med J.* 74:625-628.

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.

Seydel K, Zhang T, Stanley SL Jr. (1997). Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun.* 65:3951-3953.

Shibayama M, Rivera-Aguilar V, Barbosa-Cabrera E, Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Tsutsumi V, Pacheco-Yépez J. and Campos-Rodríguez R. (2008). Innate immunity prevents tissue invasión by *Entamoeba histolytica*. *Canad J Microbiol.* 54:1032-1042.

Sierra-Puente RE, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna RA, Muñoz-Fernández L, Rodríguez MG, Muñoz-Ortega MH, Ventura-Juárez J. (2009). Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* 31: 384-91.

Singh U, Petri W. (2001). *Amibas en: Principles and Practice of Clinical Parasitology.* Jhon Wiley and Sons, LTD. 1:197-218.

Stanley SL, Terry Jackson FH, Foster GL, and Singh S. (1998). Longitudinal study of the antibody response to recombinant *Entamoeba histolytica* antigens in patients with amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg.* 58:414-416.

Stanley SL. (2001). Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol.* 17:280-5.

Sternberg EM. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 6:318-28.

Strieter RM, Belperio JA. and Keane MP. (2002). Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest.* 109:699-705.

Tanaka K, Ohkawa S, Nishino T, Nijjima A, Inoue S. (1987). Role of the hepatic branch of the vagus nerve in liver regeneration in rats. *Am J Physiol.* 253:G439-44.

Tay-Lara- Gutierrez -Velazco. (2000). *Parasitología sexta edición 3a. Reimpresión.* Mexico. Pp 30-42.

Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 4:883-6.

Tiegs G, Bang R, Neuhuber WL. (1999). Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by adrenergic stimulation. *J Neuroimmunol;* 96: 131–143.

Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. (1998). Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitorcytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology.* 28:1518-24

Trissl D. (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal host. Rev Infect Dis. 4:1154-1184.

Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. (1984). Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Amer J Pathol, 117: 81-91.

Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A. (1990). Experimental hepatic amebiasis: acute inflammation in the rat. Arch Invest Med. 1:233-7.

Valenzuela O, Ramos F, Morán P, González E, Valadez A, Gomez A, Melendro EI, Ramiro M, Muñoz O, Ximenez C. (2001). Persistence of secretory antiamebic antibodies in patients with past invasive intestinal or hepatic amoebiasis. Parasitol Res. 87:849-852.

Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderon J. (1998). Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. Parasite Immunol. 20:255-262.

Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Rodríguez-Martínez HA, Rodríguez-Reyes A, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. (1997). Human amoebic liver abscess: Expression of ICAM-1, ICAM-2 and Von Willebrand factor endothelial cells. Parasitol Res. 83:510-514.

Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V. (2002). Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. Can J Microbiol. 48:123-31.

Ventura-Juárez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, Pineda-Vázquez A, Muñoz-Fernández L, Madrid-Reyes JI, and Campos-Rodríguez R. (2003). Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and t cells. Parasite Immunol. 25, 503-511.

Ventura-Juárez J, Barba-Gallardo LF, Muñoz-Fernández L, Martínez-Medina L, Márquez-Díaz F, Sosa-Díaz SJ, Gerardo-Rodríguez M, González-Romo R, Campos-Rodríguez R. (2007). Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. Parasite Immunol.29:201-9.

Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna RA, Muñoz-Fernández L, Escario-G-Trevijano JA, Pérez-Serrano J, Quintanar JL, Salinas E, Villalobos-Gómez FR. (2009). Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. Parasitol Res.104:821-6.

Walsh JA. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. 3: 320-26.

Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Xu Z, Ding YQ, Ju G. (2002). Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. World J Gastroenterol. 8: 540-5.

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. Annu Rev Immunol. 20:125-63.

Werner MF, Fraga D, Melo MC, Souza GE, Zamprnio AR. (2003). Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. *Inflamm Res.* 52: 291-6.

Winfried L. Neuhuber and Gisa Tiegs. (2004). Innervation of Immune Cells: Evidence for Neuroimmunomodulation in the Liver. *The Anatomical Record Part A.* 280A:884-892.

Zengzhun G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng-IW, Mirelwon D. (1999). Analysis by enzimed-liNked in immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 37:3034-3036.

Zurier RB, Weissmann G, Hoffstein S, Kammerman S and Tai HH. (1974). Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and Cgmp, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *J Clin Invest.* 53:297-309.

Ximenez C, Leyva O, Moran P, Ramos F, Melendro E. (1993). *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann Trop Med Parasitol.* 87:31-39.

<http://www.ssa.gob.mx>

<http://www.npg.org/>

12.- Apéndices

Apéndice A

Suero para medio de cultivo:

- Descongelar el frasco de vitaminas y el frasco de suero bovino que están en el congelador de -20°C.
- Ponerlos en un vaso de precipitado con agua tibia para que se descongele el contenido de los frascos.
- Descomplementarizar el suero a 63°C por 30 min.
- Después de que se descongelaron los frascos. Tomar 20 ml de vitamina y agregarlas al frasco de suero bovino en condiciones de esterilidad.

El medio de cultivo se preparó con los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad
Biosate o peptona	30 gr
Dextrosa	10 gr
Cloruro de sodio	2 gr
Fosfato de potasio monobásico	0.6 gr
Fosfato de potasio dibásico	1 gr
Cisterna	1 gr
Ácido ascórbico	0.2 gr
Citrato férrico de amonio	0.0236 gr
Agua bidestilada	750 ml

- Se disolvieron en orden secuencial los reactivos, hasta obtener un volumen final de 750 ml.
- Enseguida se midió el PH y ajustó a 6.8 con NaOH 0.2N, aforó en probeta de 1000ml hasta obtener 820 ml.
- Se envasaron los tubos previamente lavados y esterilizados.
- Se cultivó en un tubo de ensayo; en un tubo grande se depositaron 1060 µl de suero fetal bovino, con 8 ml de medio y 3 gotas de concentrado de amiba. En tubos pequeños se agregó 800µl de suero, 10 ml de medio y 4 gotas de concentrado de amiba. La resiembra se realizó cada tres o cuatro días según el porcentaje de amibas, debido a que presentan un porcentaje exponencial.

- Pasado el tiempo de crecimiento, los tubos se sometieron a frío durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 1500 r.p.m y se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el botón de concentrado de amibas en el medio (Diamond, 1961).

Apéndice B

Técnica de Hematoxilina – Eosina

1. Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 5 minutos cada una.
2. Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
3. Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
4. Se colocaron en etanol a 96°C por 2 minutos.
5. Se colocaron en etanol a 96°C por 2 minutos.
6. Se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
7. Se colocaron las laminillas en Hematoxilina de Harris de tres a cinco minutos.
8. Pasando el tiempo, se inclinaron las laminillas para quitarles el líquido extra lavando con agua.
9. Posteriormente se aplicó un proceso de diferenciación con alcohol ácido de dos a tres baños y se pasó a solución de carbonato de litio.
10. Se quitó el exceso lavando bajo el chorro de agua por 15 minutos.
11. Posteriormente se colocó en alcohol al 96% de 2 a 3 baños.
12. Después se pasó a la eosina por 2 minutos.
13. Se colocaron en etanol al 96% por 2 minutos.
14. Se colocaron en etanol al 96% por 2 minutos.
15. Se pasaron a etanol al 100% por 2 minutos.
16. Se pasaron a etanol al 100% por 2 minutos.
17. Después se introdujeron a xileno por 5 minutos.
18. Se cambiaron nuevamente a xileno por 5 minutos .
19. Por ultimo se montaron las laminillas con Entellan.

Apéndice C

Técnica de PAS

- 1.- Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 5 minutos cada una.
- 2.- Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
- 3.- Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
- 4.- Se colocaron en etanol a 96 °C por 2 minutos.
- 5.- Se colocaron en etanol a 96°C por 2 minutos.
- 6.- Se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
- 7.- Se colocaron en ácido periódico por 10 minutos.
- 8.- Las laminillas se lavaron de 5 a 10 minutos en agua destilada.
- 9.- Se colocaron en el reactivo de Schiff por 15 minutos.
- 10.- Se lavaron en agua corriente por 10 minutos.
- 11.- Se colocaron en hematoxilina de Harris por 3 minutos.
- 12.- Se lavaron en agua corriente para quitar el exceso.
- 13.- Posteriormente se aplicó un proceso de diferenciación con alcohol ácido de dos a tres baños y pasarlo a solución de carbonato de litio, después se lavaron en agua corriente por 10 minutos.
- 14.- Se colocaron en etanol al 96% por 2 minutos.
- 15.- Se colocaron en etanol al 96% por 2 minutos.
- 16.- Se pasaron a etanol al 100% por 2 minutos.
- 17.- Se pasaron a etanol al 100% por 2 minutos.
- 18.- Después se introdujeron a xileno por 5 minutos.
- 19.- Se cambiaron nuevamente a xileno por 5 minutos.
- 20.- Por último se montaron las laminillas con Entellan (Ventura *et al.*, 2003).

Apéndice D

Técnica de Mason

- 1.- Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 5 minutos cada una.
- 2.- Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
- 3.- Se colocaron en etanol al 100% por 2 minutos.
- 4.- Se colocaron en etanol al 96°C por 2 minutos.
- 5.- Se colocaron en etanol al 96°C por 2 minutos.
- 6.- Se lavaron con agua destilada por 2 minutos.

- 7.- Se colocaron en solución de Bouin por una hora a 60°C.
- 8.- Se lavaron con agua corriente teniendo cuidado de quitar toda la solución Bouin.
- 9.- Se colocaron en hematoxilina de Weighert, la cual se prepara a partir de una solución A más una solución B en proporción 1:1 por 10 min.
- 10.- Se lavaron con agua corriente por 10 min.
- 11.- Se colocaron escarlata de berbich por 2 min.
- 12.- Se lavaron en agua corriente por 5 min.
- 13.- Se colocaron en ácido fosfotúngstico por 15 min.
- 14.- Se lavaron en agua corriente por 10 min.
- 15.- Se colocaron en verde brillante por 30 min.
- 16.- Se lavaron en agua corriente por 10 min.
- 17.- Se colocaron en etanol al 96%, un baño.
- 18.- Se colocaron en etanol al 96%, un baño.
- 19.- Se pasaron a etanol al 100%, un baño.
- 20.- Se pasaron a etanol al 100%, un baño.
- 21.- Después se introdujeron a xileno por 5 minutos.
- 22.- Se cambiaron nuevamente a xileno por 5 minutos.
- 23.- Por último se montaron las laminillas con Entellan.

Apéndice E

Inmunohistoquímica para neurofilamentos de bajo peso molecular (NF- 68 kDa)

- 1- Inicialmente se colocaron las laminillas en etanol al 100% por 3 minutos.
- 2- Se realizó el proceso de inhibición de peroxidasas endógenas propias del tejido donde se procederá a colocar la laminilla en metanol + peróxido de hidróxido (50 ml Metanol + 1 ml peróxido de hidrógeno 30% (Grado Reactivo) por 30 minutos.
- 3- Se colocaron en etanol al 100% por 3 minutos.
- 4- Se colocaron en etanol a 96°C por 3 minutos.
- 5- Se colocaron en etanol a 96°C por 3 minutos.
- 6- Se colocaron en etanol a 70°C por 3 minutos.
- 7- Se lavaron con PBS 1x por 5 minutos.
- 8- Se realizó recuperación de los antígenos con Citrato de Sodio 0.01M en olla exprés por un minuto.
- 9- Se colocaron en PBS1x por 5 minutos.

- 10- Se preparó la solución de bloqueo, la cual se utiliza para ocultar los sitios inespecíficos que son 250 μ l de Suero Fetal + 750 μ l de PBS1x = 1 ml (PBS1x = PBS pH = 7.4 a 0.1 M).
- 11- Se agregó a las laminillas 100 μ l de la solución de bloque durante 60 minutos.
- 12- Pasado el tiempo, se inclinaron las laminillas para quitar el líquido extra.
- 13- Posteriormente se agregó 100 μ l del anticuerpo (ratón anti-NF 68 kDa de humano).

Se incubaron TODA LA NOCHE EN REFRIGERADOR A 4°C.

Se quitó el exceso lavando con PBS Tween 3 veces.
- 14- Posteriormente se colocó el conjugado DAKO Envision, el cual contiene fracciones Fab de Cabra ANTI –RATÓN y Cabra ANTI –CONEJO marcados con Peroxidasa por 60 minutos a T.A.

Después se lavaron las laminillas en PBS Tween 3 veces.
- 15- Se revelaron las laminillas aplicando un mililitro de *Diamino Benzidina, se colocaron 100 μ l del revelador en cada laminilla por 5 minutos. Y se lavaron en PBS 2 veces.
- 16- Se pasó a agua destilada por 5 minutos.
- 17- Después se tiñó cada laminilla en hematoxilina como contraste (1:10
1 ml de hematoxilina + 9 de agua destilada) por 5 minutos.
- 18- Por último, se deshidrataron en etanol en forma ascendente y se montaron con entellan.

Apéndice F

Inmunohistoquímica para neutrófilos, macrófagos y células NK

- 1- Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 10 minutos cada una.
- 2- Después se introdujeron en etanol al 100%, un solo cambio.
- 3- Para la inhibición enzimática propia del tejido se procedió a colocar la laminilla en metanol + peróxido de hidrógeno (50 ml metanol + 1 ml peróxido de hidrógeno 30% (Grado Reactivo) por 30 minutos.
- 4- Se colocaron en etanol al 100% por 3 minutos.
- 5- Se colocaron en etanol a 96 °C por 3 minutos.
- 6- Se colocaron en etanol a 96 °C por 3 minutos.
- 7- Se colocaron en etanol a 70 °C por 3 minutos.

- 8- Se lavaron con PBS 1x por 5 minutos
- 9- Se desenmascararon los antígenos con citrato de sodio 0.01M en olla exprés por un minuto.
- 10- Se colocaron en PBS1x por 5 minutos.
- 11- Se preparó la solución de bloqueo, la cual se utilizó para ocultar los sitios inespecíficos que son 250 μ l de suero fetal + 750 μ l de PBS1x = 1 ml (PBS1x = PBS pH = 7.4 a 0.1 M).
- 12- Se agregó a las laminillas 100 μ l de la solución de bloqueo durante 60 minutos.
- 13- Pasando el tiempo se inclinaron las laminillas para quitar el líquido extra.
- 14- Posteriormente se agregó 100 μ l de cada anticuerpo (conejo anti MPO de humano, ratón anti-CD68 de rata, ratón anti-NKR-P1 de rata A DILUCIÓN 1:40/1:50.) a su laminilla correspondiente.
Se incubaron TODA LA NOCHE EN REFRIGERADOR A 4°C
Se quitó el exceso lavando con PBS Tween 3 veces.
- 15- Posteriormente se colocó el conjugado DAKO Envision (K1490), el cual contiene fracciones Fab de Chivo ANTI –RATÓN y Chivo ANTI – CONEJO marcados con peroxidasa por 60 minutos a T.A.
- 16- Después se lavaron las laminillas en PBS Tween 3 veces
- 17- Se revelaron las laminillas aplicando un mililitro de *Diaminobenzidina, se colocaron 100 μ l del revelador en cada laminilla por 5 minutos. Y se lavaron en PBS 2 veces.
- 18- Se pasaron a agua destilada por 5 minutos.
- 19- Después se tiñó cada laminilla en hematoxilina como contraste (1:10 1 ml de hematoxilina + 9 de agua destilada) por 5 minutos.
- 20- Por último, se deshidrataron en etanol de concentración ascendente y se montaron con entellan.

Apéndice G

Inmunohistoquímica para trofozoítos de *E. histolytica*

1. Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 10 minutos cada una.
2. Después se introdujeron en etanol al 100%, un solo cambio.
3. Para la inhibición enzimática propia del tejido se procedió a colocar la laminilla en metanol + peróxido de hidrógeno. (50 ml metanol + 1 ml peróxido de hidrógeno 30% (grado reactivo)) por 30 minutos.
4. Se colocaron en etanol al 100% por 3 minutos.

5. Se colocaron en etanol a 96°C por 3 minutos.
6. Se colocaron en etanol a 96°C por 3 minutos.
7. Se colocaron en etanol a 70°C por 3 minutos.
8. Se lavaron con PBS 1x por 5 minutos.
9. Se desenmascararon los antígenos con citrato de sodio 0.01M en olla exprés por un minuto.
10. Se colocaron en PBS1x por 5 minutos.
11. Se preparó la solución de bloqueo, la cual se utilizó para ocultar los sitios inespecíficos que son 250 µl de suero fetal + 750 µl de PBS1x = 1 ml (PBS1x = PBS pH = 7.4 a 0.1 M).
12. Se agregó a las laminillas 100 µl de la solución de bloque durante 45 minutos.
13. Pasado el tiempo, se inclinaron las laminillas para quitar el líquido extra.
14. Después se agregaron 100 µl del anticuerpo de conejo anti-amiba diluido 1:400. preparándolo de la siguiente manera: se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml 1 ml de PBS más 2.5 microlitros del anticuerpo de conejo anti-amiba.
15. Se incubaron las laminillas a 37°C durante 60 minutos y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.
16. Posteriormente se lavaron en PBS Tween por 3 veces.
17. Se incubaron con el segundo anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa. Con una dilución de 1:100, el cual se preparó de la siguiente manera: se colocó 1 ml de PBS 1x + 10 µl de anticuerpo de cabra anti-conejo.
18. Se incubaron por 60 minutos a 37°C.
19. Se lavaron en PBS Tween 3 veces.
20. Se revelaron añadiendo 1 ml de *diaminobenzidina aplicando 100 µl del revelador en cada laminilla por 5 minutos.
21. Se lavaron en PBS 2 veces.
22. Después se pasaron a agua destilada por 5 minutos.
23. Después se tiñeron en hematoxilina como medio de contraste. (1:10 1 ml de hematoxilina + 9 de agua destilada) por 5 minutos.
24. Por último, se deshidrataron en etanol en forma ascendente y montaron con entellan.

Apéndice H

Inmunohistoquímica para IFN- γ , TNF- α e IL-10

- 1- Inicialmente se desparafinaron las laminillas dos veces en xileno por 10 minutos cada una.
- 2- Después se introdujeron en etanol al 100%, un solo cambio.
- 3- Para la inhibición enzimática propia del tejido se procedió a colocar la laminilla en metanol + peróxido de hidrógeno (50 ml metanol + 1 ml peróxido de hidrógeno 30% (grado reactivo)) por 30 minutos.
- 4- Se colocaron en etanol al 100% por 3 minutos.
- 5- Se colocaron en etanol a 96 °C por 3 minutos.
- 6- Se colocaron en etanol a 96 °C por 3 minutos.
- 7- Se colocaron en etanol a 70 °C por 3 minutos.
- 8- Se lavaron con PBS 1x por 5 minutos.
- 9- Se desenmascararon los antígenos con citrato de sodio 0.01M en olla exprés por un minuto.
- 10- Se colocaron en PBS1x por 5 minutos
- 11- Se preparó la solución de bloqueo, la cual se utilizó para ocultar los sitios inespecíficos que son 250 μ l de suero fetal + 750 μ l de PBS1x = 1 ml (PBS1x = PBS pH = 7.4 a 0.1 M).
- 12- Se agregó a las laminillas 100 μ l de la solución de bloque durante 60 minutos.
- 13- Pasando el tiempo se inclinaron las laminillas para quitar el líquido extra.
- 14- Posteriormente se agregaron 100 μ l de cada anticuerpo (conejo anti IFN γ de humano, conejo anti-TNF α de humano, conejo anti-IL-10 de humano A DILUCIÓN 1:100.) a su laminilla correspondiente.
Se incubaron TODA LA NOCHE EN REFRIGERADOR A 4°C
Se quitó el exceso lavando con PBS Tween 3 veces.
- 15- Posteriormente se colocó el conjugado DAKO Envision (K1490), el cual contiene fracciones Fab de cabra ANTI –RATÓN y cabra ANTI – CONEJO marcados con peroxidasa por 60 minutos a T.A.
- 16- Después se lavaron las laminillas en PBS tween 3 veces.
- 17- Se revelaron las laminillas aplicando un mililitro de diaminobenzidina, se colocaron 100 μ l del revelador en cada laminilla por 5 minutos y se lavaron en PBS 2 veces.

- 18- Pasaron a agua destilada por 5 minutos.
- 19- Después se tiñó cada laminilla en hematoxilina como contraste (1:10
1 ml de hematoxilina + 9 de agua destilada) por 5 minutos.
- 20- Por último, se deshidrataron en etanol en forma ascendente y montaron con entellan.

Apéndice I

Técnica para la cuantificación de glucógeno.

- 1.- Para la determinación del glucógeno hepático, se procedió a homogenizar 250 mg de tejido hepático, con un homogenizador de vidrio.
- 2.- Se evaluó glucosa libre en el homogenizado por el método de Glucosa Oxidasa BioSystem ref 11504.
- 3.- Posteriormente el homogenizado fue digerido con la enzima amiloglucosidasa agregando 0.005 gr en una solución de 1 ml de homogenizado mas 1 ml de un buffer de fosfatos a pH de 7 por 2.5 horas de reacción.
- 4.- Una vez hidrolizado, se cuantificó el contenido de glucosa total por el método de Glucosa Oxidasa BioSystem ref 11504.
- 5.- El valor de glucógeno fue obtenido por diferencia entre la glucosa libre y la total.
- 6.- Para la cuantificación en mg/ml de glucosa tanto libre como total, se utilizo una curva patrón de concentraciones conocidas de glucosa.

Apéndice J

Técnica de ELISA para la cuantificación de citocinas

- 1.- Se seleccionaron el número de muestras y el número de tiras de pozos para el análisis y afianzaron bien al armazón.
- 2.- Se pipetearon 200 µl de cada estándar, control o muestra dentro de los pozos apropiados para el estudio de INF-γ, 100 µl de cada estándar, control o muestra para IL-10 y 50 µl de cada estándar, control o muestra para TNF-α. Para el estudio de IL-10 y TNF-α se utilizó un diluyente en cantidad de 100 y 50 µl respectivamente.
- 3.- Se pipetearon 50 µl del anticuerpo conjugado en todos los pozos, ya sea para IL-10, INF-γ o TNF-α según sea el estudio.
- 4.- Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador horizontal a 700 rpm.
- 5.- Se aspiró el líquido de cada pozo.

- 6.- Se lavaron los platos tres veces con:
 - a) 0.4 ml de la solución de lavado dentro de cada pozo.
 - b) Se aspiró el contenido de cada pozo.
- 7.- Se pipetearon 200µl de la solución del cromógeno en cada pozo permitiendo la reacción por 15min y después el lavado.
- 8.- Esta reacción se realizó incubando los platos por 15 min a temperatura ambiente sobre un agitador horizontal a 700 r.p.m, evitando la luz solar directa.
- 9.- Se pipetearon 50 µl de la solución de paro dentro de cada pozo (HCl 0.2N).
- 10.- Se leyó la absorbancia a 450 nm y 490 nm máximo para 3 horas y se calcularon los resultados.

Apéndice K

Técnica de MET

- 1.- Los fragmentos de hígado de animales tratados, no tratados e inoculados con *E. histolytica*, inmediatamente se introdujeron en glutaraldehído al 1% en PBS durante 30 minutos, se lavó suavemente con PBS.
- 2.- Se lavaron 3 veces con PBS tween para eliminar el fijador.
- 3.- Se deshidrataron en etanol seriados a diferentes concentraciones de 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100% por 15 minutos en cada uno.
- 4.- Se infiltraron 3 veces por 10 minutos cada una (mezcla de 2 partes de etanol 100% y 1 parte de resina LR-WHITE 100%).
- 5.- Se incluyeron con resina LR-White 100% durante 2 hrs.
- 6.- Se colocó resina en moldes de inclusión con previa identificación y muestra; se dejó polimerizar por 1 hora a 95 °C en horno de microondas.
- 7.- Se realizaron cortes semifinos, identificando zona de interés y se realizaron cortes finos de 80 nanómetros de espesor en un ultramicrotomo LEICA ultracut, se colocaron sobre rejillas de 300 mesh de níquel, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, se observaron al MET (MET Carl Zeiss EM-910) (Arvid 1999; Hayat, 2002).