



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

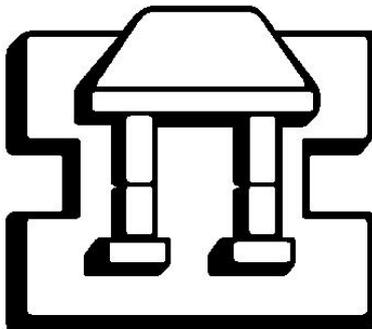
EFFECTO DEL SEXO Y DE LA DEFICIENCIA EN LA
RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN LA RESISTENCIA
NATURAL Y CONFERIDA POR LA INMUNIZACIÓN CON
Cry1Ac MÁS EXTRACTO AMIBIANO, A LA INFECCIÓN POR
Naegleria fowleri

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

MARÍA MARICELA CARRASCO YÉPEZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

LOS REYES IZTACALA

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C R É D I T O S

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Director de Tesis

Dra. Leticia Moreno Fierros

Sinodales

M. en C. Gloria L. Paniagua Contreras
M. en C. Martha O. Salcedo Álvarez
Dra. Miriam Rodríguez Sosa
M. en C. Marco A. Rodríguez Monroy

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	<i>Naegleria fowleri</i> y enfermedad producida	7
1.2	Modelo de infección en ratón	7
1.3	Inmunización y protección	8
1.3.1	Papel de los anticuerpos en la protección contra <i>Naegleria fowleri</i>	9
1.4	Papel de la respuesta T_H1 y T_H2 en la susceptibilidad a la infección por <i>Naegleria fowleri</i>	11
1.4.1	Propiedades de las subpoblaciones de células T _H 1 y T _H 2	11
1.4.2	Vías de diferenciación de las subpoblaciones T _H 1 y T _H 2	13
1.4.3	Funciones efectoras de las subpoblaciones T _H 1 y T _H 2	13
1.5	Características estructurales de los factores de transcripción STATs	14
1.5.1	STAT4 y la IL-12	16
1.5.2	STAT6 y la IL-4	16
1.6	Respuesta innata	17
1.6.1	Factor Inhibidor de Migración de Macrófago MIF	18
1.7	Diferencias genéticas de ratones en la susceptibilidad a infecciones	19
1.8	Diferencias de sexos en la susceptibilidad a infecciones	20
2	JUSTIFICACIÓN	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo general	23
3.2	Objetivos particulares	23
4	MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1	Cultivo de <i>Naegleria fowleri</i> y mantenimiento de la virulencia amibiana	24
4.2	Establecimiento de la dosis letal	24
4.3	Reto con trofozoitos vivos de <i>Naegleria fowleri</i>	24
4.4	Obtención de Cry1Ac	25
4.5	Obtención del extracto amibiano	26
4.6	Inmunización con Cry1Ac más extracto de <i>Naegleria fowleri</i>	26
4.7	Obtención de muestras	26
4.7.1	Anticuerpos anti- <i>Naegleria fowleri</i> en suero	27

	4.7.2	Niveles de citocinas en suero	27
4.8		Análisis estadísticos	28
5		RESULTADOS	29
5.1		Diferencias en la susceptibilidad a <i>Naegleria fowleri</i> comparando ratones de diferente sexo y cepa (BALB/c y C57BL/6).....	29
5.2		Diferencias en la susceptibilidad a <i>Naegleria fowleri</i> comparando ratones BALB/c (STAT6+/+ y MIF+/+) con ratones BALB/c deficientes en STAT6 y MIF (STAT6-/- y MIF-/-)	30
5.3		Diferencias en la susceptibilidad a <i>Naegleria fowleri</i> comparando ratones C57BL/6 (STAT4+/+) con ratones C57BL/6 deficientes en STAT4 (STAT4-/-)	31
5.4		Protección y sobrevida de los ratones BALB/c (STAT6+/+ y STAT6-/-) inmunizados	32
	5.4.1	Respuesta de anticuerpos séricos (IgG, IgA e IgM) anti <i>Naegleria fowleri</i> en ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados.	33
	5.4.2	Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en muestras de suero de ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	34
	5.4.3	Respuesta de anticuerpos séricos anti- <i>Naegleria fowleri</i> comparando machos y hembras en STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	34
	5.4.4	Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en muestras de suero comparando machos y hembras en STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	36
	5.4.5	Diferencias en las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en STAT6+/+ y STAT6-/-	37
	5.4.6	Respuesta de citocinas séricas (IL-4, IFN-γ e IL-12) en ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	38
6		DISCUSIÓN	40
6.1		Influencia del sexo en la susceptibilidad a la infección causada por <i>Naegleria fowleri</i>	41
6.2		Diferencia en el nivel de anticuerpos anti-<i>Naegleria fowleri</i> entre machos y hembras (STAT6+/+ y STAT6-/-)inmunizados	43
6.3		Influencia de la cepa en la susceptibilidad a la infección causada por <i>Naegleria fowleri</i>	44
6.4		Susceptibilidad en ratones BALB/c (MIF-/-) y C57BL/6 (STAT4-/-)	46
6.5		Protección en ratones inmunizados BALB/c	46

7	CONCLUSIONES	49
8	PERSPECTIVAS	51
9	APÉNDICE	52
10	BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A	Características estructurales de los factores de transcripción STATs	15
Figura 1	Diferencia en la susceptibilidad a <i>N.fowleri</i> comparando sexos y cepas (BALB/c y C57BL6)	29
Figura 2	Diferencias en las susceptibilidad comparando ratones BALB/c (STAT6+/+ y MIF+/+) con ratones BALB/c (STAT6-/- y MIF-/-)	30
Figura 3	Diferencias en la susceptibilidad comparando ratones C57BL/6 (STAT4+/+) con ratones C57BL/6 (STAT4-/-)	31
Figura 4	Protección y sobrevivencia de los ratones BALB/c (STAT6+/+ y STAT6-/-) inmunizados	32
Figura 5	Respuesta de anticuerpos séricos (IgG, IgA e IgM) anti <i>Naegleria fowleri</i> en ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	33
Figura 6	Subclases de IgG en muestras de suero de ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	34
Figura 7	Respuesta de anticuerpos séricos anti- <i>Naegleria fowleri</i> comparando machos y hembras en STAT6+/+ inmunizados	35
Figura 8	Respuesta de anticuerpos séricos anti- <i>Naegleria fowleri</i> comparando machos y hembras en STAT6-/- inmunizados	35
Figura 9	Subclases de IgG en muestras de suero comparando machos y hembras en STAT6+/+ inmunizados	36
Figura 10	Subclases de IgG en muestras de suero comparando machos y hembras en STAT6-/- inmunizados	36
Figura 11	Diferencias en las subclases de IgG en STAT6+/+ y STAT6-/-	37
Figura 12	Respuesta de citocinas séricas (IL-4, IFN- γ e IL-12) en ratones STAT6+/+ y STAT6-/- inmunizados	39

RESUMEN

Se ha sugerido que varios componentes de la inmunidad innata participan en la protección contra la infección causada por *N. fowleri*, pero principalmente se ha propuesto que los anticuerpos como la IgG y la IgA parecen tener un papel importante en la protección contra *N. fowleri*. Éste trabajo se centró en analizar la influencia de la respuesta de anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*, utilizando ratones BALB/c (STAT6+/+) y ratones deficientes en respuesta humoral, ratones STAT6-/. Los ratones fueron inmunizados con extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac, con el fin de evaluar sobrevivencia, respuesta de anticuerpos y niveles de citocinas en suero (IL-4, IFN- γ e IL12) después del reto con las amibas. Los resultados mostraron que hubo protección (100 y 80%) en los ratones BALB/c (STAT6+/+) machos y hembras respectivamente; mientras que en los ratones STAT6-/- no la hubo. En ambos grupos BALB/c (STAT6+/+) y STAT6-/-, se presentó una respuesta significativa en los títulos de anticuerpos. En cuanto al nivel de citocinas, la IL-4 fue significativa para los BALB/c (STAT6+/+), mientras que la IL-12 y el IFN- fueron significativos en los ratones STAT6-/. Adicionalmente, se analizó la influencia del sexo, de la cepa (Balb/c y C57BL/6), así como la participación de los genes MIF y STAT4 en la sobrevivencia a la infección por *N. fowleri*. En esta parte se observó que tanto las hembras, así como los ratones C57BL/6 fueron los más resistentes al sobrevivir más tiempo a la infección por *N. fowleri*. Los ratones deficientes para los genes MIF (MIF-/-) y que fueron retados con la amiba, murieron más rápido que los BALB/c (MIF+/+). Todos estos encuentros sugieren que la vía por la que se están protegiendo los ratones BALB/c (STAT6+/+) es por una respuesta de tipo T_H2 y que además podrían estar participando factores de la inmunidad innata en la susceptibilidad durante las primeras etapas de la infección.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Naegleria fowleri* y enfermedad producida

Las amibas de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* son protozoos de vida libre, anfizóicos, oportunistas y ubicuos en la naturaleza. Estas amibas han sido aisladas de suelos, agua y en muestras de aire de todo el mundo. Las infecciones humanas debidas a estas amibas incluyen cerebro, piel, pulmones y ojos. Estas infecciones se han incrementado significativamente durante los últimos 10 años a nivel mundial (Schuster y Visvesvara, 2004).

La infección por *Naegleria fowleri* (Nf) es adquirida por exposición nasal a agua contaminada por la amiba en estanques, albercas y lagos artificiales. Principalmente durante los meses de verano cuando la temperatura del agua se eleva, o en cuerpos de agua construidos por el hombre y donde ésta se calienta con plantas de poder, lo que permite el crecimiento de este microorganismo. *N. fowleri* provoca una infección del sistema nervioso central (SNC) conocida como meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), que se caracteriza por ser aguda y fulminante y lleva a la muerte de 3 a 7 días después de la exposición a la amiba. Las víctimas en su mayoría son personas jóvenes y sanas con una reciente historia de actividades acuáticas. La ruta de entrada al huésped por parte de *N. fowleri* es a través del neuroepitelio olfatorio. Los cambios patológicos son una meningoencefalitis necrótica con hemorragia aguda y con un modesto exudado purulento, principalmente en la base del cerebro, el tallo y el cerebelo. Los trofozoítos pueden ser observados dentro de las lesiones del sistema nervioso central, localizadas principalmente alrededor de los vasos sanguíneos (Martínez y Visvesvara, 1997).

1.2. Modelo de infección en ratón

La ruta por la cual las amibas alcanzan el sistema nervioso central (SNC) en el modelo de la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) en ratón ha sido descrito como sigue: Los trofozoítos de *Naegleria fowleri*, los cuales son obtenidos por pases sucesivos en ratones, entran a la cavidad nasal e invaden el epitelio

olfatorio, penetran el plexus nervioso submucosal, cruzan la placa cribiforme y finalmente alcanzan el espacio subaracnoideo (Martínez *et al.*, 1973; John, 1993 y Jarolim *et al.*, 2000). En un trabajo reciente, se caracterizaron las etapas iniciales de la MAP por *Naegleria fowleri* en ratones, mediante la técnica de inmunohistoquímica. La secuencia de eventos de la MAP a partir de las primeras 8 horas post-inoculación intranasal fue la siguiente: (1) las amibas hacen contacto con la superficie de la capa de moco del epitelio olfatorio, (2) algunos trofozoítos se mueven a través de la capa de moco haciendo contacto con la parte apical de las células epiteliales, (3) algunos trofozoítos son eliminados por el recambio de la capa de moco mientras que otros permanecen junto a células inflamatorias. Después de las 24 h, las amibas ya invaden el epitelio, sin evidencia de algún tipo de daño en la mucosa nasal. Además, se observó que algunos trofozoítos invaden a través del epitelio respiratorio, sugiriendo una ruta de invasión adicional. La respuesta inflamatoria observada fue escasa hasta las 30 h post-inoculación. Después de las 96 h, se observó que la respuesta inflamatoria fue severa en el bulbo olfatorio y cerebro, mientras que el tejido presentó gran daño. Consecuentemente, la reacción inflamatoria pudo incrementar el daño del tejido, pero aparentemente sin destruir a las amibas las cuales se observaron proliferando en el bulbo olfatorio (Rojas-Hernández *et al.*, 2004b).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen pocos trabajos que describan como el sistema inmune puede participar protegiéndose contra la invasión de patógenos como *N. fowleri*. Por ejemplo, no se ha descrito si la respuesta inmune innata (moco, células epiteliales, células inflamatorias, complemento y citocinas) protegen de la invasión inicial por *N. fowleri*. Tampoco se ha descrito si las células de la inmunidad adaptativa (células T y B) de la lámina propia pueden eliminar al parásito, y mucho menos cuales pueden ser los mecanismos protectores que participan.

El modelo de la Meningoencefalitis Amibiana Primaria en ratón es una herramienta útil para tratar de analizar algunos mecanismos inmunes que estén ocurriendo cuando se produce la infección por *N. fowleri*. Por lo tanto, este trabajo se centró en analizar la influencia de la respuesta de anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*, utilizando ratones normales y ratones deficientes para el gen que codifica para STAT6 (STAT6^{-/-}), deficientes en respuesta T_H2, controles e inmunizados con extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac, con el fin de evaluar tanto la sobrevivencia de los ratones, la respuesta de anticuerpos y los niveles de algunas citocinas en suero después del reto con las amibas.

ANTECEDENTES

1.3. Inmunización y protección

Se han realizado varios trabajos en los que inmunizando ratones con *N. fowleri*, probando diferentes rutas y dosis para inducir protección contra la infección causada por esta amiba (Thong *et al.*, 1980; Ferrante y Rowan-Kelly, 1988 y Bush *et al.*, 1988) En general los porcentajes de protección obtenidos han sido muy variados (0 a 80%). Estas variaciones se pueden deber a la baja virulencia de las amibas utilizadas ya sea para inmunizar o para retar a los ratones, ya que en muchos estudios, este aspecto no es tomado en cuenta (John, 1993).

Debido a que recientemente se demostró que la proteína cristalina Cry1Ac, clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999; Moreno-Fierros *et al.*, 2000) y posee efectos adyuvantes tanto

a nivel sistémico como de mucosas, en un trabajo reciente, se analizó el papel de Cry1Ac ante el modelo de infección de la MAP, en este estudio se encontró que la proteína de Cry1Ac fue capaz de incrementar la inmunidad protectora contra la MAP hasta un 100% cuando los ratones fueron inmunizados por la ruta intranasal (i.n) con extracto de *Naegleria fowleri* más Cry1AC. Además se observó que cuando Cry1Ac es administrada sin extracto de amiba por la ruta i.n. es capaz de proteger a los ratones hasta un 60% que es el porcentaje que se obtuvo inmunizando con el extracto solo. (Rojas-Hernández *et al.*, 2004a).

1.3.1. Papel de los anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*

Se ha sugerido que la inmunidad protectora contra *Naegleria fowleri* podría estar mediada principalmente por la IgG sérica, ya que la protección contra *N. fowleri* está asociada con el incremento de anticuerpos IgG específicos (Ferrante y Rowan-Kelly, 1988). Rojas-Hernández y colaboradores (2004a), encontraron una mayor respuesta de anticuerpos IgG que IgA tanto en muestras de suero como en muestras de mucosas en ratones inmunizados. Sin embargo, los datos de éste trabajo, sugieren que la respuesta dada por anticuerpos del tipo IgG en suero no está del todo vinculada con la protección contra la infección causada por *N.*

fowleri, ya que el efecto protector más alto se presentó en los ratones que fueron inmunizados por la ruta i.n y la respuesta más alta de anticuerpos IgG sérico se presentó en los ratones que fueron inmunizados por la ruta intraperitoneal (i.p.) Probablemente, la respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas puede estar involucrada en la defensa del huésped contra la infección por *N. fowleri*, ya que cuando los ratones son inmunizados por la vía i.n. con Cry1Ac más extracto de *N. fowleri*, ambos isotipos tanto IgG como IgA a nivel de mucosa se incrementan rápidamente después de que los ratones son retados con las amibas. Aunque el incremento en la respuesta de IgA en mucosa fue breve comparado con la respuesta de IgG en mucosas, la cual persistió a un alto nivel hasta el día 60 en los ratones que sobrevivieron a la infección, no se excluye un papel importante de éste isotipo (IgA) en la defensa inicial contra este organismo, ya que en el tiempo en el que se establece la infección es muy breve (Jarolim *et al.*, 2000). Rojas-Hernández y colaboradores (2004b), observaron que la amiba invade el epitelio

nasal desde las 24 horas post infección y que numerosas amibas son encontradas en el bulbo olfatorio donde el daño del tejido es severo después de los 4 días. Paralelo a esto, ellos observaron que las respuestas más altas de IgA se produjo exclusivamente en los fluidos nasales de los ratones, los cuales fueron inmunizados por vía intranasal correlacionándose con un mayor nivel de protección.

Durante la infección causada por *N. fowleri* en ratones, Haggerty y John (1982), observaron un incremento de IgG sérica, seguido por IgM e IgA, donde éstos anticuerpos tuvieron la capacidad de aglutinar a las amibas, reducir su viabilidad, así como su virulencia. Sin embargo, cuando las tres clases de inmunoglobulinas fueron transferidas a ratones infectados con *N. fowleri*, sólo la IgG confirió protección (Ferrante y Rowan-Kelly, 1988).

El papel de los anticuerpos en la protección contra *N. fowleri* es controversial, se ha observado *in vitro* que cuando se ponen en contacto trofozoítos con anticuerpos IgA de secreción o IgG, los anticuerpos son capaces de redondear e inmovilizar a las amibas, pero conforme pasa el tiempo la amiba es capaz de

liberarse de los anticuerpos ya sea internalizándolos o desprendiéndolos con parte de su membrana celular (capping y shedding) (Ferrante y Thong, 1979; Shibayama *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha sugerido que la IgA puede participar en la protección del huésped impidiendo la adherencia de los trofozoítos a la mucosa nasal, ya que anticuerpos IgA que reconocen proteínas de la superficie de *N. fowleri* son capaces de inhibir la adhesión de los trofozoítos a colágena (Shibayama *et al.*, 2003).

La inducción de respuestas de IgA de secreción ha sido correlacionada con la protección contra diversos patógenos como: virus, bacterias, protozoarios y

helmintos (Lamm, 1997). Sin embargo, el papel protector de la IgG a nivel de mucosas no puede ser excluido, ya que en ratones deficientes para IgA se ha

logrado protección a nivel de mucosas con anticuerpos IgG e IgM (Mbawuike *et al.*, 1999). Por consiguiente los datos obtenidos por Rojas-Hernández y colaboradores (2004a) muestran que la respuesta de anticuerpos IgA e IgG fue incrementada significativamente en las muestras de secreciones de los ratones inmunizados con extracto Cry1Ac, sugiriendo que la inducción de ambos isotipos en la mucosa nasal puede estar relacionada con los altos niveles de protección contra la infección por *N. fowleri* en esos grupos experimentales.

1.4. Papel de la respuesta T_H1 y T_H2 en la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri*

La susceptibilidad y la resistencia hacia diversos agentes infecciosos está influenciada por el tipo de respuesta adaptativa, ya sea celular (T_H1) ó humoral (T_H2). En el caso de la meningoencefalitis amibiana primaria se desconoce el papel que estas puedan estar jugando en el curso de la infección. Por lo tanto, con el fin de determinar si la respuesta inmune humoral (T_H2) participa en la protección contra la MAP, en este trabajo se utilizaron ratones deficientes para los genes STAT6 (STAT6^{-/-}), los cuales fueron inmunizados y retados con las amibas para analizar el papel de la respuesta T_H2 en la protección contra *N. fowleri*.

Adicionalmente, se utilizaron ratones deficientes para los genes STAT4(STAT4^{-/-}), MIF (MIF^{-/-}) con el fin de evaluar la sobrevivencia después de ser infectados con la amiba.

1.4.1. Propiedades de las subpoblaciones de células T_{H1} y T_{H2}

Una de las observaciones clave para el control o favorecimiento de la invasión de algunos agentes infecciosos es la polarización de la respuesta inmune de los linfocitos TCD4⁺ hacia células T cooperadoras tipo 1 (T_{H1}) ó células T cooperadoras tipo 2 (T_{H2}), del inglés T helper. En el caso de la meningoencefalitis amibiana primaria se desconoce el papel que las células T_{H1} ó T_{H2} pudieran tener en el desarrollo de la infección por *Naegleria fowleri*.

El patrón de diferenciación entre estos dos tipos de subpoblaciones de células T, está determinado por los estímulos presentes de manera precoz durante las

respuestas inmunitarias (Abbas *et al.*, 1996). Los estímulos inductores de la diferenciación más importantes son las citocinas de las cuales, la IL-12 y la IL-4 son los principales inductores de las células T_{H1} y T_{H2} respectivamente (Abbas *et al.*, 1996; O'Garra, 1998 y Murphy *et al.*, 2000). Otros estímulos, aparte de las citocinas que también influyen en el patrón de diferenciación de las células T colaboradoras son, entre otros, la dosis y forma del antígeno expresado en las células presentadoras de antígeno (Constant y Bottomly, 1997), la ruta de entrada del antígeno, el tipo de adyuvante, y la constitución genética del huésped (Abbas *et al.*, 1996).

La clasificación de estos dos tipos de subpoblaciones de células (T_{H1} y T_{H2}), se realizó de acuerdo al patrón de citocinas producidas por éstas células (Mossman y Coffman., 1989). Los linfocitos T_{H1}, secretan interferón γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y se encargan de modular las respuestas contra microorganismos intracelulares incluyendo bacterias, parásitos y virus. Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos T_{H2} producen IL-4, IL-5, IL-

6, IL-9, IL-10 e IL-13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B, de los anticuerpos y del cambio de isotipo para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos), y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (O'Garra, 1998).

Las citocinas producidas por estas subpoblaciones de células T también participan en el desarrollo y expansión de las subpoblaciones respectivas. Es decir, el IFN- γ secretado por las células T_{H1} es capaz de inducir una mayor diferenciación de estas células e inhibe la proliferación de las células T_{H2}. Por lo contrario, la IL-4 producida por las células T_{H2} induce la diferenciación de las células T_{H2}, mientras que la IL-10, producida también por las células T_{H2}, inhibe la activación de las células T_{H1}. Por tanto, cada subpoblación se amplifica a sí misma y ejerce una regulación cruzada sobre la subpoblación recíproca (Rengarajan *et al.*, 2000).

1.4.2. Vías de diferenciación de las subpoblaciones T_{H1} y T_{H2}

La vía de diferenciación T_{H1} como ya se mencionó anteriormente, es la respuesta a microorganismos intracelulares que infectan o activan a macrófagos o aquellos que activan a las células asesinas naturales (NK-del inglés Natural Killer). Una característica común de todas estas infecciones es la producción de IL-12 durante la respuesta inmunitaria innata. Algunos microorganismos activan directamente a los macrófagos o a las células dendríticas para que secreten IL-12 (Trinchieri, 1995). La IL-12, se une a receptores presentes en las células TCD4+ estimuladas por el antígeno e induce la activación de las moléculas de STAT4, un factor de transcripción el cual es determinante para la diferenciación de las células T en células T_{H1}. El IFN- γ también es capaz de inducir el desarrollo de células T_{H1} al estimular la producción de IL-12 por los macrófagos y la expresión de receptores de IL-12 funcionales en los linfocitos T (O'Garra y Arai, 2000). La IL-12 proporciona una importante conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que es producida durante las reacciones de inmunidad innata precoz frente a microorganismos intracelulares y estimula respuestas inmunitarias

adaptativas que protegen al huésped frente a estos microorganismos.

La vía de diferenciación T_H2 se produce en respuesta a parásitos extracelulares y alérgenos, que causan una estimulación crónica de las células T, con una activación escasa de macrófagos. La diferenciación de las células $CD4+$ en células efectoras T_H2 depende de la IL-4, la cual actúa activando la molécula STAT6. Ésta vía, estimula la transcripción de los genes de la IL-4 y de otras citocinas de las células T_H2 (Abbas *et al.*, 1996).

1.4.3. Funciones efectoras de las subpoblaciones T_H1 y T_H2

La función principal de las células T_H1 es mediar la respuesta inflamatoria incrementando la defensa contra agentes infecciosos intracelulares y células cancerosas. El $IFN-\gamma$ producido por las células T_H1 estimula las actividades microbicidas de los fagocitos, induciendo así la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El $IFN-\gamma$ también estimula la producción de anticuerpos IgG opsonizantes y fijadores del complemento, los cuales inducen la

fagocitosis. La IL-2 secretada por las células T_H1 actúa como su propio factor de crecimiento y, junto con el $IFN-\gamma$, estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos (CTL $CD8+$), que destruyen a las células infectadas por virus, protozoos y bacterias intracelulares, erradicando así la infección; mientras que la función efectora principal de las células T_H2 está relacionada con las reacciones inmunitarias mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos. Estas reacciones son inducidas por las citocinas: IL-4, IL-5 e IL-13. Las células T_H2 son responsables de la defensa frente a las infecciones por parásitos extracelulares y artrópodos de las reacciones alérgicas. Los anticuerpos estimulados por las citocinas de las células T_H2 (principalmente IL-4, IL-13 e IL-10) antagonizan las acciones del $IFN-\gamma$ e inhiben la activación de los macrófagos. Por consiguiente, las células T_H2 pueden actuar como "células opresoras" controlando las respuestas inmunitarias, especialmente las respuestas inflamatorias mediadas por células $Th1$ (Abbas *et al.*, 1996).

Los patrones de respuestas de citocinas T_H1 y T_H2 se inhiben mutuamente y entre ellos son responsables del mantenimiento del equilibrio entre las respuestas inmunes humoral y celular. Una falta de equilibrio entre éstos dos tipos de respuestas, puede resultar en condiciones patológicas en el organismo. Por ejemplo, una alta polarización hacia una respuesta de tipo T_H1 puede causar enfermedades de tipo inflamatorias o autoinmunes tal es el caso de la hepatitis fulminante y la diabetes mellitas autoinmune. Por el contrario, una respuesta alta hacia T_H2 , puede conducir a enfermedades de tipo alérgico, tal es el caso de la dermatitis atópica y el asma bronquial (Wurster *et al.*, 2000).

1.5. Características estructurales de los factores de transcripción STATs

Los STATs (transductores de señales y activadores de la transcripción) son proteínas que se encuentran latentes en el citoplasma las cuales son utilizadas por los receptores de las citocinas. Cuando dos moléculas receptoras de citocinas se agrupan por la unión de una molécula de citocina, las JAK (Janus) cinasas asociadas a los receptores se activan por transfosforilación y fosforilan residuos de tirosina en las porciones citoplasmáticas de los receptores de citocinas.

Algunas de estas porciones fosfotirosina de los receptores son reconocidas por dominos con homología Src 2 (SH2, del inglés SRC homology-2) de las proteínas STAT monoméricas citosólicas que se unen a los receptores. Posteriormente, las proteínas STAT son fosforiladas por las cinasas JAK asociadas al receptor. El domino SH2 de una proteína STAT puede unirse a los residuos fosfotirosina de otra proteína STAT. Como resultado dos proteínas se unen entre sí y se disocian del receptor. Los dímeros STAT migran al núcleo, donde se unen a secuencias de ADN de las regiones promotoras de genes sensibles a las citocinas activando la transcripción génica. Después de cada ciclo, nuevas proteínas STAT pueden unirse al receptor de citocina, fosforilarse, dimerizarse y migrar de nuevo al núcleo para inducir la expresión del gene (Wurster *et al.*, 2000) (Fig. A).

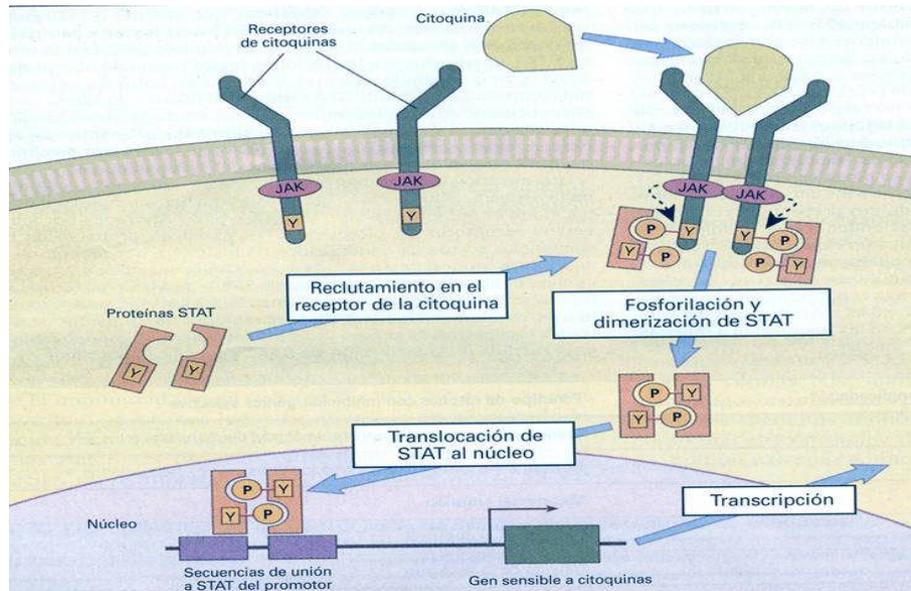


Fig. A Unión de una molécula de citocina a su receptor, se activa la cascada de fosforilación y dimerización de las proteínas STAT, éstas migran al núcleo para unirse a secuencias de genes sensibles a las citocinas activando la transcripción génica. (Tomada de Abbas *et al.*, 2002. Inmunología celular y molecular, 4º Ed.)

En particular, los dominios SH2 de diferentes proteínas STAT se unen selectivamente a los residuos fosfotirosina de diferentes receptores de citocinas, lo cual implica la activación de STAT específicas por diversos receptores de citocinas y, por tanto, de la especificidad de la señalización de las citocinas. Hasta ahora se han identificado siete proteínas STAT (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b y Stat6) en células de mamíferos (Leonard *et al.*, 1998).

Las proteínas de STAT6, son activadas por la interleucina IL-4, la cual juega un papel importante en la función y desarrollo de las células de tipo T_H2 ó respuesta humoral, por tanto en el presente trabajo se analizó su función ante la infección por *N. fowleri*.

1.5.1. STAT4 y la interleucina IL-12

La IL-12 induce la activación del factor de transcripción STAT4 a través del receptor IL-12 (IL-12R), el cual consta de dos cadenas (IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2). Por otro lado, se ha observado que en células humanas, la vía STAT4 también puede ser fosforilada en respuesta al IFN-γ (Cho *et al.*, 1996). Aunque STAT4 se expresa tanto en linfocitos T_H1 y T_H2, ésta solamente es fosforilada por la IL-12 de

los linfocitos T_{H1} (Szabo *et al.*, 1997).

Las células T cooperadoras estimuladas por el antígeno inducen la producción de IL-12 en los macrófagos y las células dendríticas principalmente. Por otro lado, el IFN- γ producido por las células NK o por las células T también estimula la producción de IL-12. Esta interleucina es esencial para el inicio de una secuencia de respuestas en las que intervienen macrófagos, células NK y linfocitos T y que dan lugar a la erradicación de microorganismos intracelulares. La IL-12 estimula la diferenciación de los linfocitos T colaboradores CD4⁺ en células T_{H1} productoras de IFN- γ . Ésta, aumenta la función citolítica de las células NK activadas y de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Por tanto, STAT4, juega un papel importante en el desarrollo y función de las células T_{H1}. Los linfocitos de ratones con inhibición génica de STAT4 presentan un defecto en la producción de IFN- γ y en el desarrollo de las células T_{H1} y, por tanto, de la inmunidad celular frente a microorganismos intracelulares. Sin embargo, la síntesis de IFN- γ no está totalmente anulada en estos ratones, probablemente debido a la acción de otras citocinas con funciones similares. Otra característica de los ratones deficientes en STAT4 es que presentan deterioro en cuanto a la función de las células NK (Wurster *et al.*, 2000).

1.5.2. STAT6 y la interleucina IL-4

La IL-4 es la única citocina capaz de activar a las proteínas de STAT6 las cuales son activadas a través del receptor de IL-4 (IL-4R). Este factor de transcripción, es responsable de muchas acciones como lo es la diferenciación de células TCD4⁺ a T_{H2} y el cambio de la cadena pesada de Ig de las células B al isotipo IgE. Una vez estimulado el cambio de células TCD4⁺ a células T_{H2} por la IL-4, ésta comienza a actuar como factor de crecimiento autocrino para las células T_{H2} diferenciadas. Por tanto, la IL-4 es responsable de la inducción y expansión de ésta subpoblación. Los ratones con inhibición génica selectiva de IL-4 o STAT6 muestran una deficiencia en el desarrollo y el mantenimiento de las células Th2, incluso tras estímulos (como las infecciones por helmintos) que habitualmente son potentes inductores de esta subpoblación. Por tanto, son incapaces de eliminar las

infecciones por estos parásitos (Kaplan *et al.*, 1998). Linfocitos B de ratones deficientes en STAT6 presentan inhibición en el cambio de Ig a isotipo IgE e IgG1 (Linehan *et al.*, 1998). Los ratones con este tipo de inhibición, muestran niveles anticuerpos, especialmente de IgE inferiores al 10% de los valores normales (Abbas *et al.*, 2000).

1.6. Respuesta Innata

Varios aspectos del sistema de inmunidad innata tales como el complemento (Holbrook, 1980; Reilly, 1983; Rowan-Kelly *et al.*, 1980 and Whiteman, 1989), células fagocíticas como los macrófagos (Cleary y Marciano-Cabral, 1986ab) o neutrófilos (Ferrante, 1991) y citocinas proinflamatorias (TNF α , IL1 β) (Ferrante *et al.*, 1989; Fisher-Stenger, 1992 y Michelson, 1990) parecen tener un papel importante en la resistencia a la infección causada por *N. fowleri*.

En el trabajo de Rojas Hernández *et al.*, (2004a); los altos porcentajes de protección obtenidos por la administración de Cry1Ac (60%), así como el hecho de que los ratones sobrevivientes a la infección por *N. fowleri* y que habían sido tratados con ésta proteína, no mostraron respuesta de anticuerpos significativa contra *N. fowleri*, se sugiere que el adyuvante podría estimular mecanismos de inmunidad innata. Acorde a esto, en otros estudios, se ha reportado que la administración de toxina de cólera (CT) por si sola, confiere un efecto adyuvante protector contra la influenza (Matsuo *et al.*, 2000) apoyando que es capaz de

estimular la respuesta inmune innata. Al parecer, tanto la inmunidad adquirida como la innata parecen tener un papel importante en la defensa contra la infección causada por *N. fowleri*.

En el trabajo de Rojas-Hernández *et al.*, (2004a) obtuvieron 100% de protección, y proponen que el posible mecanismo de protección dado en los ratones puede ser debido en gran parte a la respuesta humoral así como a la respuesta innata.

1.6.1. Factor Inhibidor de Migración de Macrófago MIF

El factor inhibidor de la migración de macrófago (MIF), es una proteína que se encuentra en células del sistema inmune tales como monocitos, macrófagos y linfocitos. Su función en la mayoría de estas células es desconocida. Sin embargo, estudios llevados a cabo en las últimas décadas muestran que esta proteína es un factor regulador de la respuesta inmune innata y adaptativa. MIF se expresa bajo una gran variedad de circunstancias, regula la secreción de citocinas y la expresión de receptores que están involucrados en la inmunidad innata, inhibe la función p53 y activa componentes de las vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y de proteína de unión 1 del dominio de activación Jun. Evidencias *in vivo* e *in vitro* han enfocado la atención sobre ésta proteína como una nueva forma de terapia para enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Algunas características estructurales de MIF como su actividad catalítica ofrece atractivas oportunidades para el diseño de inhibidores con fines terapéuticos (Lolis y Bucala, 2003).

Los macrófagos, son células efectoras de la respuesta inmune innata, la cual es vital en el reconocimiento y en la eliminación de patógenos. Los macrófagos se activan cuando un producto microbiano se une a sus receptores, entonces, comienzan a producir citocinas, las cuales coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa. MIF es un importante mediador de la inflamación el cual es incrementado rápidamente por los macrófagos después de la estimulación con los productos microbianos tales como endotoxinas (lipopolisacáridos) y bacterias gram-negativas. Macrófagos deficientes para el gene MIF (MIF^{-/-}) presentan una

disminución en la respuesta hacia lipopolisacáridos y bacterias gram-negativas, se muestra una notable reducción en la actividad de NF-kappa β y en la producción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α). En recientes investigaciones sobre los mecanismos por los cuales MIF regula la respuesta inmune innata a endotoxinas y bacterias gram-negativas indican que MIF modula la expresión de TLR4, la molécula transductora de señal del complejo receptor de lipopolisacáridos por tanto, esta baja actividad en los ratones deficientes para el gene MIF (MIF^{-/-}) se debe a una alteración del receptor TLR4 (Roger *et al.*, 2001).

1.7. Diferencias genéticas de ratones en la susceptibilidad a infecciones

La resistencia en mamíferos a infecciones ocasionadas por parásitos está controlada por condiciones genéticas a distintos niveles tal es el caso de diferencias entre especies, diferencias entre razas, clases, y linajes de una sola especie y entre individuos. Estos efectos genéticos han sido descritos en muchos estudios (parásito-hospedero) (Gray y Gill, 1993).

Específicamente entre diferencias de cepa en ratón, se ha observado que los ratones BALB/c, son más susceptibles que los C57BL/6 en varias enfermedades infecciosas incluyendo listeriosis (Cheers *et al.*, 1988), leishmaniasis (Heinzel *et al.*, 1998, Scharton y Scout., 1993), yersiniosis (Bohn *et al.*, 1994) e infecciones por micobacterias (Appelberg *et al.*, 1994).

En el caso de la infección causada por *N. fowleri*, se ha sugerido que los C57BL/6 son más resistentes a la infección, ya que de 5 cepas diferentes de ratón utilizadas, existió un rango de mortalidad desde el 10% para los ratones C57BL/6 a un 95% para los ratones A/HeCr (Haggerty y John, 1978). Por tanto, al existir un amplio rango de susceptibilidad entre las distintas cepas, se sugiere que los factores genéticos podrían estar involucrados en la resistencia a la infección por *N. fowleri*. De tal manera que en este trabajo se utilizaron dos cepas distintas de ratón, BALB/c y C57BL/6 para evaluar las diferencias en la mortalidad ante la infección con *Naegleria fowleri*.

1.8. Diferencias entre sexos en la susceptibilidad a infecciones

En numerosos estudios epidemiológicos y clínicos se han observado diferencias en la incidencia y severidad de enfermedades parasitarias entre machos y hembras. Aunque en algunos casos esto puede deberse a diferencias asociadas a género, existen evidencias de que hormonas asociadas al sexo podrían también modular la respuesta inmune, y consecuente con esto tener una influencia directa en el resultado de las infecciones parasitarias (Klein, 2000). Modelos de enfermedades en animales pueden recrear las diferencias dependientes al género

observadas en humanos, y el papel de las hormonas asociadas al sexo pueden ser confirmadas alterando experimentalmente los niveles de éstas (Roberts *et al.*, 2001). En el caso de la infección por *N. fowleri*, en el mismo trabajo llevado a cabo por Haggetry y John (1978), se demostró que al infectar ratones machos y hembras de diferentes edades, las hembras adultas resultaron ser más resistentes que los machos. Con esto ellos sugieren que la diferencia de hormonas entre ambos sexos, así como la madurez sexual, podrían estar asociadas en la resistencia contra la infección. Por tanto en este trabajo fueron utilizados machos y hembras de ratones BALB/c y C57BL/6 con el fin de determinar si existen diferencias en la mortalidad ante la infección por *Naegleria fowleri*.

2. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Analizar la influencia de la respuesta de anticuerpos en la resistencia natural y conferida por la inmunización intranasal (i.n) con Cry1Ac más extracto a la infección por *N. fowleri*.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar si la respuesta de anticuerpos participa en la protección conferida por la inmunización (i.n) de Cry1Ac más extracto de *N. fowleri*.

1.1. Analizar si existen diferencias en la susceptibilidad (sobrevida) entre ratones STAT6^{-/-} (deficientes en T_H2) y ratones normales STAT6^{+/+}, inmunizados con Cry1Ac más extracto.

1.2. Analizar los niveles de anticuerpos específicos anti *N. fowleri* (IgA, IgG, IgM, IgG1 e IgG2a) en los ratones STAT6^{-/-} y STAT6^{+/+} tanto controles como inmunizados, después del reto con *N. fowleri*.

1.3. Determinar si la inmunización con Cry1Ac más extracto de *N. fowleri* modifican los niveles séricos de citocinas (IL-4, IL-12 e IFN γ) en ratones STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} después del reto letal con *N. fowleri*.

2. Evaluar si existen diferencias en la susceptibilidad (sobrevida) a la infección por *N. fowleri* entre sexos, cepas y deficiencias para los genes STAT4 y MIF.

2.1. Ratones de diferente sexo (machos y hembras.)

2.2. Ratones de distinto haplotipo (C/57 y BALB/c).

2.3. Ratones deficientes para los genes STAT4 (que no producen IL-12); STAT6 (que no producen IL-4) y deficientes para el gen MIF.

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque existen pocos casos diagnosticados de MAP en humanos, incluso pensando que un gran número de individuos han estado expuestos a antígenos de esta ameba en condiciones ambientales similares, es importante analizar algunos factores tales como el sexo, cepa y deficiencias genéticas que pudieran estar involucrados en la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri*.

Se ha sugerido que varios componentes de la inmunidad innata tales como el complemento (Ferrante y Rowan-Kelly, 1980; Holbrook *et al.*, 1980; Rowan-Kelly *et al.*, 1980), células fagocíticas como los macrófagos o neutrófilos y citocinas proinflamatorias podrían estar participando en la protección contra la infección causada por *N. fowleri*. Pero principalmente se ha propuesto que los anticuerpos como la IgG (Ferrante, A. y Rowan-Kelly, B., 1988) y la IgA (Shibayama *et al.*, 2003 y Rojas-Hernández *et al.*, 2004a) parecen tener un papel importante en la protección contra *N. fowleri*, sin embargo, esto no ha sido del todo claro. Por lo tanto, este trabajo se centró en analizar la influencia de la respuesta de anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*, utilizando ratones normales y ratones deficientes para el gen que codifica para STAT6 (STAT6^{-/-}), deficientes en respuesta T_H2, controles e inmunizados con extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac, con el fin de evaluar tanto la sobrevivencia de los ratones, la respuesta de anticuerpos y los niveles de algunas citocinas en suero después del reto con las amebas.

Por otra parte, se ha demostrado que las hormonas asociadas al sexo podrían estar modulando la respuesta inmune al tener una influencia directa contra algunas infecciones tal es el caso de la MAP, en donde se ha observado que las hembras resultan ser más resistentes que los machos. En cuanto a diferencias de cepa; existe una notable influencia en la susceptibilidad a la infección, ya que se ha observado que los rangos de mortalidad para ratones de distintas cepas, van de un 10% para los ratones C57BL/6 a un 95% para los ratones A/HeCr (Haggetty y John, 1978). Por tanto, éste trabajo también analizamos la influencia del sexo y

de la cepa (BALB/c y C57BL/6) del ratón en la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri*.

Adicionalmente y con el fin de evaluar las deficiencias de respuesta celular (T_H2) y de factores de la inmunidad innata como MIF en la sobrevida ante la infección por *N. fowleri*, se utilizaron ratones deficientes para los genes STAT4 (STAT4^{-/-}) y MIF (MIF^{-/-}), los cuales fueron infectados con *Naegleria fowleri*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos de *N. fowleri* y mantenimiento de la virulencia amibiana

Se trabajó con la cepa de *Naegleria fowleri* ATCC30808 (American Type Culture Collection, Manassas, Va), la cual fue cultivada axénicamente en medio Bactocitona (difco, Le Pont de Claix, France) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO, Grand Island, N.Y.) a 37°C. La virulencia de la amiba se reactivó inoculando intranasalmente 10^5 trofozoítos de *N. fowleri* en ratones machos BALB/c, y después de 4 días, la amiba se recuperó de secciones de cerebro de ratones moribundos y fue cultivada axénicamente a 37°C por no más de un mes antes de otro pase por ratón. Las amibas se pasaron por ratón en al menos seis ocasiones, posteriormente fueron utilizadas para infectar a todos los ratones, y así se pudo evaluar la mortalidad y sobrevida. La virulencia de las amibas, se verificó analizando su letalidad.

4.2. Establecimiento de la dosis letal

Para determinar la cantidad mínima de amibas requeridas para matar al 100% de los ratones (Balb/c-machos); se inocularon grupos de 5 ratones por la ruta i.n. con distintas cantidades de amibas (2.5×10^4 , 5×10^4 , 7.5×10^4 y 10×10^5). Se escogió la dosis mínima letal (5×10^4) que fue capaz de matar al 100% de los ratones alrededor del día nueve después de la inoculación de los trofozoítos. La misma dosis letal que fue capaz de matar a los ratones Balb/c, se utilizó para todos los grupos.

4.3. Reto i.n. con trofozoítos vivos de *N. fowleri*

Con el fin de evaluar la sobrevivencia ante el reto con *N. fowleri*, se utilizaron ratones machos y hembras de 8 a 10 semanas de los siguientes ratones: BALB/c (proporcionados por el bioterio de la FES-I); C57BL/6, STAT6^{-/-}, STAT4^{-/-} y MIF^{-/-} (proporcionados por el Dr. Terrazas y la Dra. Rodríguez-Sosa del laboratorio de Inmunoparasitología de la UBIMED). Los ratones se dividieron como se muestra en la tabla 1. Para infectar a los ratones, éstos fueron ligeramente anestesiados

con éter etílico y cada uno fue retado por la ruta i.n. con 5×10^4 amibas vivas. Los ratones fueron examinados diariamente hasta su muerte. La muerte de los ratones provocada por *N. fowleri* fue confirmada por la presencia de las amibas en el cerebro de los ratones y por su recuperación en medio axénico. La mortalidad se estimó para cada grupo experimental.

Tabla 1. Distribución de los ratones infectados.

GRUPOS	MACHOS	HEMBRAS
Balb/c	15	15
C57BL/6	15	15
Balb/c: STAT6-/-	15	15
C57BL/6: STAT4-/-	15	15
Balb/c: MIF-/-	15	15

4.4. Obtención de Cry1Ac. Se trabajó con la cepa recombinante de *E. coli* JM103 (pOS9300). Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) conteniendo 50 mg/ml de ampicilina. La inducción de la proteína Cry1Ac se realizó agregando al medio de cultivo isopropyl- β -D-thiogalactopiranosido al 1mM (IPTG) (Ge et al, 1990). A las 48 h de cultivo las bacterias se cosecharon por centrifugación a $10,000 \times g$ por 10 min, después las pastillas celulares se resuspendieron en buffer TE (Tris-HCl 50 mM sodio etil-diamino tetraacetato (EDTA) 50 mM, pH 8) y se sonicaron (Ultrasonic Peosessor) tres veces por 5 min en hielo. Posteriormente los cuerpos de inclusión fueron colectados por centrifugación ($10,000 \times g$ por 10 min). El paquete celular se lavó dos veces con TE; dos veces con NaCl 0.5 conteniendo 1% de Triton X-100 y una vez con agua bidestilada fría. La protoxina Cry1Ac se solubilizó en buffer CBP (Na_2CO_3 0.1 M pH 9.6, 2-mercaptoetanol al 1%) 30 min a 37°C. El material particulado se descartó por centrifugación a $10,000 \times g$ por 10 min. Por último, la concentración de la proteína se cuantificó por la técnica de Bradford y la pureza de la proteína se determinó por electroforesis SDS-PAGE

4.4. Obtención del extracto amibiano

Las amibas cultivadas en medio Bactocasitona al 2%, fueron cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento, se lavaron por centrifugación 1500 x g por 10 min con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente a la pastilla celular se le agregó 1 ml de ácido P-hidroxi-mercuriobenzóico 5 mM como inhibidor de proteasas. Las amibas fueron rotas con un ciclo de sonicación de 10 s a 100 W de amplitud (Ultrasonic Peosessor). El extracto resultante fue almacenado a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Bradford y el patrón de proteínas fue examinado por electroforesis SDS-PAGE.

4.6. Inmunización con Cry1Ac más extracto de *N. fowleri*

Con el fin de determinar la participación de la respuesta humoral en la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri*, se utilizaron ratones BALB/c y STAT6-/- machos y hembras de 8 a 10 semanas. Los ratones se dividieron como se muestra en la tabla 2. Los ratones fueron inmunizados por ruta intranasal (i.n.), previamente se anestesiaron con eter etílico y se les administró 50 µg de Cry1Ac más 100 µg de extracto de *N. fowleri*. El esquema de inmunización fue de 4 dosis (1, 7, 14 y 21 días), siete días después de la última inmunización, los ratones fueron retados con trofozoítos de *N. fowleri* y la tasa de sobrevida fue estimada.

Tabla 2. Distribución de los ratones inmunizados e infectados.

GRUPOS	MACHOS	HEMBRAS
Balb/c inmunizados	15	15
control	15	15
STAT6-/- inmunizados	15	15
control	15	15

4.7. Obtención de muestras

Para la determinación de los niveles de anticuerpos y presencia de citocinas en los ratones infectados y previamente inmunizados (Balb/c y STAT6^{-/-}), se obtuvieron

muestras de suero; los ratones fueron sangrados por la cola en tres ocasiones, al día cero y a los días 1 y 9 después del reto. La sangre de los ratones se centrifugó a 5,000 x g por 10 min a 4°C para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso.

4.7.1. Anticuerpos anti-*N. fowleri* en suero

Títulos específicos de anticuerpos anti *N. fowleri* (IgG, IgA, IgM, IgG1 e IgG2a) fueron determinados por la técnica de ELISA. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de extracto de *N. fowleri* (10 µg proteína/ml) en buffer de carbonatos (0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4°C, después se lavaron con PBS-Tween (PBS-T), se bloquearon con leche descremada al 6% en PBS-T y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Diluciones seriadas de suero (comenzando 1:500 en PBS-T) fueron colocadas en las placas y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron anticuerpos peroxidados anti-IgG, 1:6000; anti-IgM, 1:3000 (Pierce, Rockford, IL) de cabra; anti-IgA, 1:1000 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) de ratón y anti-IgG1 e IgG2a (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) de ratón, los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C. Después, las placas se lavaron con PBS-T y se adicionó la solución reveladora (o-fenilendiamina 0.4 mg/ml, H₂O₂ 0.04% en buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5.2), después la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 2.5 M. Por último, la absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (Thermo Labsystems).

4.7.2. Niveles de citocinas en suero

Los niveles de citocinas en suero (IL-4, IL-12 e IFN γ) fueron evaluados por medio de la técnica de ELISA sándwich (por sus siglas en inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay), siguiendo el protocolo del fabricante (Peprotech's, San

Diego, Calif.). Placas Maxisorp de 96 pozos fueron recubiertas con 100 μ l del anticuerpo de captura a una concentración de 0.25-1 μ g/ml en PBS, y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas 4 veces con PBS-T y se bloquearon con 200 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-T e igualmente, se dejarán incubando toda la noche a 4°C . Posteriormente, las placas

fueron lavadas 4 veces con PBS-T y se agregaron las muestras de suero por duplicado a una dilución 1:2.5 en PBS-T + BSA al 1%, se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas fueron lavadas por 4 veces con PBS-T y se añadieron 100 μ l de anticuerpo biotinilado anti-citocina a una concentración de 0.25-1 μ g/ml; se dejaron incubar por 2 horas a temperatura ambiente y fueron lavadas 4 veces con PBS-T. Se añadieron 100 μ l de estreptoavidina peroxidada a una dilución 1:5000 en PBS-T + BSA al 1%. Se dejó incubando la placa por 60 min a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBS-T. Se añadieron 100 μ l de sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis-3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico), y se incubaron a temperatura ambiente (5-80 min). Finalmente, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Thermo-Labystems).

4.8. Análisis estadísticos

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los resultados de mortalidad de los diferentes grupos de ratones, así como las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los títulos de anticuerpos y niveles de citocinas, fueron determinadas por una prueba no paramétrica (Mann-Whitney U-Willcoxon).

5. RESULTADOS

5.1. Diferencia en la susceptibilidad a *N. fowleri* comparando ratones de diferente sexo y cepa (Balb/c y C57BL/6)

En la comparación de sexos, se observó que las hembras son menos susceptibles a la infección que los machos ($p < 0.05$) ya que sobrevivieron más tiempo, esto para las dos cepas que se utilizaron. En los ratones Balb/c, la mayoría de las hembras mueren entre los días 9 y 12, mientras que en los machos la mayoría muere entre los días 8 y 9. En el caso de los ratones C57BL/6, las hembras comenzaron a morir en el día 14 muriendo las últimas para el día 16, mientras que los machos empezaron a morir desde el día 9 y los últimos ratones mueren en el día 15, siendo los machos de ambas cepa significativamente más susceptibles que las hembras ($p < 0.05$) (Fig.1)

Al comparar las dos diferentes cepas, se observó que los ratones C57BL/6 de ambos sexos, fueron más resistentes a la infección que los ratones Balb/c ($p < 0.05$), ya que los ratones machos de la cepa Balb/c, mueren entre los días 6 y 9, mientras que los machos C57BL/6 mueren entre los días 9 y 15. Por otro lado, las hembras Balb/c mueren entre los días 7 y 11, mientras que la mayoría de las hembras C57BL/6 mueren en el día 14 y las últimas se terminan de morir al día 16. (Fig. 1)

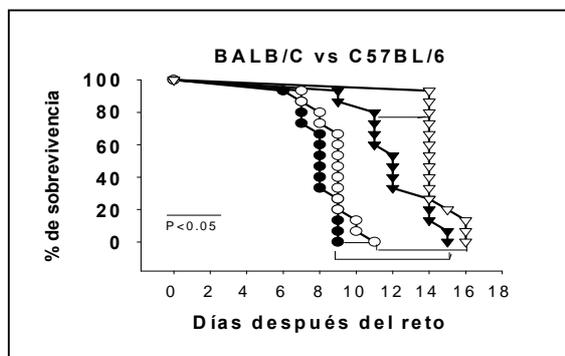


FIG. 1. Mortalidad de ratones infectados por la ruta intranasal con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri*. Se compara la diferencia en la susceptibilidad entre sexos (machos y hembras) y cepas (Balb/c y C57BL/6). Balb/c: hembras (○), machos (●); C57BL/6: hembras (Δ), machos (▲). (n= 15).

5.2. Diferencias en la susceptibilidad a *N. fowleri* comparando ratones Balb/c (STAT6^{+/+} y MIF^{+/+}) con ratones BALB/c deficientes en STAT6 y MIF (STAT6^{-/-} y MIF^{-/-})

Entre los ratones STAT6^{-/-} y BALB/c (STAT6^{+/+}), no se encontraron diferencias significativas (para ambos sexos) ($p > 0.05$) en el grado de susceptibilidad a la infección, ya que en los machos, la mayoría de los STAT6^{-/-} mueren entre los días 7 y 9, mientras que los BALB/c mueren entre los días 6 y 9 (Fig. 2). De la misma manera que con los machos, en las hembras STAT6^{-/-} no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a las hembras Balb/c, ya que en ambos casos, la mayoría mueren en el día 9 (Fig. 2).

Por el contrario a los STAT6^{-/-}, los ratones deficientes para MIF, si se encontró que los Balb/c (MIF^{+/+}) sobrevivieron más tiempo a la infección que los MIF^{-/-} (para ambos sexos) ($p < 0.05$), por tanto estos últimos resultaron ser más susceptibles a la infección, ya que en los machos, la mayoría de los ratones MIF^{-/-} mueren en el día 7, mientras que los Balb/c la mayoría muere entre los días 8 y 9 (Fig.2). En cuanto a las hembras MIF^{-/-}, la mayoría muere entre los días 7 y 8, mientras que las Balb/c, la mayoría lo hace en el día 9 y terminan de morir entre los días 10 y 11 (Fig.2).

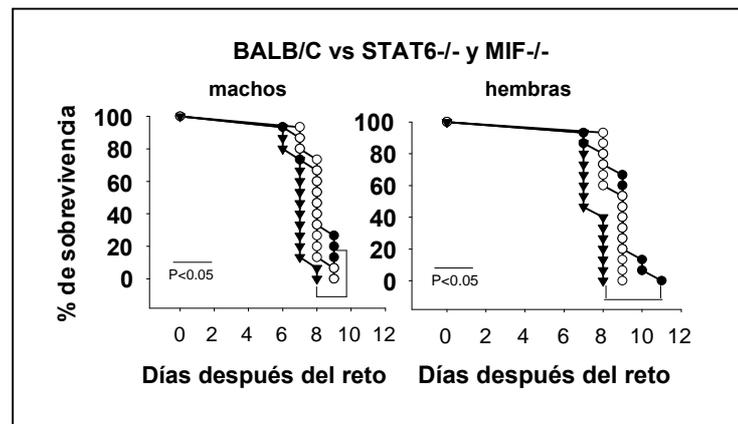


FIG. 2. Mortalidad de ratones infectados por la ruta intranasal con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri*. Se compara la diferencia en la susceptibilidad en ratones Balb/c contra ratones STAT6^{-/-} y MIF^{-/-}, machos y hembras. Balb/c (●), STAT6^{-/-} (○) y MIF^{-/-} (▼), (n= 15).

Al comparar la mortalidad entre machos y hembras en los ratones STAT6^{-/-} y en los ratones MIF^{-/-}, no se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos ($p > 0.05$).

5.3. Diferencias en la susceptibilidad a *N. fowleri* comparando ratones C57BL/6 (STAT4^{+/+}) con ratones C57BL/6 deficientes en STAT4 (STAT4^{-/-})

En esta parte del trabajo, se observó que las hembras STAT4^{-/-} fueron más susceptibles a la infección por *N. fowleri* ($p < 0.05$) con respecto a sus parentales STAT4^{+/+}, ya que las hembras STAT4^{-/-} comenzaron a morir desde el día 10 y la mayoría terminó de morir entre los días 13 y 14, mientras que en las hembras STAT4^{+/+}, la mayoría comenzaron a morir en el día 14 y terminaron de morir en el día 16. En el caso de los machos, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los STAT4^{+/+} y los STAT4^{-/-}, ya que en el caso de los primeros, la mayoría de los ratones muere en los días 11 y 12, mientras que para los segundos, la mayoría lo hace en el día 12 (Fig.3)

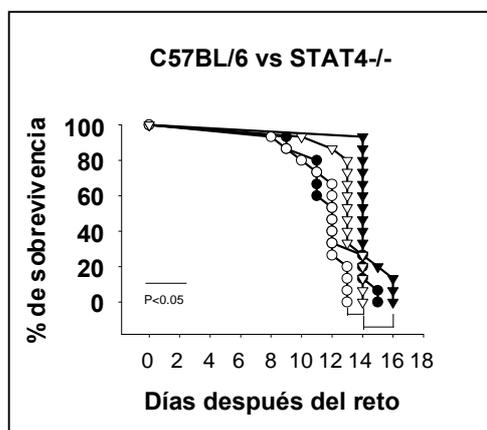


FIG. 3. Mortalidad de ratones infectados por ruta intranasal con 5×10^4 trofozoitos de *N. fowleri*. Se compara la diferencia en la susceptibilidad en ratones C57BL/6 contra ratones STAT4^{-/-}, machos y hembras. C57BL/6: machos (●), hembras (▼); STAT4^{-/-}: machos (○), hembras (▽), (n= 15).

Al comparar machos y hembras en los ratones STAT4^{-/-}, se encontró que las hembras son menos susceptibles a la infección que los machos ($p < 0.05$), ya que las hembras comenzaron a morir a partir del día 10 y terminaron de morir entre los días 13 y 14; mientras que los machos comenzaron a morir desde el día 8 y terminaron de morir la mayoría entre los días 12 y 13.

5.4. Protección y sobrevivida los ratones BALB/c (STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-}) inmunizados

El porcentaje de sobrevivida en los ratones STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados y que fueron retados con la dosis letal de amibas se observa en la Fig.4.

En general, todos los ratones no inmunizados tanto machos y hembras STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} murieron entre los días 6 y 11; mientras que para los ratones inmunizados STAT6^{+/+} machos y hembras, se obtuvo un 80% y 100% de protección respectivamente (Fig. 4a), el cual fue significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a los ratones inmunizados STAT6^{-/-}, los cuales, aunque incrementaron su sobrevivida, terminaron por morir entre los días 11 y 18 para los machos y entre el 13 y 22 para las hembras (Fig. 4b)

La sobrevivida de los ratones inmunizados fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a su grupo control no inmunizado, aunque en los STAT6^{-/-} inmunizados, solamente se retardó la mortalidad por unos pocos días, mientras que en los STAT6^{+/+} la inmunización indujo protección ante la infección con *N. fowleri*.

La diferencia en el porcentaje de mortalidad entre machos y hembras de los ratones STAT6^{+/+} inmunizados, no fue estadísticamente diferente. ($p > 0.05$).

De igual forma que los STAT6^{+/+}, la diferencia en la susceptibilidad a la infección entre sexos de los ratones STAT6^{-/-} inmunizados tampoco fue estadísticamente diferente. ($p > 0.05$) (Fig.4).

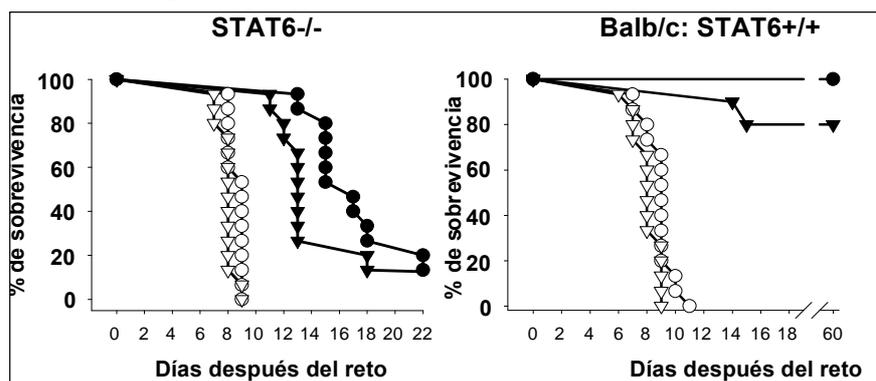


FIG.4..Sobrevivencia en ratones inmunizados con extracto más Cry1Ac y retados por la ruta i.n. con *N. fowleri*. Los ratones fueron inmunizados en cuatro ocasiones por la ruta i.n. con extracto más 50 μ g de Cry1Ac. Los ratones inmunizados y el grupo control fueron retados con 5×10^4 por la ruta i.n. siete días después de la última inmunización. Simbología; inmunizados: machos (▼), hembras (●); control: machos (Δ), hembras (○), (n= 15).

5.4.1. Respuesta de anticuerpos séricos (IgG, IgA e IgM) anti-*N. fowleri* en ratones STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados

En general, todos los ratones inmunizados STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} machos y hembras produjeron respuestas significativas de anticuerpos anti-*N. fowleri* de los isotipos IgG, IgA e IgM ($p < 0.05$) a los dos tiempos analizados después del reto con *N. fowleri*. La respuesta en los títulos de éstos isotipos para los ratones inmunizados STAT6^{+/+} machos y hembras, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a la producida en los ratones inmunizados STAT6^{-/-} machos y hembras. (Fig. 5).

En todos los ratones inmunizados (STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-}) los títulos de cada isotipo, se mantuvieron sin variación significativa en los dos diferentes tiempos ($p > 0.05$) después del reto con *N. fowleri*.

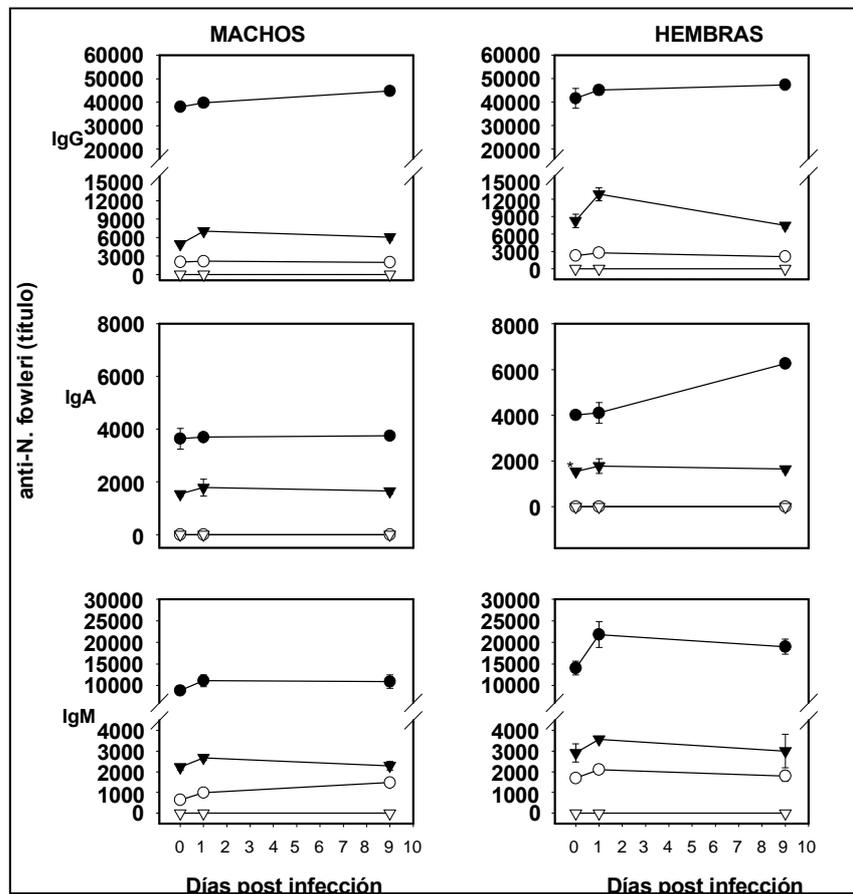


FIG. 5. Respuesta de anticuerpos anti-*N. fowleri* en sueros. Los ratones fueron inmunizados en cuatro ocasiones por ruta i.n. con extracto solo (100 µg) más 50 µg de Cry1Ac y retados con una dosis letal de *N. fowleri*. Los títulos de anticuerpos anti-*N. fowleri* (IgA, IgG e IgM) fueron determinados por ELISA. Las muestras fueron analizadas por triplicado. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A₄₉₂) de la media ± SD de cada grupo experimental (N = 5).

Simbología: STAT6^{+/+} inmunizados (●), control (○); STAT6^{-/-} inmunizados (▲), control (△).

5.4.2. Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en muestras de suero en ratones STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados

Los ratones inmunizados STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} machos y hembras produjeron respuestas significativas de IgG1 e IgG2a ($p < 0.05$) a los dos tiempos analizados después del reto con *N. fowleri*. En los ratones STAT6^{+/+} tanto en machos como en hembras, la respuesta de IgG1 fue significativamente mayor ($p < 0.05$) a la producida en los ratones inmunizados STAT6^{-/-}.

Ambos grupos de ratones, STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados tanto machos y hembras, mostraron títulos comparables de IgG2a en los tres diferentes tiempos ($p > 0.05$) (Fig. 6).

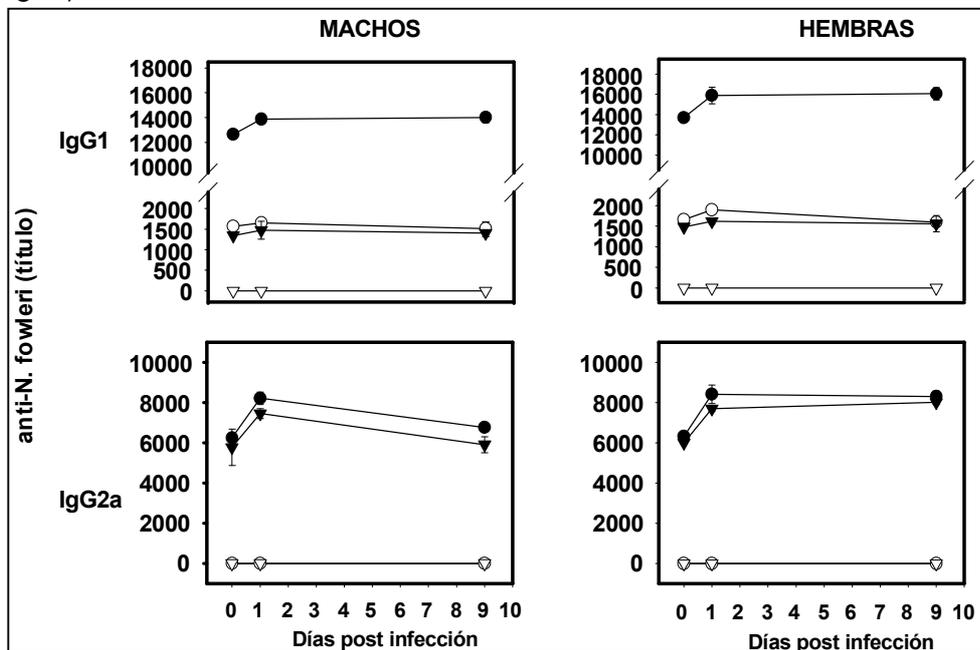


FIG. 6. Respuesta de anticuerpos IgG (subclases) anti-*N. fowleri* en suero. Los ratones fueron inmunizados en cuatro ocasiones por ruta i.n. con extracto (100 μ g) más 50 μ g de Cry1Ac. Los títulos de anticuerpos anti-*N. fowleri* (IgG1 e IgG2a) fueron determinados por ELISA. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A_{492}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N = 5). Simbología: STAT6^{+/+} inmunizados (●), control (○); STAT6^{-/-} inmunizados (▲), control (Δ).

5.4.3. Respuesta de anticuerpos séricos anti-*N. fowleri* comparando machos y hembras en STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados

Los resultados muestran en general que, para los ratones STAT6^{+/+}, los títulos de los tres diferentes isotipos (IgG, IgA e IgM) fueron significativamente mayores en las

hembras que en los machos ($p < 0.05$); a excepción de la IgA, donde en los dos primeros tiempos no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) (Fig.7)

Por otro lado, los resultados de los títulos de anticuerpos para los ratones STAT6^{-/-} machos y hembras se muestran en la Fig.8. Aquí, al igual que en los ratones STAT6^{+/+}, las hembras presentaron mayor respuesta en los títulos de IgG con respecto a los machos ($p < 0.05$), mientras que en los títulos de IgA, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en ninguno de los tiempos analizados. En los títulos de IgM, se encontraron diferencias significativas en el primer tiempo después de la infección ($p < 0.05$), mientras que para el día 9 no hubo diferencias ($p > 0.05$).

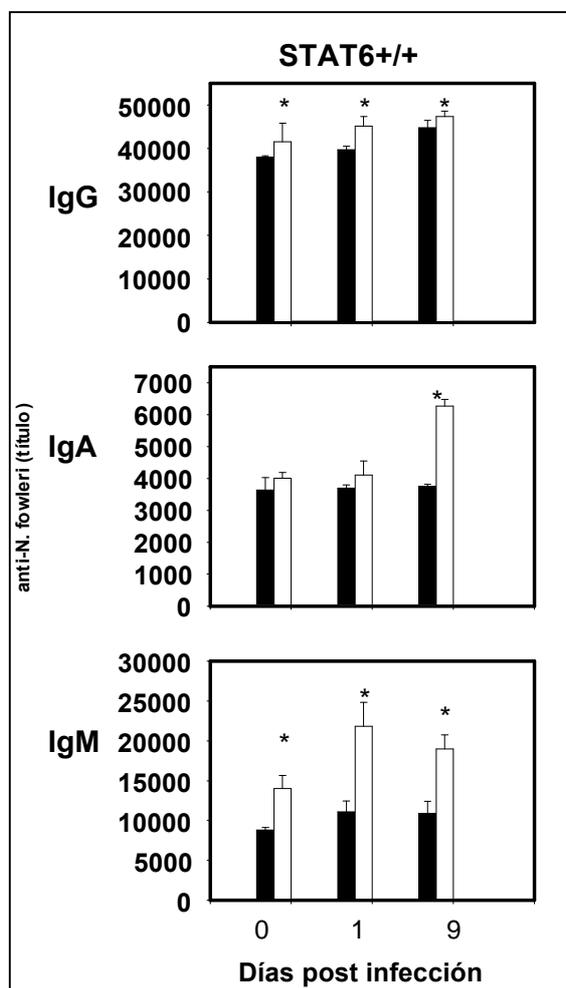


FIG. 7. Respuesta de anticuerpos anti-*N. fowleri* en sueros ratones STAT6^{+/+} inmunizados. Se comparan los niveles títulos de cada isotipo entre sexos; machos (barras negras) hembras (barras blancas). (*) Se muestran diferencias significativas con respecto a los machos.

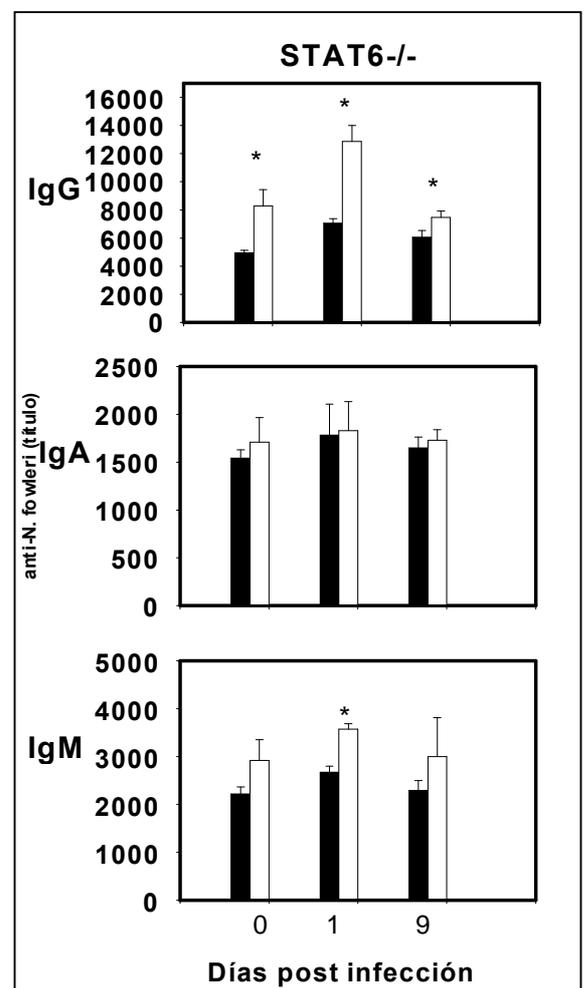


FIG. 8. Respuesta de anticuerpos anti-*N. fowleri* en sueros de ratones STAT6^{-/-} inmunizados. Se comparan los niveles de títulos de cada isotipo entre sexos; machos (barras negras) hembras (barras blancas) (*) Se muestran las diferencias significativas con respecto a los machos.

5.4.4. Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en muestras de suero comparando machos y hembras en STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados

En los ratones STAT6^{+/+}, la respuesta de los títulos correspondiente a la IgG1, fue mayor para las hembras que para los machos a los dos tiempos después de la infección ($p < 0.05$); mientras que en la IgG2a no hubo diferencias significativas en el primer tiempo post infección ($p > 0.05$), pero al día 9 la respuesta de las hembras fue significativamente mayor ($p < 0.05$) (Fig.9).

En los resultados de los STAT6^{-/-}, se observa que no hubo diferencias significativas en los títulos de IgG1 entre machos y hembras ($p > 0.05$) en los dos tiempos después de la infección, mientras que para la IgG2a, la respuesta de las hembras fue significativamente mayor sólo al día 9 post infección ($p < 0.05$) (Fig. 10).

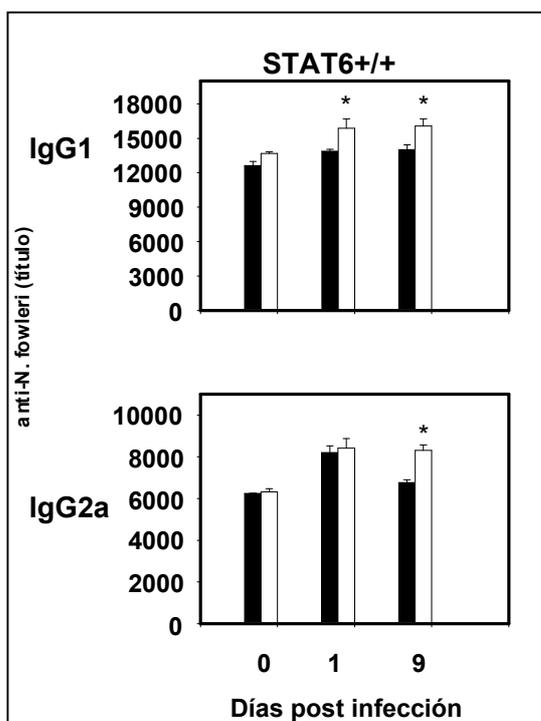


FIG.9. Respuesta de las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en sueros de ratones STAT6^{+/+} inmunizados.

Se comparan los niveles de títulos de cada subclase entre sexos; machos (barras negras) hembras (barras blancas) (*) Se muestran las diferencias significativas con respecto a los machos

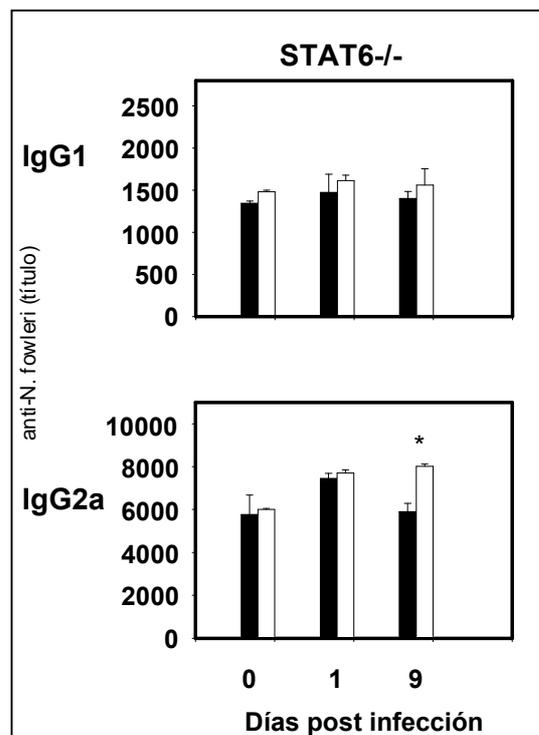


FIG. 10. Respuesta de las subclases de IgG (IgG e IgG2a) sueros de ratones STAT6^{-/-} inmunizados.

Se comparan los niveles de títulos de cada subclase entre sexos; machos (barras negras) hembras (barras blancas). (*) Se muestran las diferencias significativas con respecto a los machos

5.4.5. Diferencias en las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-}

Para los ratones STAT6^{+/+} inmunizados tanto en machos como en hembras, los títulos de IgG1 fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) con respecto a los títulos de IgG2a, esto para los tres tiempos. Por el contrario, para los ratones STAT6^{-/-} inmunizados de ambos sexos los títulos de IgG2a fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) con respecto a los títulos de IgG1. (Fig. 11).

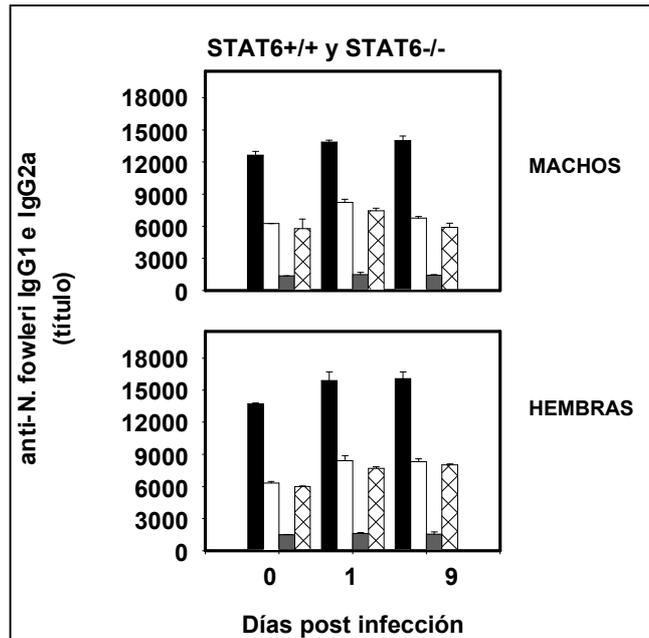


FIG. 11. Respuesta de las subclases de IgG en sueros de ratones para los tres tiempos. Se compara en los STAT6^{+/+} la IgG1 (barras negras) con la IgG2a (barras blancas). Se compara en los STAT6^{-/-} la IgG1 (barras grises) con la IgG2a (barras cuadradas) (+)

5.4.6. Respuesta de citocinas séricas (IL-4, IFN- γ e IL-12) en ratones STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} inmunizados

Los niveles de citocinas para cada grupo fue muy variado tanto en los ratones inmunizados STAT6^{+/+} como en los ratones STAT6^{-/-} de ambos sexos. Los ratones inmunizados STAT6^{+/+} machos y hembras, produjeron altos niveles de IL-4 después de haber sido infectados ($p < 0.05$), mientras que en los STAT6^{-/-} tanto machos como hembras, no hubo presencia de IL-4. Al comparar esta misma citocina entre machos y hembras de los STAT6^{+/+} inmunizados, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Fig. 12a).

En general, tanto los ratones inmunizados STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} machos y hembras produjeron niveles altos de IFN- γ ($p < 0.05$) después de haber sido infectados. Los niveles de esta citocina en los ratones STAT6^{-/-} para ambos sexos, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) a la producida en los ratones inmunizados STAT6^{+/+} (Fig. 12b)

En la comparación en los niveles de IFN- γ entre sexos, al igual que la IL-4, no se encontraron diferencias significativas después de la infección ($p > 0.05$)

Por último, los ratones inmunizados STAT6^{-/-} machos y hembras, produjeron niveles altos de IL-12 ($p < 0.05$) después de haber sido infectados. La respuesta de IL-12 de la misma forma que el IFN- γ , fue significativamente menor en los ratones STAT6^{+/+} de ambos sexos ($p < 0.05$) a la producida por los ratones STAT6^{-/-}.

En cuanto a los ratones machos y hembras STAT6^{+/+}, no se encontraron niveles significativos de esta citocina ($p > 0.05$) (Fig. 12c)

Los resultados en los niveles de IL-12 al igual que las citocinas anteriores, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras después de la infección ($p > 0.05$).

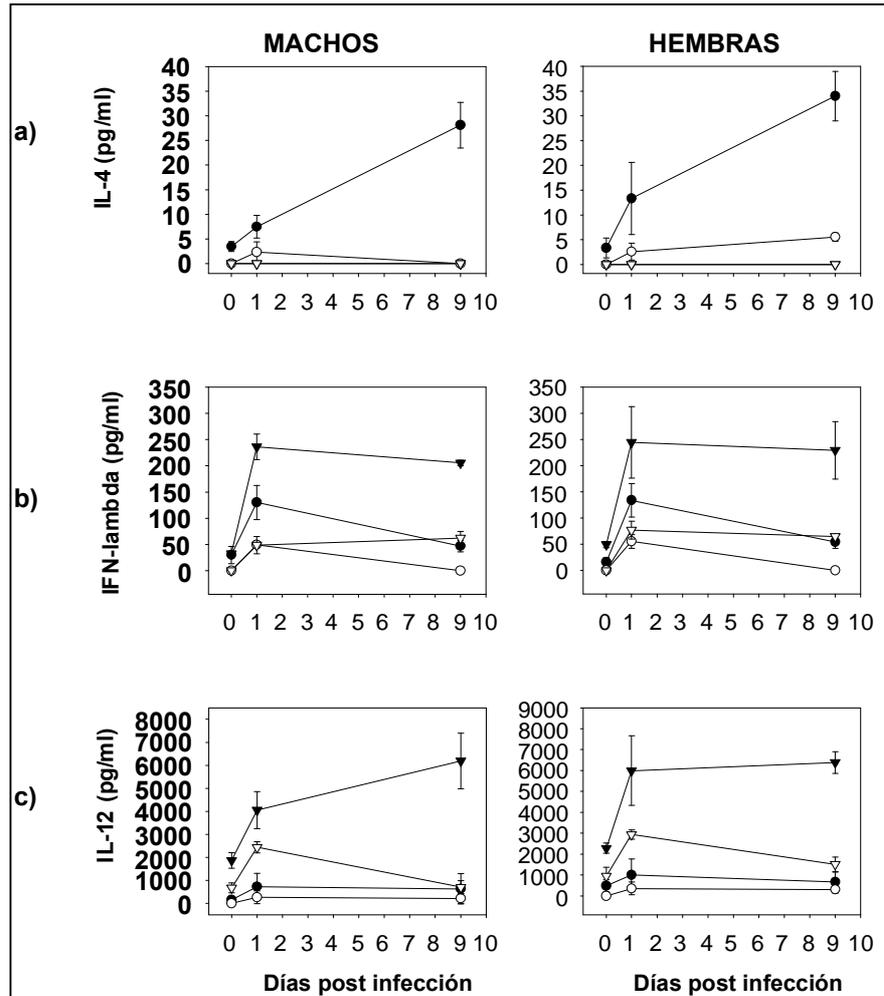


FIG. 12. Respuesta de los niveles de citocinas en suero. Los ratones fueron inmunizados en cuatro ocasiones por la ruta i.n. con extracto (100 μ g) más 50 μ g de Cry1Ac. Las muestras de suero fueron diluidas 1/2.5 en PBS-T. Los niveles de IL-4 (a), IFN- γ (b), y IL-12 (c) fueron determinados por la técnica de ELISA. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Los datos expresan los valores de absorbancia a 405 nm (A_{405}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N =3). Simbología: STAT6^{+/+} inmunizados (●) control (○); STAT6^{-/-} inmunizados (▼), control (▽).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se midió la sobrevivencia contra la infección por *N. fowleri* en ratones tomando en cuenta el sexo, diferentes cepas y en ratones deficientes en genes que participan en la respuesta inmune. Comenzando con la parte del sexo y cepas, se encontró que las hembras tanto de los ratones C57BL/6 como de los Balb/c tuvieron una mayor sobrevivencia que los machos cuando fueron infectados con *N. fowleri*, mientras que los ratones C67BL/6 tardaron más tiempo en morir que los Balb/c. En cuanto a los ratones deficientes para los genes MIF^{-/-} y STAT4^{-/-} tuvieron una menor sobrevivencia que los ratones normales (silvestres).

Por otro lado, se inmunizaron ratones Balb/c (STAT6^{+/+}) y STAT6^{-/-} con extracto amibiano más Cry1Ac y después de la última inmunización se retaron con la dosis letal de amibas. Lo que se encontró fue 100 y 80% de protección para los ratones Balb/c (STAT6^{+/+}) machos y hembras respectivamente, mientras que en los ratones STAT6^{-/-} todos los ratones murieron después del reto, no encontrándose protección en este último grupo. Por tanto uno de los hallazgos más importantes de este trabajo y que se discute al final, es que aunque todos los ratones STAT6^{-/-} inmunizados presentaron niveles significativos de IgG2a y presencia de IFN- γ e IL-12, después del reto, no fueron capaces de protegerse contra la infección por *N. fowleri*. De tal modo se sugiere que la respuesta de tipo Th1 no juega un papel determinante en la protección contra la infección.

En los ratones inmunizados se midieron los títulos de anticuerpos y la presencia de citocinas. En cuanto a los títulos de anticuerpos (IgA, IgM, IgG e IgG1) fueron significativamente mayores en los ratones Balb/c STAT6^{+/+} que en los STAT6^{-/-}. Además, los títulos de la mayoría de los isotipos estuvieron más elevados en las hembras que en los machos. Con respecto a la producción de citocinas después de la infección, la IL-4 se produjo en los ratones STAT6^{+/+}, mientras que en los STAT6^{-/-} no se detectó esta citocina. Los niveles de IL-12 e IFN- γ fueron significativamente mayores en los ratones inmunizados STAT6^{-/-} que en los STAT6^{+/+}.

6.1. Influencia del sexo en la susceptibilidad a la infección causada por *N. fowleri*.

Existen varios estudios experimentales en donde se ha demostrado que los machos de la mayoría de los mamíferos, a menudo son más susceptibles que las hembras a una variedad de infecciones causadas por algunas bacterias, virus, hongos (Klein, 2000; Moore y Wilson, 2002) y algunas especies de helmintos, céstodos, protozoos y artrópodos (Travi *et al*; 2002). Particularmente cuando se trabaja con roedores, se ha demostrado la alta susceptibilidad de los machos sobre las hembras. Así mismo, en los humanos, se ha observado que las tasas de mortalidad debidas a agentes infecciosos, es más alta en los hombres que en las mujeres (Owens, 2002).

Los resultados de este trabajo muestran que las hembras de los ratones Balb/c y C57BL/6 son más resistentes que los machos a la infección causada por *N. fowleri*. Estos resultados coinciden con los de Haggetry y John (1978), donde demostraron que al infectar ratones machos y hembras Balb/c de diferentes edades con trofozoítos de *N. fowleri*, las hembras adultas resultaron ser más resistentes que los machos de la misma edad.

En otro estudio llevado a cabo por Willaeret (1984) sobre la meningoencefalitis amebiana primaria en humanos, se reportaron los casos de esta infección distribuidos en sexos, donde se encontraron 50 casos para hombres y 29 para mujeres, equivalentes al 64% y 36% respectivamente. Esta aparente selección de machos sobre las hembras ha sido atribuida a una actividad elevada de deportes acuáticos en hombres que en mujeres y por tanto, una mayor probabilidad de exposición a *N. fowleri* en los hombres que la posibilidad de que éstos hayan sido mas susceptibles. Sin embargo en el presente estudio donde se comparó la susceptibilidad a la infección por *N. fowleri* entre sexos de dos diferentes cepas (Balb/c y C57BL/6) sometidos a las mismas condiciones experimentales, se demuestra que los machos de las dos cepas resultaron ser más susceptibles que

las hembras al sobrevivir menos tiempo, sugiriendo que no del todo, la alta incidencia en hombres se deba a actividades deportivas elevadas.

La madurez sexual del hospedero parece influir en el curso de la infección por *N. fowleri*. Se ha observado que tanto machos como hembras, cuando llegan a edad adulta son inmunológicamente competentes ya que aumenta la resistencia a la infección por *N. fowleri* (John 1993). Aunque en el presente trabajo no se evaluó la diferencia a la susceptibilidad tomando en cuenta las edades, es un hecho que este factor junto con el sexo del ratón están involucrados en el curso de la infección ya que Haggerty y John (1978) utilizando ratones machos y hembras donde el inóculo de amiba se ajusto al peso del ratón, obtuvieron 100% de mortalidad para los ratones machos de 3 semanas de edad, mientras que para las hembras de la misma edad hubo un 60% de mortalidad, sin embargo la mortalidad fue reduciéndose a un 20% para los ratones hembras de 4 semanas de edad, sugiriendo así, que los niveles de hormonas específicas de hembras adultas, contribuyen a la mayor resistencia de éstas sobre los machos.

Otros de los posibles factores por los cuales las hembras sean más resistentes que los machos, se puede deber a los genes ligados a los cromosomas sexuales (Klein, 2000) y/o a la diferencia hormonal entre ambos sexos, factor que podría estar regulando la respuesta inmune (Styr y Sugarman, 1991)

Generalmente, las hormonas sexuales están involucradas en la patogénesis de muchas infecciones tanto intracelulares como extracelulares ya que éstas son capaces de modular las actividades de todas las células involucradas en la respuesta tanto celular como humoral (Klein et al., 2004). Muchos estudios indican que la resistencia de las hembras a muchas enfermedades infecciosas depende de los efectos protectivos de los estrógenos, mientras que las susceptibilidad en los machos resulta de los niveles elevados de andrógenos (testosterona). (Huber y Pfaefle, 1994). Por lo tanto, las hormonas sexuales son una variable crucial en la regulación de la respuesta inmune la cual debe de tener alta importancia en los

tratamientos de algunas enfermedades infecciosas como es el caso de la meningoencefalitis.

6.2. Diferencia en el nivel de anticuerpos *anti-N. fowleri* entre machos y hembras (STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-}) inmunizados

En general, las hembras de los STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} presentaron mayores niveles de títulos de anticuerpos principalmente en los isotipos IgG e IgM, así como de la subclase IgG1 con respecto a los machos. Éstos resultados coinciden con los experimentos de numerosos investigadores donde muestran que hay un mayor incremento en los títulos de anticuerpos en ratones hembras que en machos ante una gran variedad de parásitos infecciosos (Eidinger y Garrett, 1982) Nuestros resultados sugieren que los altos títulos de anticuerpos se correlacionan con la mayor protección. Ya que en los ratones Balb/c inmunizados la respuesta de anticuerpos y el porcentaje de protección de las hembras fue mayor a la de los machos (100% contra 80%, respectivamente), aunque no existieron diferencias significativas entre ambos sexos; así como en la observación de que la sobrevivencia de los ratones no inmunizados infectados fue también mayor en las hembras que en los machos. Sin embargo otra posibilidad para explicar la diferencia en susceptibilidad ante la infección causada por *N. fowleri* entre machos y hembras podría ser que las hembras cuenten con otros mecanismos inmunes innatos y adaptativos más eficaces que los machos. Por ejemplo, existe la posibilidad de que los anticuerpos de las hembras presenten un mejor papel protector ante esta ameba que en los machos. De tal manera que en condiciones naturales podría estar ocurriendo lo mismo debido a la mayor incidencia de casos de meningoencefalitis en hombres que en mujeres (John, 1993).

La capacidad de las hembras de varias especies de mamíferos incluyendo el hombre, de ser más resistentes que los machos a una variedad de enfermedades infecciosas ha sido documentada en muchas investigaciones donde se ha visto que las hembras montan una mejor respuesta humoral que los machos (Styr y Sugarman, 1991). Algunos estudios de otros parásitos infecciosos en roedores,

donde inmunizan con el extracto del patógeno, han mostrado que la respuesta de tipo T_H2 presentada más favorablemente en las hembras que en los machos se debe en gran parte al efecto de los estrógenos sobre la producción de citocinas y anticuerpos (Daniels y Beloseive, 1994; y Huber *et al.*, 1999). En contraste a los estrógenos, se ha observado que, ante los mismos modelos infecciosos, los andrógenos inhiben una diferenciación de tipo T_H2 reflejándose en una menor respuesta de anticuerpos con respecto a las hembras (Klein *et al.*, 2001). Por consiguiente, los resultados de este trabajo coinciden con lo anterior, ya que en general las hembras de los ratones tanto STAT6^{+/+} y STAT6^{-/-} que fueron inmunizadas tuvieron títulos significativamente mayores de anticuerpos (IgG e IgM) con respecto a los machos.

Por otro lado, Huber y Pfaeffle (1994), han reportado que el estado fisiológico del individuo al momento de la infección puede afectar la diferenciación entre T_H1 y T_H2. En este caso, ellos observaron que las hormonas asociadas al sexo son tanto directa e indirectamente responsables en la activación de T_H1 o T_H2. En otro estudio, Araneo *et al.*, (1991) demostraron que la exposición de células T a hormonas masculinas (dihidrotestosterona) *in vitro*, causó una notable reducción en la producción de IL-4 e IFN- γ sin alterar el incremento de la IL-12, sugiriendo que tal alteración, se vio reflejada en la disminución de los anticuerpos. Los datos Del presente estudio sugieren de nuevo la hipótesis de que algunas hormonas asociadas al sexo pudieran tener un efecto directo sobre los tipos de citocinas producidas.

6.3. Influencia de la cepa en la susceptibilidad a la infección causada por *N. fowleri*

Se retaron ratones Balb/c y C57BL/6 con la dosis letal de *N. fowleri* y se encontró que aunque murieron todos los ratones de ambas cepas, los ratones C57BL/6 tardaron más tiempo en morir que los Balb/c, esta diferencia fue significativa tanto en machos como en hembras. Estos datos concuerdan con otros trabajos donde se ha descrito que los ratones Balb/c, resultan ser más susceptibles que los C57BL/6 en varias enfermedades infecciosas incluyendo listeriosis (Cheers *et al.*,

1988), leishmaniasis (Heinzel *et al.*, 1998, Schariton and Scout; 1993), yersiniosis (Bohn *et al.*, 1994) e infecciones por micobacterias (Appelberg *et al.*; 1994). En el caso de la infección por *N. fowleri*, Haggetry y John (1978), trabajando con cepas diferentes de ratones observaron que hubo un rango muy variado en la mortalidad de los ratones, desde un 10% en los C57BL/6, 45% para los Balb/c, hasta un 95% en los A/HeCr. Es posible que las diferencias en la susceptibilidad entre Balb/c y C57/BL6 puedan deberse a la composición genética y por tanto en los factores transcripcionales y de producción inmediata de citocinas después de la infección.

En un estudio realizado por Thong, *et al.*, (1983), mostraron en ratones inmunizados y retados con *N. fowleri*, una rápida acumulación de neutrófilos en el neuroepitelio de los ratones inmunizados, sugiriendo que los neutrófilos estarían participando en la protección contra *N. fowleri*. Rojas-Hernández *et al.*, (2004b), encontraron en ratones Balb/c infectados con trofozoítos de *N. fowleri* a las 8 h la presencia de neutrófilos en el lumen del epitelio olfatorio haciendo contacto con las amibas; a las 24 y 36 h, se observaron a los neutrófilos rodeando a las amibas en el cerebro, pero no se observó que provocaran daño a estas, más bien el daño se observó sobre el tejido nervioso, quizá provocado por el proceso inflamatorio. Del Río *et al.*, (2005) demostraron que ratones C57BL/6 son capaces de eliminar la infección por *chlamydothylae* y establecieron que el mecanismo de protección es parte de la inmunidad innata, principalmente de polimorfonucleares. Por otra parte se ha demostrado que el epitelio respiratorio es capaz de secretar IL-1 β y TNF- α y se ha observado que el TNF- α es capaz de reclutar polimorfonucleares al los sitios de inflamación. Como menciona Rojas *et al.*, (2004b), en los ratones Balb/c se observa que los polimorfonucleares tratan de eliminar a las amibas, pero al final no son suficientes para eliminarlas a todas, por lo que muchas amibas llegan al cerebro y provocan la muerte del ratón. Por lo tanto en los ratones C57BL/6, parte de la inmunidad innata, principalmente los polimorfonucleares podrían estar retardando la muerte de los ratones al estar tratando de eliminar a las amibas.

Otro aspecto que podría estar involucrado en que los ratones infectados BALB/c mueran antes que los C57BL/6 es que se ha demostrado que los macrófagos de los C57BL/6 producen mayor cantidad de IL-12 que los BALB/c, los cuales

presentan una deficiencia en la producción de esta citocina con respecto a los C57BL/6 (Alleva, 1998 y Nishikomori *et al.*, 2001), por tanto la presencia de la IL-12 en los ratones C57BL/6, podría estar involucrada en la defensa durante los primeros días de infección.

6.4. Susceptibilidad en ratones MIF^{-/-} y STAT4^{-/-}

Los resultados de éste trabajo apoyan que MIF participa en la respuesta inmune innata (Lolis y Bucala, 2003) y que además puede estar participando en la defensa inicial contra *N. fowleri*, ya que los ratones deficientes en MIF tanto machos como hembras murieron más rápido que los ratones BALB/c MIF^{+/+}.

Por otro lado, en cuanto a los ratones STAT4^{-/-} se muestra que la supervivencia, al menos en los machos no fue estadísticamente diferente con respecto a los C57BL/6 STAT4^{+/+}, sugiriendo que la deficiencia en la respuesta celular (T_H1) parece no estar afectando la susceptibilidad a ésta infección.

6.5. Protección en ratones inmunizados Balb/c

Rojas-Hernandez, *et al.*, 2004a, reportaron que la inmunización (i.n) de ratones con extractos de *N. fowleri* más Cry1Ac producían un 100% de protección en ratones Balb/c machos, sugiriendo que los anticuerpos podrían tener algún papel en la protección contra *N. fowleri*. En este trabajo se logró un 100% de protección en hembras y un 80% en machos Balb/c STAT6^{+/+}. Mientras que en los ratones Balb/c STAT6^{-/-} inmunizados la protección fue de 0% tanto en machos como en hembras. Lo que apoya que la respuesta de anticuerpos, incluyendo a las subclases de IgG (IgG1) es necesaria en la protección contra *N. fowleri* en los ratones inmunizados. Uno de los factores que favorece la maduración y el cambio de isotipo de los linfocitos B es la IL-4. Como era de esperarse, cuando se midieron los niveles de esta citocina no se encontró su producción en los ratones BALB/c STAT6^{-/-} inmunizados; mientras que en los BALB/c STAT6^{+/+} la producción de esta citocina fue significativamente mayor tanto en machos como en hembras, lo que confirma la importancia del factor STAT6 en la polarización de la respuesta T_H2. En cuanto a la producción de las citocinas IL-12 e IFN γ que polarizan hacia una respuesta T_H1, se encontró una producción significativamente

mayor de estas dos citocinas en los ratones inmunizados Balb/c STAT6^{-/-} tanto machos como hembras en comparación con los ratones Balb/c; lo que claramente indica que los ratones BALB/c STAT6^{-/-} montan una buena respuesta T_H1, sin embargo no fue capaz de controlar la infección por *N. fowleri*.

Estos resultados refuerzan y complementan lo propuesto por Rojas-Hernandez, *et al.*, 2004a de que la respuesta humoral o T_H2 estaría participando en la protección contra *N. fowleri*. Pues como se observó en los ratones inmunizados STAT6^{-/-} aunque montan una eficiente respuesta T_H1, no los protege contra *N. fowleri*. Por lo tanto, la falta del factor de transcripción STAT6, es un elemento crítico en la supresión de la respuesta T_H2 la cual podría ser requerida para controlar la infección ante *N. fowleri*.

Existen evidencias que sugieren que la inmunidad protectora contra *N. fowleri* puede ser mediada principalmente por IgG sistémica, puesto que se ha observado que la protección contra esta amiba se asocia con un aumento en los títulos de anticuerpos de IgG específicos y además cuando se transfiere suero de ratones inmunizados a ratones infectados se ha observado que sólo la IgG es capaz de inducir protección en un rango de 23-58% (Ferrante y Rowan-Kelly, 1988). Sin embargo, en el trabajo de Rojas Hernández *et al.*, (2004a) encontraron que en los ratones inmunizados con extracto más Cry1Ac se indujeron respuestas significativas de IgG en suero, además encontraron niveles altos de IgA específica pero en lavados nasales sugiriendo que la IgA secretora también podría estar participando en la protección del huésped al impedir la adherencia de los trofozoitos a la mucosa nasal, ya que se ha visto que anticuerpos de IgA que reconocen proteínas de la superficie de *N. fowleri* son capaces de inhibir la adhesión de los trofozoitos a la colágena (Shibayama *et al.*, 2003). Por lo tanto, en este trabajo, los títulos significativos de IgG e IgA, podrían estar correlacionados con la protección obtenida en los STAT6^{+/+} inmunizados de ambos sexos. Aunque en este trabajo no se analizó la respuesta de anticuerpos en lavados nasales; es posible que en los ratones STAT6^{-/-} ésta respuesta también esté disminuida como ocurrió en suero a contrario de los Balb/c.

En este trabajo también se midieron los niveles de IgG1 e IgG2a en los ratones inmunizados tanto BALB/c como STAT6^{-/-}. Los niveles de IgG1 fueron significativamente mayores en los ratones BALB/c, mientras que los niveles de IgG2a fueron significativamente mayores en los ratones BALB/c STAT6^{-/-}. Lo que indirectamente apoya lo descrito arriba; que los ratones BALB/c inmunizados montan preferentemente una respuesta T_H2 apoyado por la alta producción de IL-4, la baja producción de IL-12 e IFN- γ y una alta producción de IgG1; mientras que los ratones BALB/c STAT6^{-/-} montan claramente por falta de STAT6 una respuesta T_H1, que se caracterizó por una baja producción de IL-4, una alta producción de IL-12 e IFN- γ y bajos niveles de IgG1. En conjunto estos resultados apoyan firmemente el papel de los anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*.

En general, este estudio sugiere que el sexo, tipo de cepa y fondo genético del ratón presentan un papel crítico en determinar la susceptibilidad a la infección causada por *Naegleria fowleri*. Sin embargo, futuros estudios son determinantes para ir descartando la influencia de estos factores o bien aportar más evidencias sobre el papel importante que juegan éstos factores ante la infección por *N. fowleri*. En éste trabajo se sugiere que los anticuerpos son una parte esencial en la protección contra la MAP, sin embargo es importante estudiar el posible papel de la respuesta tanto celular como innata en ratones deficientes para los genes STAT4 o bien deficientes para algún factor de la inmunidad innata.

CONCLUSIONES

- Las hembras de las diferentes cepas (BALB/c y C57BL/6) fueron más resistentes que los machos al sobrevivir más tiempo ante la infección por *N. fowleri*.
- Los títulos de anticuerpos tanto en BALB/c como STAT6^{-/-} fueron mayores para las hembras que para los machos, lo cual puede estar asociado a la mayor supervivencia en las hembras.
- Los ratones C57BL/6 de ambos sexos son más resistentes que los BALB/c al sobrevivir más tiempo a la infección por *N. fowleri*.
- Los ratones deficientes para los genes MIF (MIF^{-/-}) son más susceptibles, ya que mueren más rápido que los BALB/c (MIF^{+/+}) ante la infección por *N. fowleri*, lo cual sugiere que factores de la inmunidad innata estén participando en la susceptibilidad durante las primeras etapas de la infección.
- En los ratones deficientes en STAT4, no hubo diferencia en la tasa de mortalidad.
- La inmunización de los ratones con el extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac, confiere protección en los ratones BALB/c de ambos sexos, mientras que en los ratones STAT6^{-/-} no existió protección..
- Para las subclases de IgG, hubo una mayor cantidad de IgG1 en los BALB/c, mientras que en los STAT6^{-/-}, los niveles altos fueron de IgG2a.
- En cuanto al nivel de citocinas, la IL-4 fue significativa para los BALB/c, mientras que la IL-12 y el IFN- γ fueron significativos en los ratones STAT6-

/-. Por tanto, se sugiere que la protección en los ratones BALB/c (STAT6+/+) esté mediada por una respuesta T_H2.

8. PERSPECTIVAS

Analizar de una forma más específica (epitelio olfatorio) tanto la presencia de citocinas T_H1, T_H2 y citocinas proinflamatorias así como de células inflamatorias en ratones de las diferentes cepas (C57BL/6 y BALB/c) inmunizados con extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac y retados. Adicionalmente, tratar de determinar el papel de los anticuerpos en la protección contra *N. fowleri*.

Por otro lado, inmunizar con extracto de *N. fowleri* más Cry1Ac a ratones deficientes para los genes STAT-4 y MIF, para tratar de determinar el papel de la respuesta inmune celular y de la respuesta inmune innata ante la infección por la amiba.

9. APÉNDICE

MEDIO DE CULTIVO

Bactocasitona al 2%

Bactocasitona 2 g
Agua destilada 100 mL

Se disuelve la Bactocasitona en agua destilada y se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min. Antes de utilizarse, se le agrega suero fetal bovino al 10%.

REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LA TÉCNICAS DE ELISA

Buffer de Carbonatos 0.1 M pH 9.6

Diluir 0.52g de Na_2CO_3 en 50 mL de agua destilada
Diluir 0.44 g de NaHCO_3 en 50 mL de agua destilada

Adicionar solución de Na_2CO_3 a la solución de NaHCO_3 hasta que el pH llegue a 9.6.

Buffer de fosfato-citrato 50 Mm pH 5.2 (para solución reveladora)

Ácido cítrico 0.1M	6.25 mL
Na_2HPO_4 0.2M	6.42 mL
H_2O	12.5 mL
H_2O_2 30%	10 μL
Ortofenilendiamina	10 mg

Se afora para un volumen final de 25 mL

Buffer de fosfatos (10X) pH 7.3

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4	11.46 g
KCl	2 g

Se afora para un volumen final de 1 L

Buffer de fosfatos (1X) + 0.05% de Tween

Se adicionan 100 mL de la solución buffer de fosfatos 10X a 900 mL de agua destilada y a ésta se le agrega 500 µl de Tween.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina Sérica Bovina
Cry1Ac:	Proteína cristalina con propiedades inmunogénicas aislada de <i>Bacillus thuringiensis</i>
CT:	Toxina del Cólera
ELISA:	Técnica de inmunoabsorbancia ligada a una enzima
i.n:	Intranasal
i.p:	Intraperitoneal
IFN- γ :	Citocina: Interferón de tipo γ
IgA:	Inmunoglobulina de tipo A, anticuerpo más abundante en secreciones
IgE:	Inmunoglobulina de tipo E, anticuerpo de respuesta humoral y de alergias
IgG:	Inmunoglobulina de tipo G, anticuerpo más abundante en suero
IgG1:	Inmunoglobulina de tipo G de la subclase 1, anticuerpo de respuesta humoral
IgG2a:	Inmunoglobulina de tipo G de la subclase 2a, anticuerpo de respuesta celular
IgM:	Inmunoglobulina de tipo M, anticuerpo principal de respuesta primaria
IL-4:	Interleucina de tipo 4, participa en la activación de los linfocitos B, en respuesta T_H2
IL-4R	Receptor de interleucina 4
IL-6:	Interleucina de tipo 6, participa en la diferenciación de células B
IL-10:	Interleucina de tipo 10, participa en la inhibición de síntesis de otras citocinas
IL-12:	Interleucina de tipo 12, participa en la inducción de células T_H1
IL-12R	Receptor de interleucina 12
MAP:	Meningoencefalitis Amebiana Primaria
MIF:	Citocina: Factor Inhibidor de migración de Macrófago
MIF-/-:	Deficiencia en MIF
N.f:	<i>Naegleria fowleri</i>
NK:	Células asesinas (Natural Killer)
PBS:	Solución Amortiguadora de Fosfatos
SNC:	Sistema Nervioso Central
STAT:	Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción
STAT4-/-:	Deficiencia en STAT de tipo 4 (respuesta T_H1)
STAT6-/-:	Deficiencia en STAT de tipo 6, (respuesta T_H2)
TCD4+:	Linfocitos T de tipo cooperadores
TCD8+	Linfocitos T de tipo citotóxicos
T_H1 :	Linfocitos T cooperadores (T helper) de tipo 1, respuesta celular
T_H2 :	Linfocitos T cooperadores (T helper) de tipo 2, respuesta humoral
TNF- α :	Citocina: Factor de Necrosis Tumoral-alpha, mediador en respuesta a infecciones

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Abbas, A.K., Murphy, K.M., y Sher, A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- [2] **Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J.** (2002). "Citocinas", *Inmunología celular y molecular*, 4ª edición. Mc Graw Hill-Interamericana, Esp. p.p. 243-278.
- [3] **Alleva, D.G., Kaser, S.V y Beller, D.** (1998). Intrinsic Defect in Macrophage IL-12 Production Associated with Immune Dysfunction in the MRL/++ and New Zeland Black/White F1 Lupus-Prone Mice and *Leishmania major*-Susceptible Balb/c Strain. *Journal of Immunology*. 161:6878-6884.
- [4] **Appelberg, R., Castro, A.G., Pedrosa, J., Silva, R.A., Orme, I.M., y Minóprio, P.** (1994). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell independent and dependent phases of *Mycobacterium* infection. *Infect. Immun.* 62:3962-3971.
- [5] **Araneo, B.A., Dowell, T., Dregel, M. y Daynes, R.A.** (1991). Dihidrotestosterona exerts a depressive influence on the production of inteleukin-4 (IL-4), IL5 and γ -interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood*. 78:688-699.
- [6] **Bohn, E., Heesemann, J., Ehlers, S., y Autenrieth, B.** (1994). Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 62:3027-3032.
- [7] **Bush, L.E., y John, D.T.** (1988). Intranasal immunization of mice against *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 35:172-176.

- [8] **Cheers, C., Haigh, A.M, Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E.R., y Young, A.M.** (1988). Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage, granulocyte. *Infect. Immun.* 56:247-251.
- [9] **Cho, S.S., Bacon, C.M., Sudarshan, C., Rees, R.C., Finbloom, D., Pine, R., y O'Shea, J.J.** (1996). Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation . *J. Immunol.* 157:4781-4789.
- [10] **Cleary, S.F., y Marciano-Cabral, F.** (1986a). Activated macrophages demonstrate direct cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and enhanced binding of *Naegleria fowleri* amoebae. *Cell immunol.* 98:125-136.
- [11] **Cleary, S.F., y Marciano-Cabral, F.** (1986b). Soluble amoebicidal factors mediate cytolysis of *Naegleria fowleri* by activated macrophages. *Cell immunol.* 101:62:71.
- [12] **Constant, S.L., y Bottomly, K.** (1997). Induction of the Th1 and Th2 CD4-T cell responses: alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15:297-322.
- [13] **Daniels y Beloseive, M.** (1994). Serum antibody responses by male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. *Clin Exp Immunol.* 97: 424-429.
- [14] **Del Río,L., Buen Día, A.J., Sánchez, J., Garces, B., Caro, M.R., Gallego, M.C., Bernabé, Cuello, F., y Salinas, J.** (2005). *Chlamydia abortus* (Chlamydia psittaci serotype 1) clearance is associated with the early recruitment of neutrophils and CD8(+)T cells in a mouse model. *123 (2-3):171-181.*

- [15] **Eidinger, D., y Garrett, T.J.** (1982). Studies of regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*. 136:1098-1116.
- [16] **Ferrante, A., y Thong, Y. H.** (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Inter. J. Parasitol.* 9:599.
- [17] **Ferrante, A, Hill, N. L., Goh, D. H., y Kumaratilake, L.** (1989). Altered neutrophils in mice immune to experimental *Naegleria* amoebic meningoencephalitis. *Immunol. Lett.* 22:301-305.
- [18] **Ferrante, A., y Rowan-Kelly, B.** (1988). The role of antibody in immunity against experimental *Naegleria* meningoencephalitis ('amoebic meningitis'). *Immunology* 64:241-244.
- [19] **Ferrante, A.** (1991). Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol.* 13:31-47.
- [20] **Fischer-Stenger, K., Cabral, G. A., y Marciano-Cabral, F.** (1992). Separation of soluble amoebicidal and tumorocidal activity of activated macrophages. *J. Protozool.* 39:235-241.
- [21] **Gray, G.D., y Gill, H.S.** (1993). Host genes, parasites and parasitic infections. *Int J. Parasitol.* 4:485-494.
- [22] **Haggerty, R.M., y John, D.T.** (1982). Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 29:117-122.

- [23] **Haggerty, R., M., y John, D.T.** (1978). Innate Resistance to Experimental Infection with *Naegleria fowleri*. *Infection and Immunity*. 20:73-77.
- [24] **Heinzel, F.P., Rerko, R.M., y Hujer, A.M.** (1998) Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. *Cell. Immunol.* 184:129-142.
- [25] **Holbrook, T. W., Boackle, R. J., Parker, B. W., y Vesely, J.** (1980). Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* **30**:58-61.
- [26] **Huber, S.A., y Pfaeffle, B.** (1994). Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female Balb/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol.* 68: 5126-5132.
- [27] **Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J., y John, D.T.** (2000). A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *J. Parasitol.* 86:50-55.
- [28] **John, D.T.** (1993). Parasitic protozoa. 2nd edition. Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.
- [29] **Kaplan, M.H., Wurster, A.L., y Grusby, M.** (1998). A signal transducer and activator of transcription (stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J.Exp. Med.* 188:1191-1196.
- [30] **Klein, S.L.** (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 24: 627-638.

- [31] **Klein, S.L., Cernetich, A., Hilmer, S., Hoffman, E.P., Scott, A.L., y Glass, G.E.** (2004). Differential Expression of Immunoregulatory Genes in Male and Female Norway Rats Following Infection with Seoul Virus. *J. Med. Virol.* 74:180-190.
- [32] **Lolis, E. y Bucala, R.** (2003). Macrophage migration inhibitory factor. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2:153-164.
- [33] **Lamm, M. E.** (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:311-340.
- [34] **Leonard, W.J. y O'Shea, J.J.** (1998). JAKS AND STATS: Biological Implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16:293-322.
- [35] **Martínez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C., y Moretta, F.L.** (1973). Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscopy study. *Lab. Invest.* 29:121-133.
- [36] **Martínez, A.J., y Visvesvara, G.S.** (1997). Amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7:583-598.
- [37] **Matsuo, K.T., Yoshikawa, H., Asanuma, T., Iwasaki, Y., Hagiwara, Z., Chen, S.E., Kadowaki, H., Tsujimoto, T., Kurata, y Tamura, S.I.** (2000). Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine* 18:2713-2722.
- [38] **Mbawuike, I.N., Pacheco, S., Acuna, C. L., Switzer, K. C., Zhang, Y., y Arriman, G. R.** (1999). Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model. *J. Immunol.* 162:2530-2537.

- [39] **Michelson, M.K., Henderson, W.R. Jr., Chi, E.Y., Fritsche, T.R., y Klebanoff, S.J.** (1990). Ultrastructural studies on the effect of tumor necrosis factor on the interaction of neutrophils and *Naegleria fowleri*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:225-233.
- [40] **Moore, S.L., y Wilson, K.** (2002). Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science.* 297:2015-2018.
- [41] **Moreno-Fierros, L., García, N., Gutierrez, R., Lopez-Revilla, R., y Vazquez-Padrón, R.I.** (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces serum, intestinal, vaginal and pulmonary responses in Balb/C mice. *Life Sciences.* 64:1079-1089.
- [42] **Mossman TR., y Coffman RL.** (1989). Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev. Immunol* 7: 145-151
- [43] **Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J.D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagil, H., Afkarian, M., y Murphy, T.L.** (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* 18:451-494.
- [44] **Nishikomori, R., Gurunathan, S., y Nishikomori, K.** (2001). Balb/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor $\beta 2$ gene exhibit a non-healing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling. *J. Immunol.* 166:6776-6783.
- [45] **O'Garra, A.** (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8:275-283.
- .
- [46] **O'Garra, A., y Arai, N.** (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 10:542-550.

- [47] **Owens, I.P.** (2002). Ecology and evolution. Sex differences in mortality rate. *Science*. 297:2008-2009.
- [48] **Reilly, M.F., White, K.L., y Bradley, S.G.**, (1983). Host Resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. and immun.* 42:645-652.
- [49] **Rengarajan, J. y Glimcher, L.H.** (2000). Cytokines and Autoimmune Diseases (Kuchroo, V.K. *et al.*, eds), Humana Press (in press).
- [50] **Roberts, C.W., Walker, W. y Alexander, J.** (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* 3:476-488.
- [51] **Roger, T., David, J., Glauser, M.P., y Calandra, T.** (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 6866:920-924.
- [52] **Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M.A., Lopez-Revilla, R., Resendiz-Albor, A.A., y Moreno-Fierros, L.** (2004a). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infec. Immun.* 72:4368-4375.
- [53] **Rojas-Hernandez, S., Jarillo-Luna, A., Rodriguez-Monroy, M.A., Moreno-Fierros, L., y Campos-Rodriguez, R.** (2004b). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol. Res.* 94:31-36.
- [54] **Rowan-Kelly, B., Ferrante, A., y Thong, H.** (1980). Activation of complement by *Naegleria*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:333-336.

- [55] **Schuster, F.L., y Visvesvara, G.S.** (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 34(9):1001-1027.
- [56] **Scharton y Scott.** (1993). Natural Killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4+ T cells subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Immunol.* 178:567-577.
- [57] **Shibayama, M., Serrano-Luna, J.J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R., y Tsutsumi, V.** (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can. J. Microbiol.* 49:164-170.
- [58] **Styrt, B., y Sugarman, B.** (1991). Estrogens and infection. *Rev. Infect. Dis.* 13:1139-1151.
- [59] **Szabo, S.,**(1997). Regulation of the interleukin (IL)-12 β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 185:817-824.
- [60] **Thong, Y.H., Ferrante, A., Rowan-Kelly, B., y O'Keefe, D.E.** (1980). Immunization with live amoeba, amoebic lysate and culture supernatant in experimental *Naegleria* meningoencephalitis. *Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74:570-576.
- [61] **Thong, Y.H., Ferrante, A., y Rowan-Kelly, B.** (1983). Site of expression of immunity to *Naegleria fowleri* in immunized mice. *Parasite. Immunol.* 5:67-76.
- [62] **Travi, B.L., Osorio, Y., Melby, P.C., Chandrasekar, B. Arteaga, L., y Saravia, N.G.** (2002). Gender is major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun.* 5:2288-2296.

- [63] **Trinchieri, G.** (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251-276.
- [64] **Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De la Riva, G.A., y Lopez-Revilla, R.** (1999). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Science.* 64:1897-1912.
- [65] **Willaeret, E. (1984).** Primary amebic meningo-encephalitis, a selected bibliography and tubular survey of cases. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 54:429-440.
- [66] **Whiteman, L.Y., y Marciano-Cabral, F.** (1989). Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infect. Immun.* 57:3869-3875.
- [67] **Wurster, A.L., Tanaka, T., y Grusby, M.J.**(2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene.* 19:2577-2584.