



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

Expresión de mRNA para citocinas involucradas en la síntesis de IgA y del plgR en la mucosa nasal de ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA
P R E S E N T A :

MARÍA MARICELA CARRASCO YÉPEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA EUGENIA CASTRO MUSSOT

DR. SAÚL ROJAS HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F. 2008

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Escuela Superior de Medicina y en el Laboratorio de Inmunología celular de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, ambos del Instituto Politécnico Nacional. Durante el proyecto se recibió beca CONACyT con número de registro 202464

Directores de de Tesis

Dra. María Eugenia Castro Mussot

Dr. Saúl Rojas Hernández

Comité tutorial

Dr. Óscar Rojas Espinosa

Dr. Rommel Chacón Salinas

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres

Dr. Rafael Campos Rodríguez

CONTENIDO GENERAL

ÌNDICE	I
ÌNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
El sistema inmunitario común de mucosa	1
Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT)	1
Pasajes nasales (PN)	2
Citocinas en el NALT y PN	3
IgA en la mucosa nasal	4
<i>Naegleria fowleri</i> y meningoencefalitis amibiana primaria	5
Modelo de infección en ratón	5
Modelo de protección	6
Mecanismos de protección	6
JUSTIFICACIÓN	9
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10
Objetivo general	10
Objetivos particulares	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Cultivos de <i>N. fowleri</i> e inmunización	11
Establecimiento de la dosis letal	11
Obtención del extracto amibiano	11
Inmunización con extracto de <i>N. fowleri</i> más CT	12
Detección de anticuerpos IgA e IgG durante la infección por <i>N. fowleri</i>	12
ELISAs	12
Producción de IgA e IgG en el epitelio nasal	13
Inmunización	13
Inunohistoquímica	13
Obtención de células de los ratones infectados e inmunizados	13
Pasajes nasales (PN)	14
Obtención de las células del NALT	14
Obtención de RNA mensajeros de células de la cavidad nasal	14
RT	15
PCR	15

Análisis cuantitativo	15
Análisis estadísticos.	16
RESULTADOS	17
Respuesta de anticuerpos IgA ANTI- <i>N. fowleri</i> en los lavados nasales	17
Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en lavados nasales	18
Producción de IgA e IgG en el epitelio nasal	18
Distribución de anticuerpos en la cavidad nasal	19
Expresión de mRNA para citocinas en el NALT	21
Expresión de mRNA de TGF β , plgR y cadena alpha de IgA en el NALT	22
Expresión de mRNA de citocinas en los PN	24
Expresión de mRNA de TGF β , plgR y de la cadena alpha de IgA en los PN	26
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
PERSPECTIVAS	33
BIBLIOGRAFÍA	34

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Respuesta de IgA anti- <i>N. fowleri</i> en lavados nasales	17
Figura 2	Respuesta de IgG1 e IgG2a anti- <i>N. fowleri</i> en lavados nasales	18
Figura 3	Distribución de IgA e IgG en la mucosa nasal	20
Figura 4	Respuesta en la expresión de mRNA de citocinas en el NALT	22
Figura 5	Respuesta en la expresión de mRNA de TGF β , plgR y cadena alpha de IgA en el NALT	23
Figura 6	Respuesta en la expresión de mRNA de citocinas en PN	25
Figura 7	Respuesta en la expresión de mRNA de pigR e IgA en PN	26

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	Cèlulas dendríticas
CT	Toxina del Cólera
C _T	Ciclo umbral
cDNA	Àcido desoxirribunucleico complementario Técnica de inmunoabsorbancia ligada a una
ELISA	enzima
HEV	Vènulas del endotelio alto
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Citocina: Interferón de tipo gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgAs	Inmuboglobulina de tipo A de secreción
IL	Interleucina
MAP	Meningoencefalitis amebiana primaria
mRNA	Àcido ribonucleico mensajero
rRNA	Àcido ribonucleico ribosomal
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
N.f	<i>Naegleria fowleri</i>
NK	Células asesinas (Natural Killer) Solución amortiguadora de fosfatos
PBS	(Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	post infección
pIgR	Receptor de inmunoglobulina polimérica
PN	Pasajes nasales
PP	Placas de peyer
RT	Transcripción reversa
SNC	Sistema nervioso central Factor de crecimiento tumoral (Transforming
TGF β	growth factor beta)
TCD4+	Linfocitos T de tipo cooperadores
TCD8+	Linfocitos T de tipo citotóxicos
Th	Linfocitos T cooperadores (T helper)
TNF- α :	Citocina: Factor de Necrosis Tumoral-alpha

RESUMEN

La mayoría de los microorganismos patógenos invaden el organismo a través de las mucosas. La mucosa olfatoria en particular es un sitio de entrada de diversos patógenos, como bacterias, parásitos y sobre todo virus. Sin embargo, existen muy pocos trabajos que expliquen como actúa el sistema inmune a nivel del epitelio olfatorio. Para tratar de describir los factores inmunes que actúan a nivel de la mucosa nasal, en este trabajo utilizamos el modelo de la meningoencefalitis amebiana primaria en ratón. También empleamos un esquema de inmunización a través del cual protegemos al total de ratones inmunizando por la ruta intranasal con extractos de *N. fowleri* coadministrados con la toxina del cólera (CT). Mediante el modelo de infección y el de protección se analizó la expresión de mRNA de algunas citocinas y del pIgR involucradas en la síntesis de IgA en la mucosa nasal de ratones sanos (grupo control), infectados e inmunizados (con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola) e infectados con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*. En el NALT se encontró un notable incremento en la expresión del $TNF\alpha$ en los ratones infectados e inmunizados, mientras que en los PN, se encontró que la expresión del $TNF\alpha$ estuvo aumentada en los ratones infectados principalmente. La expresión de citocinas como el $IFN\gamma$ e IL-10 aumentó en los ratones inmunizados con CT sola y en los inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT respectivamente, pero solo en los PN. Los niveles de expresión de los mRNA del pIgR se encontraron aumentados en los ratones inmunizados con ambos tratamientos, pero solamente en los PN, La expresión del $TGF\beta$ en el NALT tuvo un incremento en los ratones inmunizados con extractos más toxina. Cuando se midió la expresión de la cadena alfa de la IgA en ambos tejidos, ésta tuvo un incremento en todos los grupos de ratones analizados, principalmente en los inmunizados. Por otra parte, se encontró una alta producción de IgA en la cavidad nasal de los ratones inmunizados. Estos datos sugieren que la inmunización nasal con extractos de *N. fowleri* más CT inducen un cambio en el patrón de expresión de citocinas en la cavidad nasal el cual podría estar dirigido a una producción de IgA, la cual estaría involucrada en la protección contra la infección.

ABSTRACT

The nasal mucosal is the first site of contact with inhaled antigens to induce IgA response. However, the nature of local immune response and the role of this site in immune responses have rarely been studied. It has been previously reported that intranasal administration of amebal lysates together with cholera toxin (CT) increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. In that study it has been proposed that IgA appear to play an important role in the protection against this infection. For this reason, in this model, we characterize some immune factors involved in mucosal immune responses such as production and synthesis IgA associated cytokine and pIgR mRNA expression of mucosal cells residing in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP). mRNA expression from normal, infected (5×10^4 trophozoites) and immunized mice intranasally with amebal lysates plus cholera toxin (CT) was compared. We also compared mucosal IgA antibody responses in the same groups of mice. $\text{TNF}\alpha$ mRNA was expressed strongly in the NALT from both infected and immunized mice; meanwhile in NP, $\text{TNF}\alpha$ mRNA expression was significantly greater in infected mice. $\text{IFN}\gamma$ e IL-10 mRNA expression increased in PN from immunized mice. pIgR mRNA expression in PN from immunized mice was higher than infected and normal mice. $\text{TGF}\beta$ mRNA expression was an increase in NALT form immunized mice with amoebal lysates plus CT. Alpha IgA chain mRNA expression was increased in NALT and PN from all groups of mice compared with the normal animals but principally was increased in immunized mice. On the other hand, when we measured mucosal IgA antibody, we found an increase in immunized mice. The increased of some cytokine mRNA expression and high IgA response in the nasal mucosa by immunization, seem to play a role in the host defense against *N. fowleri* infection.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario común de mucosa

El sistema inmunitario de las mucosas está compuesto de los tejidos linfoides vinculados con las superficies mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y urogenital. Las superficies mucosas constituyen la ruta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos. El sistema inmune común de mucosas se divide en sitios inductores, donde el antígeno es localizado, endocitado, procesado y presentado a los linfocitos T y B, mientras que en los sitios efectores ocurre la secreción de anticuerpos (Czerkinsky *et al.*, 1989).

La mucosa nasal es un sitio importante en la defensa contra microorganismos patógenos que invaden a través de ésta, ya que es el primer sitio de contacto de antígenos inhalados (Kuper *et al.*, 1992). Además a su importancia que tiene en la defensa del tracto respiratorio inferior y superior, el sistema linfoide nasal coopera con el sistema inmune sistémico e influye con las reacciones inmunes en sitios mucosales distantes tales como el tracto urogenital y el intestinal (Bergquist *et al.*, 1997 y Zuercher, 2003).

En roedores, se ha caracterizado un par de agregados linfoides llamado tejido linfoide asociado a mucosas (NALT), el cual ha sido reconocido como el único tejido linfoide asociado a mucosas bien organizado a nivel del tracto respiratorio superior (Kuper *et al.*, 1992; Koornstra *et al.*, 1991 y van der Ven y Sminia, 1993).

Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT)

EL NALT es una estructura que ha sido considerada análoga al anillo de Waldeyer en los humanos (anillo de tejido linfoide, que comprende las amígdalas linguales las amígdalas palatinas, y amígdalas de nasofaríngeas, también llamadas adenoides) (Koornstra *et al.*, 1991), el cual está compuesto por una red reticular poco definida, donde los linfocitos, macrófagos y células dendríticas (CD) están presentes. Los linfocitos están organizados en áreas foliculares (área de células B) e interfoliculares (área de células T). Hay vasos linfáticos y sanguíneos. La mayoría de los vasos linfáticos están en la base de las áreas de células B y T. Numerosas

vénulas del endotelio alto (HEV) están presentes en el área de células T (Kuper *et al.*, 1989, 1992).

Estructuralmente, el NALT es muy similar a las placas de peyer (PP), contienen células M, zonas de organización para células B y T (Heritage *et al.*, 1997). Aunque el NALT no debe ser el único sitio que contribuye significativamente a la estimulación de los precursores mucosos efectores de las vías aéreas, su importancia se debe probablemente a su proximidad a la lámina propia nasal, lo que fortalece la idea de que esta estructura única es un tejido importante para estudiar procesos inmunológicos con antígenos introducidos por vía intranasal (Csencsits *et al.*, 1999).

La principal función del NALT es proporcionar un sistema de defensa en las vías aéreas superiores (Csencsits *et al.*, 1999, Boyaka *et al.*, 2000) y ha sido considerado como un compartimento inductor, donde se inicia la respuesta inmune, además de ser el sitio de cambio de inmunoglobulina IgM por IgA, una vez terminado este proceso, las células plasmáticas productoras de IgA, migran hacia la lámina propia sobre la que descansa el tejido organizado, en este sitio o porción efectora (pasajes nasales) es donde se lleva a cabo la producción de IgA secretora (IgAs) la cual se encuentra presente en el moco nasal (Shikina *et al.*, 2004)

Pasajes nasales (PN)

Pocos trabajos se han centrado en la caracterización molecular a nivel del tejido difuso que se encuentra alrededor del NALT y que ha sido llamado pasaje nasal (PN) o sitio efector de la mucosa nasal. Los pasajes nasales incluyen el tracto nasal, los cornetes, el tabique, las paredes laterales y el techo de la nariz. También se encuentran estructuras linfoides menos organizadas a lo largo del conducto lagrimal, lámina propia y epitelio nasal (Kuper *et al.*, 1992). En los pasajes nasales se da la secreción de las moléculas efectoras que permiten al organismo responder de forma óptima a los antígenos inhalados. Dentro de las moléculas efectoras más importantes se encuentran los anticuerpos, principalmente la IgAs, así como también las citocinas y sus receptores, los cuales se encargan de mediar muchos de los procesos involucrados en la respuesta inmune (O'Garra, 1998, O'Garra *et al.*, 2000 y Murphy *et al.*, 2000).

Citocinas en el NALT y PN

Las citocinas son proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa, (células dendríticas, macrófagos, células epiteliales, células T CD4+) las cuales son producidas en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Las citocinas producidas por las células de la inmunidad innata (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) median las reacciones inflamatorias iniciales y favorecen la eliminación de los microorganismos; mientras que las citocinas producidas durante la inmunidad adaptativa (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-10) estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos estimulados por antígeno y activan a células efectoras especializadas (Rengarajan *et al.*, 2000).

Se ha visto que la mayoría de las células de memoria productoras de citocinas se encuentran principalmente en sitios extra linfocíticos más que en los mismos sitios de agregados linfoides (Arase *et al.*, 2001). En el NALT de ratones no estimulados cuando se analiza la expresión de mRNA de citocinas TH1 y/o TH2 se observa que pocas son las células T CD4+ (16%) que expresan ya sea uno u otro perfil de expresión, principalmente se observa un perfil de expresión de mRNA de tipo TH0, sin embargo cuando las células CD3+ del NALT son estimuladas con diferentes mitógenos, con anti- $\alpha\beta$ TCR ò anti-CD3, estas presentan ambos perfiles de expresión. Por tanto las células T CD4+ del NALT se consideran de un perfil tipo TH0 y cuando estas son estimuladas por la exposición por ejemplo, de un antígeno vía tracto nasal, éstas pueden adquirir un perfil de expresión de citocinas ya sea TH1 y/o TH2, dependiendo del tipo de antígeno inhalado (Hiroi *et al.*, 1998).

En un trabajo llevado a cabo por Yanagita *et al.*, (1999) donde inmunizan intranasalmente con una proteína de *P. gingivalis* más toxina del cólera (CT) como adyuvante, encuentran a nivel de los sitios efectoras (pasajes nasales y glándulas submandibulares) una mayor producción de citocinas tales como IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-5 e IL-10 y cuando corroboran por RT-PCR la expresión de las mismas citocinas, el comportamiento es similar, ya que se detecta una expresión mayor de los mensajeros de estas citocinas en los pasajes nasales, mientras que en el NALT solamente es detectada la IL-4.

Por otro lado, se ha visto que células aisladas de PN, sitio considerado como efector para la producción de IgA a nivel de la cavidad nasal, producen un perfil de expresión tipo TH2, ya que cuando se aíslan células T de los PN de ratones sanos, expresan preferentemente mRNA para IL-4 e IL6. En estos ratones sanos se ha observado que aproximadamente 30% de las células T CD4+ presentan un perfil de expresión TH2, un 10% de tipo TH1 y solo un 2% de TH0. En general no se sabe el mecanismo molecular por el cual se da la inducción preferente de los mRNA de citocinas hacia un perfil de expresión tipo TH2 en los pasajes nasales (Hirori *et al.*, 1998). Este mismo comportamiento ha sido hallado en células T CD4+ de la lámina propia del tracto intestinal de ratones sanos (Xu-Amano *et al.*, 1993).

IgA en la mucosa nasal

Una de las características de la inmunidad de mucosas es la producción local de anticuerpos IgAs los cuales constituyen más del 80% total de todos los anticuerpos en el tejido linfoide asociado a mucosas, y de donde son inducidos, transportados y regulados por mecanismos distintos a los de una respuesta sistémica. La IgA es de gran importancia en la defensa del huésped actuando no sólo contra patógenos de mucosas, sino también contra microorganismos que causan enfermedades sistémicas, muchos de los cuales inicialmente colonizan a través de las superficies mucosas. Parece ser que existen tres sitios mucosos de defensa mediada por IgAs: a) el lumen donde la IgAs puede neutralizar bacterias, virus, toxinas y enzimas, así como prevenir la unión viral, la adherencia microbiana y la absorción de antígenos; b) dentro de las células epiteliales, ya que la IgA dimérica puede unirse a antígenos intracelulares; c) dentro de la lámina propia la IgA dimérica puede conformar complejos antigénicos y estos complejos pueden ser transportados al lumen (Lamm, 1997). Considerando la producción de IgA por linfocitos B a nivel de la mucosa, las citocinas participan en las diferentes etapas de desarrollo de los linfocitos B y son factores esenciales para la proliferación clonal de estas células. En los sitios inductores como el NALT, estas citocinas se encargan de mediar el cambio de isotipo de anticuerpos, mientras que a nivel de los sitios efectores (PN), se encargan de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. En general, las citocinas que participan en el control del desarrollo

de los linfocitos B (particularmente células productoras de IgA) son el TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Mestecky *et al.*, 2005).

***Naegleria fowleri* y meningoencefalitis amibiana primaria**

Naegleria fowleri es una amiba de vida libre capaz de infectar a los seres humanos. La infección por esta amiba 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 contruidos 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, fulminante y que lleva a la muerte de 3 a 7 días después que aparecen los síntomas (Schuster y Visvesvara, 2004). 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 trofozoítos pueden ser observados dentro de las lesiones del sistema nervioso central, localizadas principalmente alrededor de los vasos sanguíneos (Martínez y Visvesvara, 1997).

Modelo de infección en ratón

Cuando se inoculan por la ruta i.n trofozoítos vivos de *N. fowleri* en ratones, se produce una meningitis muy similar a la que ocurre en los humanos. 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 es como sigue: (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 invaden el epitelio, sin evidencia de algún tipo de daño en la mucosa nasal. La respuesta inflamatoria observada es escasa hasta las 30 h post-inoculación. Después de las 96 h, se observa que la respuesta inflamatoria es severa en el bulbo olfatorio y cerebro, mientras que el tejido presenta gran daño. Consecuentemente, la reacción

inflamatoria incrementa el daño del tejido, pero aparentemente no destruye las amibas las cuales proliferan en el bulbo olfatorio (Rojas-Hernández *et al.*, 2004b).

Modelo de protección

Se han realizado varios trabajos en los que se inmunizaron diferentes cepas de ratones con diferentes antígenos (*N. fowleri* viva, extractos totales amibas fijadas con paraformaldehído y sobrenadantes de medios de cultivo de *N. fowleri*, además de utilizar especies no patógenas de *Naegleria* como *N. gruberi*); utilizando diferentes rutas de inmunización (intranasal, intraperitoneal o intravenosa) 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 (desde 0 hasta 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). Por otra parte, cuando inmunizamos ratones por la ruta intranasal con extractos totales de *N. fowleri* coadministrados con Cry1Ac o la toxina del cólera y posteriormente retamos a los ratones con trofozoítos vivos de *N. fowleri* logramos inducir un 100% de protección (Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

Mecanismos de protección

En algunos trabajos se ha propuesto que la respuesta inflamatoria (neutrófilos, macrófagos y citocinas como el TNF- α y la IL-1) participa en la eliminación de *N. fowleri*, (Ferrante, 1991 y Marciano-Cabral y Cabral, 2007). Otros autores sugieren que los anticuerpos (IgG) y el complemento también participan en la eliminación de la amiba (Reilly *et al.*, 1983, Marciano-Cabral y Cabral, 2007). Sin embargo Rojas-Hernández, *et al.*, (2004b) observaron en ratones infectados que tanto en el lumen como en la lamina propia del epitelio olfatorio así como en los bulbos olfatorios una gran cantidad de polimorfonucleares rodean a las amibas, así como la lisis del tejido nervioso, sugiriendo que el daño probablemente era debido tanto a los trofozoítos de *N. fowleri* como a las células inflamatorias. Sin embargo, los neutrófilos no mostraron tener alguna actividad citotóxica a pesar de observarse rodeando a las amibas.

Se ha sugerido que la inmunidad protectora contra *N. 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) ya que durante la infección causada por *N. fowleri* en ratones inmunizados, ellos observaron un incremento de IgG sérica, seguido por IgM e IgA, 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 en un rango de 23-58% (Ferrante y Rowan-Kelly, 1988).

Rojas-Hernández *et al.*, (2004a), indujeron altas respuestas de anticuerpos IgG e IgA tanto en muestras de suero como en muestras de mucosas en ratones inmunizados por la ruta intranasal (i.n) e intraperitoneal (i.p.) con extracto coadministrado con CT. 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 sérica se presentó en los ratones que fueron inmunizados por la ruta 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 CT 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 resulta ser breve comparado con el de la IgG, no se excluye un papel importante de este isotipo (IgA) en la defensa inicial contra este organismo, ya que el tiempo en el que se establece la infección es muy breve (Jarolim *et al.*, 2000; Rojas-Hernández *et al* (2004b), donde ellos 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.

Por otra parte, en el mismo trabajo de Rojas-Hernández *et al* (2004a) se encontró que la inmunización con extractos solos o coadministrados con CT por la ruta i.n. induce principalmente una respuesta tipo Th2, ya que cuando se analizaron las

muestras de suero así como de los lavados traqueo-bronquiales estos tratamientos indujeron altas respuestas de IgG1 e IgG2a, aunque no se ha analizado el papel de estas subclases en la protección.

En un trabajo posterior se encontró que la inmunización i.n. con extractos de *N. fowleri* más la protoxina Cry1Ac provoca que el epitelio olfatorio se transforme en un epitelio de tipo respiratorio (metaplasia) que permite el transporte de anticuerpos IgA específicos contra *N. fowleri* hacia el lumen de la cavidad nasal lo que permite que estos anticuerpos interactúen con los trofozoítos de *N. fowleri* y probablemente impedir su unión al epitelio y por lo tanto la infección (Jarillo-Luna *et al.*, 2008).

El papel de las citocinas en este modelo se ha analizado en algunos trabajos *in Vitro*. Se sugiere que el TNF- α estimula la adherencia de los neutrófilos a *N. fowleri* en ausencia de anticuerpos (Michelson *et al.*, 1990). Sin embargo, en la ausencia de TNF- α las amibas son capaces de fagocitar a los neutrófilos. Por otra parte se ha reportado que la IL-1 β no provoca daño a *N. fowleri*, ni tiene algún efecto en el crecimiento de las amibas en cultivo (Fisher-Stenger, 1990,1992). En otro trabajo, realizado por Oh *et al.*, (2005), observaron que cuando los trofozoítos de *N. fowleri* son cultivados junto con células de la microglía en presencia de un anticuerpo anti-Nfa1, estas células son capaces de secretar citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) logrando reducir la citotoxicidad de la amiba.

JUSTIFICACIÓN

Existen pocos trabajos que describan como el sistema inmune puede proteger al epitelio nasal de la invasión de patógenos como *N. fowleri*, y tomando en cuenta que en el laboratorio se ha descrito el modelo de infección de *N. fowleri* en el ratón y que se cuenta con un esquema de inmunización el cual induce un 100% de protección. En este trabajo se analizó en el NALT y los PN de ratones inmunizados por la ruta intranasal con extractos de *N. fowleri* más CT la expresión de mRNA para algunas citocinas involucradas en la producción y síntesis de la IgA, ya que se ha visto que posiblemente este anticuerpo al ser secretado al lumen de la cavidad nasal sea capaz de interactuar con los trofozoítos de *N. fowleri* y así evitar la infección. También se analizó la presencia de mRNA para el receptor de poli-inmunoglobulinas (pIgR) pues se sabe que este receptor es clave para el transporte de la IgA hacia el lumen. Por último, se determinó la presencia de IgA en la cavidad nasal.

HIPÒTESIS

Si se obtiene 100% de protección en los ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT y se observa un incremento en la IgA en estos ratones, entonces los niveles en la expresión de los mRNA para las citocinas asociadas en la producción de este anticuerpo se verán modificadas tanto en el NALT como en los PN.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la producción de IgA así como la expresión de mRNA de citocinas en la mucosa nasal de ratones en el modelo de la meningitis causada por *Naegleria fowleri*.

Objetivos particulares

1. Detectar los niveles de anticuerpos IgA e IgG (IgG1 e IgG2a) específicos anti-*N. fowleri* de lavados nasales de ratones inmunizados y retados con *N. fowleri*
2. Determinar la producción de IgA e IgG en el epitelio nasal de los ratones inmunizados y retados
3. Determinar la expresión de IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α , IL1 β , pIgR, TGF β , así como la cadena alpha de la IgA mediante la presencia del RNA mensajero en células de la mucosa nasal de ratones inmunizados con extracto más CT e infectados con *N. fowleri*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de *N. fowleri* e inmunización

Se trabajó con la cepa de *Naegleria fowleri* ATCC30808 (American Type Culture Collection, Manassas, Va), la cual fue cultivada axénicamente en medio Bactocasitona (225930, Difco, Le Pont de Claix, France) suplementado con suero fetal bovino al 10% (16170-078, GIBCO, Grand Island, N.Y.) a 37°C. La virulencia de la amiba fue reactivada 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 se cultivó 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 los ratones. La virulencia de las amibas fue verificada analizando su letalidad.

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 capaz de matar al 100% de los ratones alrededor del día nueve después de la inoculación de los trofozoítos. La misma dosis letal capaz de matar a los ratones BALB/c, se utilizó para todos los grupos.

Obtención del extracto amibiano

Las amibas cultivadas en medio Bactocasitona al 2% en agua destilada, fueron cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento, se lavaron por centrifugación $1500 \times g$ por 10 min con solución amortiguadora de fosfatos (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 ; 8.1 mM Na_2HPO_4 [pH 7.2]) (PBS) Posteriormente a la pastilla celular se le agregó 1 ml de ácido P-hidroxi-mercuriobenzóico 5 mM (H-0642, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 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 se almacenó a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteínas fue determinada por la técnica de Bradford y el patrón de proteínas se examinó por electroforesis SDS-PAGE. Toxina del cólera (CT). La

toxina del cólera fue adquirida comercialmente (C8052-2MG, Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

Inmunización con extracto de *N. fowleri* más CT

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 8 a 10 semanas de edad. Los ratones fueron divididos en 4 grupos de acuerdo al tratamiento (Tabla 1). Los ratones se inmunizaron por la ruta intranasal (i.n.), previamente fueron anestesiados con éter etílico. 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*.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
SANOS	INFECTADOS	INMUNIZADOS	INMUNIZADOS
PBS1X	50 MIL TROFOZOITOS	100µg EXT+ 1 µg CT	1 µg CT

Detección de anticuerpos IgA e IgG durante la infección por *N. fowleri*

La IgA fue medida tanto en lavados nasales como en la cavidad nasal de los ratones infectados y en los ratones inmunizados e infectados.

ELISAs

Los niveles de IgA, IgG1 e IgG2a específica fueron medidos en lavados nasales de los ratones inmunizados y retados. La IgA anti *N. fowleri* fue determinada por la técnica de ELISA. Placas (Sarstedt, USA) de 96 pozos se recubrieron 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. Lavados nasales sin diluir fueron colocados en las placas y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se agregó el anticuerpo peroxidado anti-IgA, 1:1000 (62-1143, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) de ratón, y anti-IgG1 e IgG2a (61-0120 y 61-0220 Zymed Laboratories, San Francisco, CA) se incubaron toda la noche a 4°C. Después, las placas se lavaron con PBS-T y se adicionó la solución reveladora (o-fenilendiamina (P9029, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 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).

Producción de IgA e IgG en el epitelio nasal

Grupos de 5 ratones fueron divididos como sigue: (a) inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT y retados con 50 mil trofozoítos, (b) inmunizados con CT y retados, (c) solamente infectados con 50 mil trofozoítos y (d) ratones sanos. Los ratones se sangraron por punción cardiaca, se cortó la cabeza y se les retiró la piel. Posteriormente se lavaron en agua destilada y se fijaron con paraformaldehído (4% en PBS1X a 60°C ajustando el pH con lentejas de NaOH) por 24 h. Entonces las cabezas se lavaron y se descalcificaron con Etilendinitrilotetracetato disodico, EDTA (5648, Baker analyzed, Phillipsburg NJ). Después se lavaron, se incluyeron en parafina y se procesaron para obtener cortes de 7µm.

Inmunohistoquímica

Los cortes fueron desparafinados e hidratados con PBS. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de H₂O₂ (7210, Merck, Darmstadt, Germany) al 1% en PBS. Después los cortes se bloquearon con suero bovino al 5% durante 30 min. Los cortes se lavaron con PBS-T y después se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-*N. fowleri*, por 1 h, posteriormente se lavaron con PBS-T durante 10 min en agitación, finalmente se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG o IgA (31160, 31169, Pierce, Rockford, IL) de ratón conjugado a peroxidasa durante 1 h; todos los anticuerpos se incubaron a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló con H₂O₂. Después se agregó diaminobencidina, DAB (34002, Pierce, Rockford, IL). como sustrato. Por último las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris, finalmente las muestras fueron deshidratadas y se montaron con resina sintética. Los controles se procesaron con el mismo protocolo, sin incubar las muestras con el primer anticuerpo.

Obtención de células de los ratones infectados e inmunizados

Pasajes nasales (PN)

Una vez inmunizados e infectados los ratones, se sacrificaron a los días 3 y 9 después del reto. Se obtuvo la nariz, se retiró la piel, la mandíbula y el paladar, posterior a esto, se realizó un corte a la altura del eje ocular y el resto de la nariz se cortó con tijeras en pequeños trozos para incubarlos con 30 U de colagenasa tipo IV (C-5138, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) por 30 min, al terminar la incubación el tejido fue filtrado con tela de organza y se centrifugó a 800 g a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se lavó dos veces con PBS1X, finalmente se ajustó entre 5 y 10 millones de células por mililitro de Trizol (15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Obtención de las células del NALT

El tejido del NALT se obtuvo removiendo el paladar blando, tal como se describe en (Asanuma *et al.*, 1997; Heritage *et al.*, 1998). Los ratones anestesiados con éter fueron desangrados y se les cortó la cabeza, se removió la mandíbula inferior y la lengua. Se separó con mucho cuidado el paladar. Se lavó la muestra con medio RPMI (1640, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) y se conservó en este medio para su uso. Para la obtención de las células del NALT, el paladar del ratón, conteniendo el NALT se colocó en una caja de Petri con 10 ml de medio RPMI se realizó un raspado suave con una espátula para separar el NALT del paladar. El NALT se disgregó con el émbolo de una jeringa y se recuperó la suspensión celular, la cual fue filtrada en tela de organza de 10 × 10 cm con una abertura de 1mm y se colocó en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión celular se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 4°C al cabo de los cuales se desechó el sobrenadante, finalmente se resuspendieron de 5 a 10 millones de células por mililitro de Trizol.

Obtención de RNA total de células de la cavidad nasal

Al concentrado celular conteniendo 1 ml de Trizol, se homogenizó y se le agregaron 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 12,000 g por 15 min a 4°C; la fase acuosa fue recuperada en otro tubo, se le agregó un volumen de 0.5 ml de isopropanol y se centrifugó nuevamente a 12,000 g por 10 min a 4°C, posteriormente la pastilla resultante fue lavada con 500 µl de etanol al 75%. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 30 µl de H₂O bidestilada conteniendo 0.1% de dietilpirocarbonato, DEPC (10813-012, Invitrogen, Carlsbad, CA) . RNA total fue cuantificado usando un

espectrofotómetro (PerkinElmer, LS 55) a una longitud de onda de 260 nm. Para determinar la integridad del RNA total se corrió una alícuota de 3 μ l en un gel de agarosa al 0.8% preparado con TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) como disolvente en condiciones reductoras, una vez asegurada la integridad, la muestra fue almacenada a -70° C, hasta su posterior uso.

RT

La transcripción reversa (RT) fue llevada a cabo usando un kit para la transcriptasa reversa, SuperScript II (18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA). Total RNA (1 μ g) fue transcrito en un volumen total de 20 μ l conteniendo 5 μ M oligo d(T) de iniciador, 1 X de Buffer (50 mM Tris-HCl(pH8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0.5 mM de cada dNTP bajo las siguientes condiciones: Una primera incubación a 70°C por 5 min sin enzima, se añade la enzima y se incuba la mezcla a 42°C por 60 min y finalmente se inactiva la enzima a 90° por 5 min. Posterior a la RT, 1.5 unidades de RNase (12091-039, Invitrogen, Carlsbad, CA). fueron agregadas y la mezcla se incubó a 37°C por 15 min. Los ciclos de calentamiento fueron llevados a cabo en un termociclador automatizado (Bresatec; MJ Research Inc; PTC-100). El cDNA resultante, fue almacenado a -20 °C hasta su amplificación.

PCR TIEMPO REAL

Una vez que se hace el transcrito de RNA a cDNA, se procedió a la amplificación por PCR en tiempo real utilizando el kit de Master Mix Taqman (480 reacciones, Roche) en la presencia de oligos específicos para cada gen de interés, utilizando sondas de hidrólisis específicas para cada gen, acopladas a un fluorocromo (FAM). 2 μ L de cDNA se utilizaron en un volumen final de 10 μ L. Un total de 45 ciclos fueron llevados a cabo en un termociclador (LightCycler 2.0, Roche Applied Sciences). De forma similar se trabajó con el gen control 18S del rRNA en cada muestra. Para cada gen de interés, se confirmó la eficiencia de amplificación al comparar con el gen constitutivo.

Análisis cuantitativo de la PCR tiempo real

Los datos de la RT-PCR cuantitativa, fueron analizados con el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak y Schmittgen, 2001). En éste método (ΔC_T), se calcula primero la diferencia entre los valores del C_T del control y del gen

normalizador ($\Delta C_T = C_T(\text{control}) - C_{T,\text{normalizador}}$) para cada muestra y así poder ser cuantificada. Una de estas muestras es escogida como la referencia para poder hacer la comparación. El cálculo del $\Delta\Delta C_T$ requiere encontrar la diferencia entre el ΔC_T de la muestra y el ΔC_T de la referencia. El último paso para la cuantificación es transformar éstos valores a valores relativos. La fórmula para esto es $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Análisis estadísticos.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de los mRNA y producción de IgA fueron determinadas por una prueba no paramétrica (Mann-Whitney U-Willcoxon).

RESULTADOS

En este trabajo comparamos la producción de IgA en lavados nasales y epitelio olfatorio así como la expresión del RNAm para varias citocinas en el NALT y PN de ratones sanos (grupo control), infectados e inmunizados (con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola) e infectados con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*. Todos los ratones fueron sacrificados a los días 3 y 9 después de la infección con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*.

Respuesta de anticuerpos IgA anti-*N. fowleri* en los lavados nasales

En este trabajo se compararon los niveles de anticuerpos IgA específicos anti-*N. fowleri* de lavados nasales de los diferentes grupos: sanos (grupo control), infectados e inmunizados (con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola) e infectados con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*. En la figura 1 se muestra la respuesta de IgA específica anti-*N. fowleri*. En general, los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT produjeron respuestas significativas en los niveles de anticuerpos IgA específicos ($p < 0.05$) a los dos tiempos analizados después del reto con *N. fowleri*. En el grupo infectado también hubo un ligero incremento en la producción de IgA específica que mostró ser significativo ($p < 0.05$).

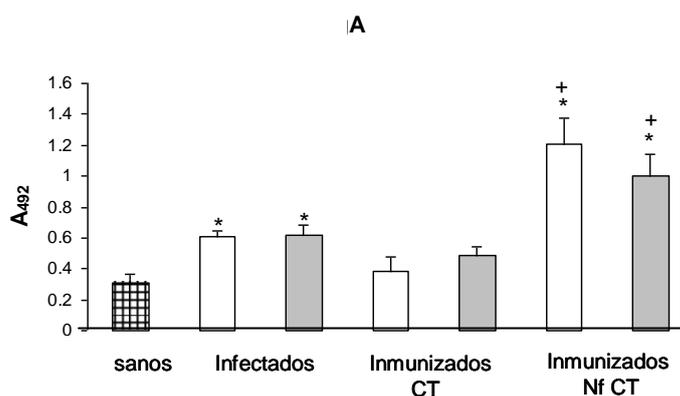


FIG. 1. Respuesta de IgA anti-*N. fowleri* en lavados nasales de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (*Nf*+CT) durante la infección con *N. fowleri*. Se comparan los valores de absorbancia entre cada grupo. Las muestras fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y día 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoítos de *Nf*. Los niveles de IgA fueron determinados por la técnica de ELISA. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A_{492}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N =5) Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

Subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en lavados nasales

En general, se observó una respuesta significativa de ambas subclases en los ratones inmunizados. En cuanto a la producción de IgG1, se encontraron mayores niveles de anticuerpos en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT ($p < 0.05$), mientras que para la IgG2a, la mayor producción se encontró en los ratones inmunizados tanto con CT sola y en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT ($p < 0.05$) (Fig. 2). Comparando las dos subclases en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT, hubo una producción mayor de IgG1 con respecto a la IgG2a.

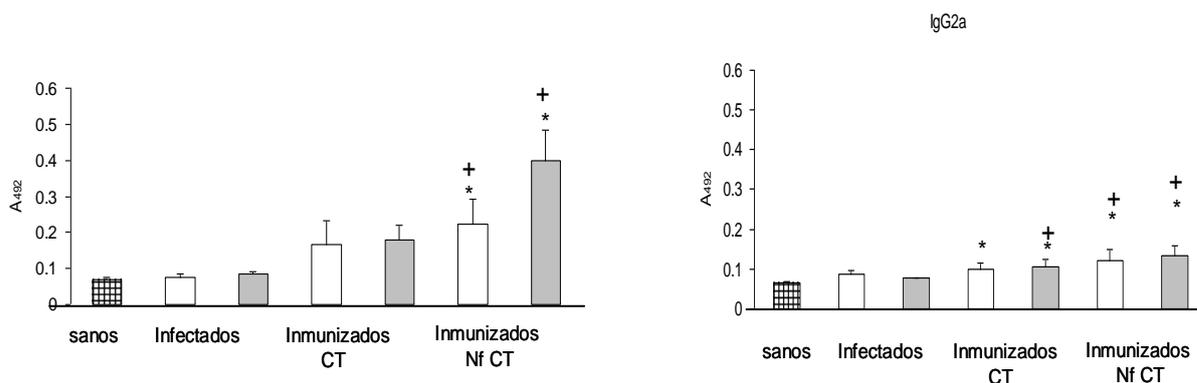


FIG. 2. Respuesta de IgG1 e IgG2a anti-*N. fowleri* en lavados nasales de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (Nf+CT) durante la infección con *N. fowleri*. Se comparan los valores de absorbancia entre cada grupo. Las muestras fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y día 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *Nf*. Los niveles de IgG1 (a) e IgG2a (b) fueron determinados por la técnica de ELISA. Los datos expresan los valores de absorbancia a 492 nm (A_{492}) de la media \pm SD de cada grupo experimental (N =5) Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

Producción de IgA e IgG en el epitelio nasal

En un trabajo anterior (Jarillo-Luna *et al.*, 2008) se reportó que la inmunización i.n. con extractos más Cry1Ac induce metaplasia en el epitelio olfatorio de los ratones, como consecuencia la IgA pudo ser localizada en el lumen interaccionando con los trofozoítos de *N. fowleri*. En el presente trabajo cuando inmunizamos a los ratones con extracto más CT o CT sola observamos los mismos cambios: en general la mucosa nasal presentó características normales incluyendo el epitelio nasal, la lámina propia y las glándulas de Bowman. Un epitelio transicional principalmente entre el epitelio olfatorio y el respiratorio, consistente de un epitelio pseudoestratificado o plano con células ciliadas y ocasionalmente células Globex, sin células olfatorias. En la región olfatoria el epitelio metaplásico fue observado

como tejido cilíndrico pseudoestratificado, conteniendo células heterogéneas y diversos grados de desorganización (Fig. 3)

Distribución de anticuerpos en la cavidad nasal

En el epitelio olfatorio de los ratones sanos, la presencia de los anticuerpos IgA e IgG fue escasa tanto en la lámina propia como en la lámina basal (Fig. 3B-C), mientras que en los ratones infectados la presencia de la IgA e IgG fue mayor que en el grupo control sobre todo a nivel de la lámina propia el epitelio, incluso sobre algunas células en el lumen de la cavidad nasal (3E-F). La respuesta de estos anticuerpos en los ratones inmunizados tanto con extractos más CT y CT sola fue muy alta observándose la marca en las glándulas de la lamina propia, la lamina basal y en exudado inflamatorio en el lumen de la cavidad nasal (Fig. 3H-I,K-L)

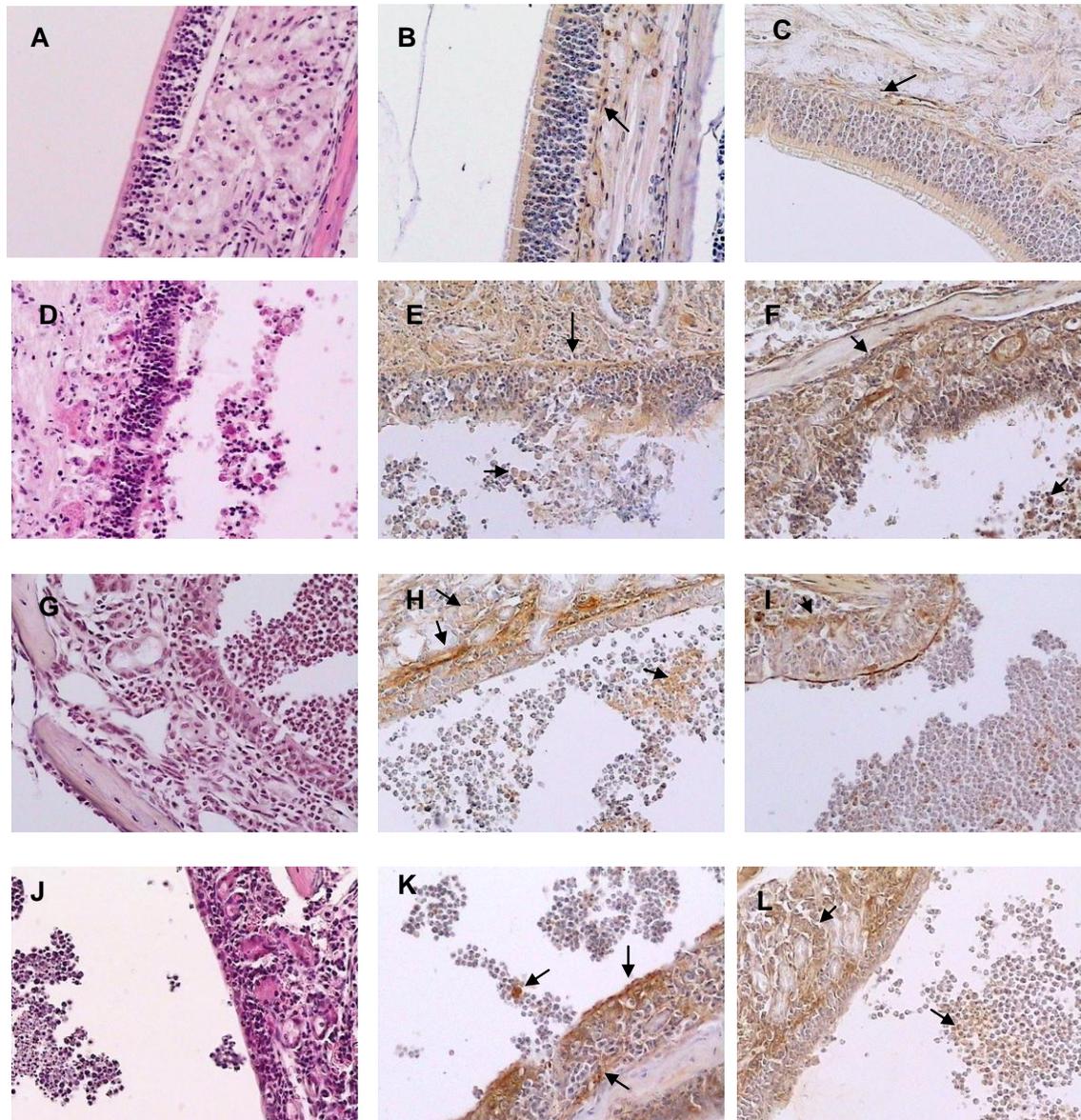


Figure 3. Distribución de IgA (columna 2) e IgG (columna 3) en la mucosa nasal de ratones sanos (A–C), infectados (D-F), inmunizados con CT y retados (G-I) e inmunizados con extractos más CT y retados (J-L). Las flechas muestran la IgA e IgG producida. En los ratones sanos se observa que ambos anticuerpos son escasos en la membrana basal, mientras que en los ratones inmunizados e infectados, se observa una cantidad mayor de ambos anticuerpos, además de que se observa una región metaplásica del epitelio olfatorio y alteraciones de la lámina propia. La lámina propia de los ratones infectados (e-f), así como de los ratones inmunizados (h,i,k,l) contienen abundantes células inflamatorias que infiltran el epitelio, así como también se observan células IgA+ en la lámina propia, así como también en el lumen de la cavidad nasal. Epitelio olfatorio (EO), epitelio metaplásico (EM), lámina propia (LM) y lumen (L). 200x

Expresión de mRNA para citocinas en el NALT

La expresión del mRNA de las diferentes citocinas medidas en el NALT se muestra en la Fig. 4. En primer lugar, la expresión de RNAm para el la IL-6 en los ratones inmunizados se mantuvo igual con respecto a los ratones control, mientras que en los ratones que fueron infectados la expresión disminuyó ($p<0.05$). La expresión del RNAm para la IL-10 fue similar en todos los grupos con respecto al control ($p>0.05$) excepto en los ratones infectados y sacrificados al día 9 donde la expresión se redujo ($p<0.05$). En cuanto a la expresión del mRNA para el TNF- α , ésta fue mayor significativamente ($p<0.05$) tanto en los ratones infectados (día 9 p.i) como en los inmunizados con respecto al control. Por otro lado, la expresión del RNAm para la IL-1 β tuvo un incremento en los ratones infectados y sacrificados al día 9 con respecto al control ($p<0.05$), mientras que en el resto del los grupos la expresión de esta citocina se redujo ($p<0.05$). En cuanto a la expresión del RNAm para el IFN- γ se observó disminuida en todos los grupos con respecto al control ($p<0.05$).

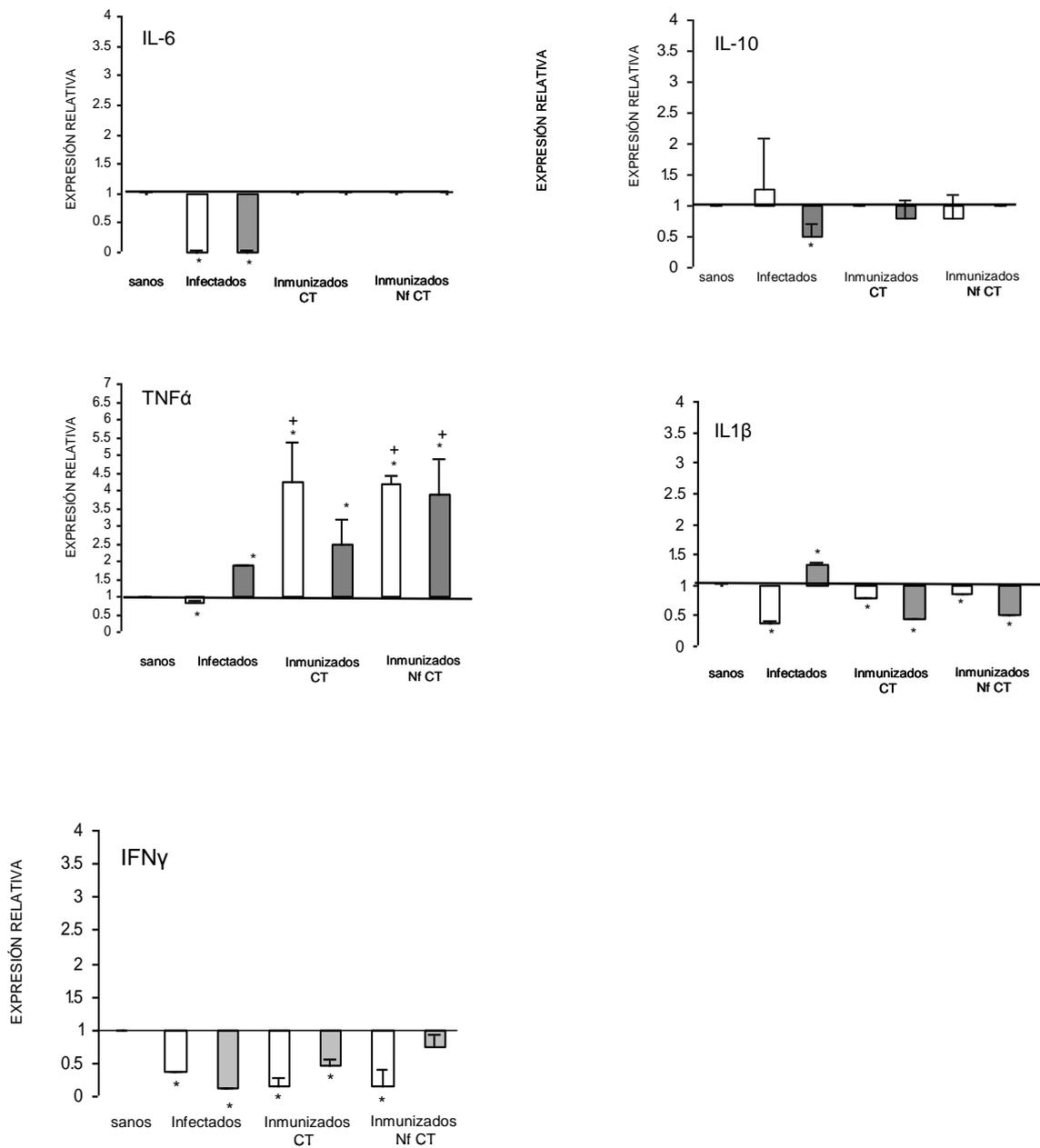


Fig. 4. Respuesta en la expresión de mRNA de citocinas en tejido linfóide asociado a nariz (NALT) de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (NF+CT) durante la infección con *N. fowleri*. Células totales del NALT fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *Nf*. Valores de mRNA de citocinas fueron medidos por PCR tiempo real. Los datos representan la media de los valores del ΔC_T de tres experimentos. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

Expresión de mRNA de TGF β , plgR y cadena alpha de IgA en el NALT

En este trabajo también se comparó la expresión del mRNA del TGF β , plgR y cadena alpha para IgA en el NALT y PN de los diferentes grupos de ratones; sanos (grupo control), infectados e inmunizados (con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola) e infectados con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*. Los resultados de la expresión de estos mensajeros en el NALT se muestran en la figura 5. Primeramente, la expresión del TGF β tuvo un incremento significativo en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT ($p < 0.05$). En el resto de los grupos analizados, la expresión no varió de manera significativa con respecto al control ($p > 0.05$). En cuanto a la expresión del mRNA para el plgR, no se encontró un aumento significativo con respecto al grupo control ($p > 0.05$). La expresión de mRNA de IgA incrementó de manera significativa en todos los grupos cuando se compara con los grupos controles ($p < 0.05$). La mayor expresión fue encontrada en los ratones inmunizados con CT y sacrificados al día 3 p.i.

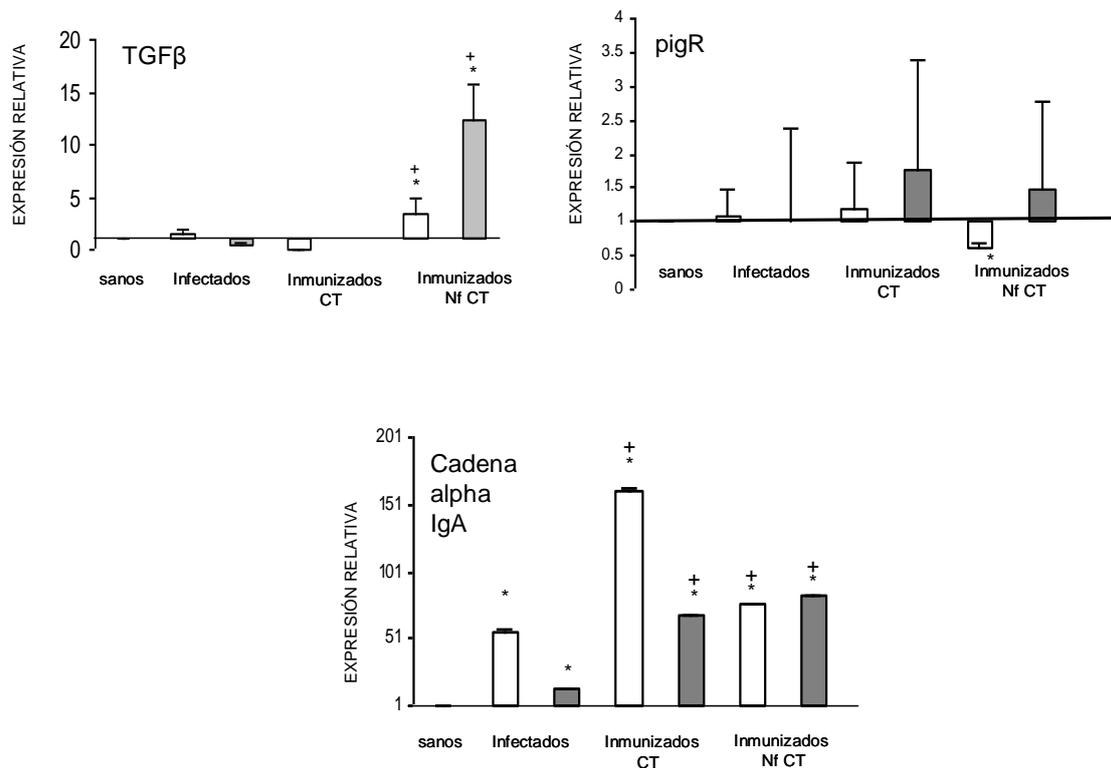


Fig. 5. Respuesta en la expresión de mRNA de TGF β , plgR y cadena alpha de IgA en tejido linfóide asociado a nariz (NALT) de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (NF+CT) durante la infección con *N. fowleri*. Células totales del NALT fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoítos de *Nf*. Valores de mRNA de citocinas fueron medidos por PCR tiempo real. Los datos representan la media de los valores del ΔC_T de tres experimentos. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

Expresión de mRNA de citocinas en los PN

Para medir las citocinas de los PN al igual que como en el NALT, todos los ratones fueron sacrificados a los días 3 y 9 después de la infección con los trofozoítos vivos de *N. fowleri*. La respuesta del mRNA de las diferentes citocinas medidas en los PN se muestra en la Fig. 6. La expresión de IL-6 incrementó de manera significativa en los ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT ($p < 0.05$), mientras que en el resto de los grupos se mantuvo similar al control ($p > 0.05$). En el caso de la expresión del mRNA para la IL-10, ésta fue significativamente mayor en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT y sacrificados al día 3 y 9 p.i. En el resto de los ratones, la expresión se redujo ($p < 0.05$). La expresión de RNAm para el $TNF\alpha$, el mayor incremento se encontró en los ratones infectados ($p < 0.05$), mientras que los ratones que fueron inmunizados con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola e infectados la expresión fue menor ($p < 0.05$). La expresión entre estos dos grupos inmunizados aumentó cuando los ratones se sacrificaron al día 3 p.i., mientras que disminuye con respecto al control ($p < 0.05$) cuando se sacrificaron al día 9 p.i. En cuanto a la expresión de mRNA para la IL-1 β tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$) en todos los grupos de ratones con respecto a los controles. La mayor expresión se encontró en el grupo solamente infectado y sacrificado al día 3 p.i. En los ratones inmunizados también se encontró la mayor expresión ($p < 0.05$) en los ratones sacrificados al día 3 p.i. De los grupos inmunizados con extractos totales de *N. fowleri* más CT o CT sola e infectados y sacrificados al día 3 p.i., la mayor expresión se encontró en los ratones que fueron inmunizados con CT sola, mientras que la expresión de esta citocina en estos mismos ratones inmunizados (*N. fowleri* más CT o CT sola) y sacrificados al día 9 p.i. fue comparable. En cuanto a la expresión del mRNA para el IFN γ , el mayor incremento se encontró en los ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT y CT sola y sacrificados al día 3 y 9 p.i., mientras que en los ratones solamente infectados, la expresión fue similar a la del control ($p > 0.05$).

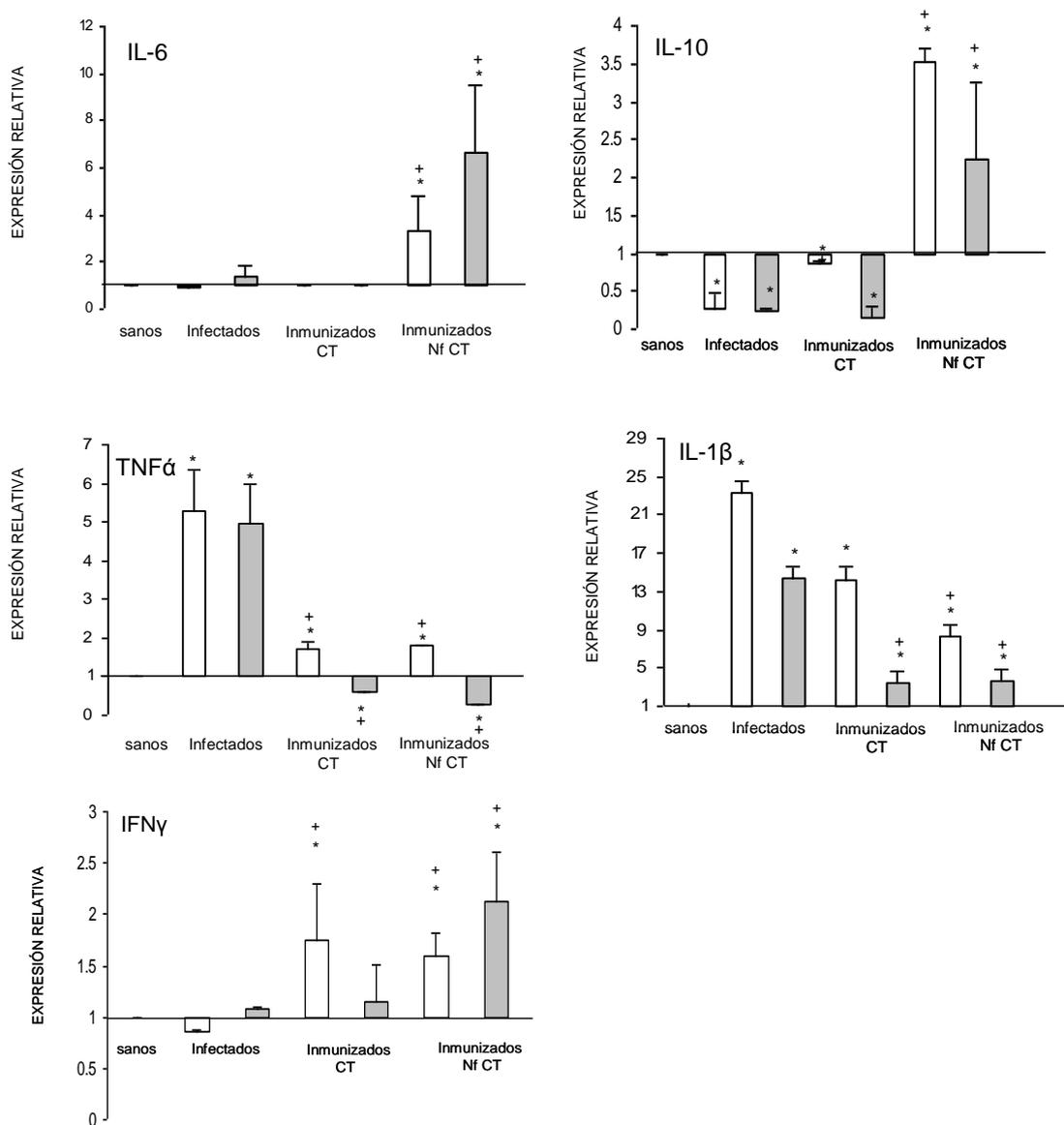


Fig. 6. Respuesta en la expresión de mRNA de citocinas en pasajes nasales (PN) de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (*NF+CT*) durante la infección con *N. fowleri*. Células totales de los PN fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *Nf*. Valores de mRNA de citocinas fueron medidos por PCR tiempo real. Los datos representan la media de los valores del ΔC_T de tres experimentos. Se muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

Expresión de mRNA de TGF β , plgR y de la cadena alpha de IgA en los PN

La respuesta en la expresión de mRNA para el TGF β , plgR e IgA también fue medida en los PN de los diferentes grupos de ratones. Los resultados de la expresión de estos mensajeros en los PN se muestran en la figura 7. La expresión de mRNA para el TGF β , aunque fue medida, no se detectó diferencia significativa en ninguno de los grupos de ratones con respecto al control ($p>0.05$) (datos no mostrados). La expresión del mRNA para el plgR, fue mayor significativamente en los ratones inmunizados con CT sola y en los ratones inmunizados con *N. fowleri* más CT sacrificados al día 3 y 9 p.i ($p<0.05$). Por el contrario, la expresión estuvo reducida en los ratones solamente infectados ($p<0.05$).

La expresión de mRNA para la cadena alpha de la IgA al igual que en el NALT incrementó de manera significativa en todos los grupos cuando se compara con el control ($p<0.05$). El incremento más alto se encontró en los ratones inmunizados con CT sola y en los inmunizados con *N. fowleri* más CT sacrificados al día 3 p.i.

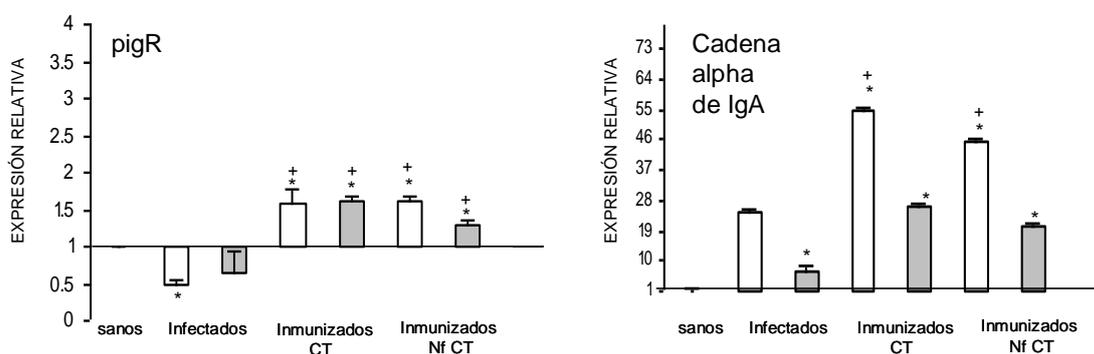


Fig.7. Respuesta en la expresión de mRNA de plgR e IgA en pasajes nasales (PN) de ratones inmunizados con Toxina del Cólera sola (CT) y con *N. fowleri* más Toxina del Cólera (NF+CT) durante la infección con *N. fowleri*. Células totales de los PN fueron colectadas al día 3 (barras blancas) y 9 (barras grises) después de la infección con 5×10^4 trofozoitos de *Nf*. Valores de mRNA de citocinas fueron medidos por PCR tiempo real. Los datos representan la media de los valores del ΔC_T de tres experimentos. Se muestran las diferencias significativas ($p<0.05$) con respecto al grupo control (*) y con respecto al grupo solamente infectado (+).

DISCUSIÓN

En trabajos previos Rojas-Hernández *et al.* (2004) han demostrado que la inmunización i.n. con extracto de *N. fowleri* más CT o Cry1Ac induce un 100% de protección cuando los ratones son retados con las amibas vivas: también se ha sugerido que la inmunización induce niveles altos de IgA e IgG en los lavados nasales y que probablemente la IgA participa en la protección.

En este trabajo demostramos que la inmunización i.n. con extractos de *N. fowleri* más CT induce una mayor producción de anticuerpos IgA, IgG1 e IgG2a en lavados nasales y de IgA e IgG total en el epitelio nasal de estos ratones con respecto a los ratones sanos, infectados e inmunizados con CT. Cuando se analizó la expresión de los mRNA de las citocinas en el NALT, encontramos que hay un notable incremento en la expresión del TNF- α en todos los grupos analizados, principalmente en los ratones inmunizados. Mientras que la expresión del TGF- β también estuvo aumentada pero solo en los ratones inmunizados con extractos más CT. La expresión de las demás citocinas (IL-1 β , IL-10, IL-6 e IFN γ) fue similar o menor a la del grupo control. En cuanto a la expresión de mRNA para la cadena alpha de la IgA en éste mismo tejido, tuvo un incremento en todos los grupos de ratones analizados, principalmente en los ratones inmunizados.

En los PN, al igual que en el NALT, se midió la expresión de los mRNA de las mismas citocinas, encontrando que la expresión de la IL-1 β y el TNF- α estuvo aumentada en todos los grupos de ratones con respecto a los animales sanos, pero este aumento fue más significativo en los ratones solamente infectados. Por otro lado, la expresión de citocinas como el IFN γ , IL-10 e IL-6 aumentó en los ratones inmunizados con extractos más CT. Cuando se midieron los niveles de expresión de los mRNA del TGF- β , pIgR y la cadena alpha de IgA, se encontró un aumento de estos mensajeros en los ratones inmunizados con ambos tratamientos, mientras que la expresión del TGF- β no alcanzó a ser detectada en ninguno de los grupos (datos no mostrados).

En un estudio previo se reportó que la inmunización con extractos de *N. fowleri* más CT o Cry1Ac induce la producción de IgA en lavados nasales (Rojas-Hernández *et al.*, 2004). En el presente trabajo, cuando los ratones se sacrifican a

los 3 y 9 días después del reto, se observa una mayor producción de IgA en comparación con los ratones que se sacrifican antes del reto (Rojas-Hernández *et al.*, 2004). Cuando se analizó la respuesta de IgA en la cavidad nasal de los ratones inmunizados con extracto más Cry1Ac se observó que la inmunización provoca que el epitelio olfatorio se transforme a un epitelio de tipo respiratorio, lo que permite que la IgA pueda ser transportada hacia el lumen de la cavidad nasal, donde se observa interactuando con los trofozoítos de *N. fowleri* (Jarillo-Luna *et al.*, 2008). En el presente trabajo también observamos que la inmunización con extractos de *N. fowleri* más CT provoca el mismo cambio en el epitelio así como el transporte de la IgA. Además encontramos que el mRNA para el pIgR no se expresa en los pasajes nasales de los ratones sanos e infectados, mientras que en los ratones inmunizados hay un aumento significativo de este mensajero lo cual coincide con el aumento de la presencia de IgA en el epitelio nasal de los ratones inmunizados.

La IgG se encontró en grandes cantidades tanto en la lámina propia como en el lumen de la cavidad nasal, esto no ha sido reportado para ningún tipo de infección. La presencia de la IgG en el lumen probablemente es debido al cambio que sufre el epitelio olfatorio al transformarse en un epitelio de tipo respiratorio en donde el epitelio se vuelve permeable y por tanto hay salida de proteínas entre estas la IgG. Nosotros sugerimos este mecanismo de transporte de IgG al lumen, ya que hasta el momento no se ha reportado que exista un receptor capaz de transportar este anticuerpo a través de las células epiteliales hasta el lumen.

Por otro lado, para la producción de anticuerpos IgA, IgG e IgG2a se requiere la producción de citocinas por diferentes células como linfocitos T CD4+, macrófagos células dendríticas y células epiteliales (Mestecky *et al.*; 2005). Por lo tanto nosotros analizamos si la infección y la inmunización de los ratones inducen la síntesis de mRNA para algunas citocinas relacionadas con la producción de estos anticuerpos. En el NALT que es el sitio de inducción de la respuesta inmune más cercano a la cavidad nasal (Kraal *et al.*, 2006), encontramos que la expresión de los mRNA de la IL-6, IL-10, IL-1 β e IFN γ se reduce o se mantiene igual con respecto a los ratones sanos, sin embargo la expresión del mRNA para el TNF- α , aumentó en los grupos de ratones inmunizados. Mientras que el TGF- β solo aumentó en los grupos

inmunizados con extracto más CT. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Yanagita *et al* (1999) en donde inmunizan ratones con un antígeno de *P. gingivalis* coadministrado con CT donde no ven en el NALT aumento en la expresión de los mRNA para la IL-2, IL5, IL-6, IL-10 e IFN γ , solo reportan que la IL-4 aumenta. El hecho de que la expresión del TNF- α en el NALT se haya encontrado incrementada, posiblemente se deba a que en este trabajo se dieron cuatro inmunizaciones con el extracto de *N. fowleri* coadministrado con la CT, lo cual pudiera significar un estímulo continuo a las células productoras de esta citocina (macrófagos y células dendríticas). Se sabe que el TNF- α juega un papel importante en la expansión policlonal de linfocitos B en algunas infecciones virales (Higuchi *et al.*, 1997). El incremento significativo en la expresión de esta citocina en los ratones inmunizados podría de alguna manera explicar en primer lugar, la expresión incrementada de mRNA de la cadena alfa de IgA en los ratones inmunizados y por otro lado la alta producción de IgA específica a nivel de los lavados nasales y en el epitelio olfatorio. Es importante evaluar qué tanto la expresión de esta citocina a nivel del NALT podría tener un efecto directo en la protección local contra la infección causada por *N. fowleri*.

En cuanto a la expresión del mRNA del TGF- β , encontramos una alta expresión del mensajero en los ratones inmunizados con extractos de *N. fowleri* más CT, se ha reportado que esta citocina es muy importante en el cambio de isotipo (McIntyre *et al.*, 1995) en los sitios inductores como el NALT. El no haber encontrado expresión de mRNA de las otras citocinas analizadas pudiera significar que el NALT no sea el sitio de inducción en el modelo de infección por *N. fowleri* y que las células T CD4+ y linfocitos B no se hayan activado o bien que la inducción se haya dado a tiempos muy tempranos y por tanto en los tiempos analizados no se haya podido detectar la expresión de ninguna de estas citocinas. Por otro lado, también analizamos la expresión de mRNA de las mismas citocinas en los PN, ya que este tejido ha sido considerado como un sitio efector de la cavidad nasal para la secreción de IgA (Hiroi *et al.*, 1998). Encontramos que la inmunización con extractos de *N. fowleri* más CT aumento en la expresión de los mRNA para la IL-6 e IL-10. Se ha reportado que estas citocinas participan en la diferenciación de los linfocitos B IgA+ a células plasmáticas (Mestecky *et al.*, 2005). Por otro lado, estos resultados coinciden de nuevo con los de Yanagita *et al* (1999), donde se ha observado que

cuando se inmuniza con un antígeno de *P. gingivalis* más CT como adyuvante, encuentran una expresión de mRNA para la IL-6 e IL-10 incrementada a nivel de los pasajes nasales. En cuanto a la expresión del mRNA para el IFN- γ , se observó un incremento en los ratones inmunizados tanto con CT sola como con extracto de *N. fowleri* más CT. Éste aumento podría explicar la alta producción de IgA a nivel del epitelio olfatorio en los ratones que fueron inmunizados, ya que se ha reportado que el IFN- γ incrementa la inducción del componente secretor de la IgA-S, el cual es producto del receptor de poli inmunoglobulinas (pIgR) encargado del transporte de IgA-S por las células epiteliales (Mestecky *et al.*, 2005). Por otro lado, en este tejido también se encontró una expresión alta del TNF- γ pero solo de los ratones infectados y este resultado concuerda con lo encontrado por Rojas-Hernández *et al.*, (2004b) donde observan que a partir de las 8 horas después de infectar con los trofozoítos de *N. fowleri* éstos se encuentran rodeados por neutrófilos, los cuales son activados por esta citocina y como se ha reportado, estas células participan en la eliminación de la amiba de la cavidad nasal (Ferrante, 1989; Rojas-Hernández *et al.*, 2004b y Jarillo-Luna *et al.*, 2008).

En este trabajo se observó que la inmunización i.n. con extractos de *N. fowleri* más CT incrementa la producción de IgA a nivel del epitelio nasal, además de que se incrementa la expresión del mensajero para algunas citocinas (IL-6, IL-10 y TGF- β) que participan en la producción y secreción de este anticuerpo. Otro hallazgo importante fue la detección del incremento en la expresión del pIgR, receptor que se encarga del transporte de la IgA hacia el lumen del epitelio nasal. En este trabajo se propone que debido a la presencia de la IgA tanto a nivel de la lámina propia como en lumen este receptor podría estar participando en el transporte de la IgA. Además, se observó por inmunohistoquímica que la inmunización i.n. provoca un cambio en el epitelio olfatorio hacia un epitelio de tipo respiratorio (metaplasia), lo cual permite que el epitelio se permeabilice permitiendo la salida de células y proteínas de la lamina propia hacia el lumen, células como polimorfonucleares y proteínas como la IgG y la IgA que podrían estar participando en la eliminación de *N. fowleri*. Finalmente, aunque estos resultados señalan que la IgA podría ser el principal anticuerpo involucrado en la protección contra *N. fowleri*, se requiere de estudios posteriores en los cuales se determine por diferentes técnicas la

producción de citocinas a nivel de los pasajes nasales, puesto que en este sitio fue donde se encontró el mayor incremento de expresión de estas. Además es importante tomar en cuenta otros agregados linfoides como los ganglios cervicales y/o glándulas submandibulares, los cuales podrían tener un papel importante en la inducción de la respuesta inmunológica ante este modelo de infección.

CONCLUSIONES

1. La inmunización i.n. con extractos de *N. fowleri* más CT incrementa la producción de IgA a nivel del epitelio nasal.
2. Se incrementa la expresión del mensajero en los pasajes nasales para algunas citocinas (IL-6, IL-10 y TGF- β) que participan en la producción y secreción de este anticuerpo.
3. Se incrementa la expresión del pigR, receptor que se encarga del transporte de la IgA hacia el lumen del epitelio nasal. Receptor que podría estar participando en el transporte de la IgA de la lámina propia al lumen.
4. La inmunización i.n. provoca un cambio en el epitelio olfatorio hacia un epitelio de tipo respiratorio (metaplasia), lo cual permite que el epitelio se permeabilice permitiendo la salida de polimorfonucleares y anticuerpos IgG e IgA que podrían estar participando en la eliminación de *N. fowleri*.

PERSPECTIVAS

Medir la expresión de los mRNA para las citocinas haciendo una cinética por ratón a tiempos más cortos no solamente en el NALT, si no también considerando otros agregados linfoides como los nódulos cervicales y las glándulas submandibulares que probablemente pudieran tener una participación importante como sitios generadores de la inmunidad ante este modelo. Además, no solamente considerar a los mensajeros si no también medir la producción de las proteínas ya sea analizando en cultivos de linfocitos de la nariz estimulados con el extracto de *N. fowleri* más la toxina del cólera la producción de citocinas. O bien, examinar por inmunohistoquímica con la ayuda de anticuerpos monoclonales, la presencia *in situ* de las citocinas a nivel del epitelio olfatorio. Considerar otros marcadores de expresión para inmunidad innata que probablemente también tengan un papel en la protección contra *N. fowleri*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Arase H., Saito, T., Phillips, J. H., Lanier, L. L.** (2001). Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol.* 167: 1141-4.
- [2] **Balmelli, C., Demotz, S., Acha-Orbea, H., De Grandi, P., Nardelli-Haeffliger, D.** (2002). Trachea, lung, and tracheobronchial lymph nodes are the major sites where antigen-presenting cells are detected after nasal vaccination of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles. *J Virol.* 76: 12596-12602.
- [3] **Bergquist, C., Johansson, E. L., Lagergård, T, Holmgren, J., Rudin A.** (1997). Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun.* 65: 2676-84.
- [4] **Boyaka, P. N., Wright, P. F., Marinaro, M., Kiyono, H., Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Ikizler, R., Werkhaven, J. A., Jackson, R. J., Fujihashi, K., Di Fabio, S., Staats, H. F., McGhee, J. R.** (2000). Human nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissues. Functional analysis of subepithelial and intraepithelial B and T cell from adenoids and tonsils. *Am J Pathol.* 157: 2023-2035.
- [5] **Bush, L. E., John, D. T.** (1988). Intranasal immunization of mice against *Naegleria fowleri*. *J Protozool.* 35: 172-176.
- [6] **Csencsits, K. L., Jutila, M. A., Pascual, D. W.** (1999). Nasal associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naïve lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *J Immunol.* 163: 1382-1389.
- [7] **Czerkinsky, C., Russel, W., Lycke, N., Lindblad, M., Holmgren, J.** (1989). Oral administration of streptococcal antigen coupled to Cholera Toxin B subunit

evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infection and Immunity*. 57: 1072-1077.

- [8] **Ferrante, A., Thong, H.** (1979) Antibody induced capping and endocytosis of surface antigens in *Naegleria fowleri*. *Inter. J Parasitol*. 9:599.
- [9] **Ferrante, A., Hill, N. L., Goh, D. H., Kumaratilake, L.** (1989). Altered neutrophils in mice immune to experimental *Naegleria* amoebic meningoencephalitis. *Immunol. Lett*. 22:301-305.
- [10] **Ferrante, A., Rowan-Kelly, B.** (1988). The role of antibody in immunity against experimental *Naegleria* meningoencephalitis ('amoebic meningitis'). *Immunology* 64:241-244.
- [11] **Ferrante, A.** (1991). Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol*. 13:31-47.
- [12] **Fischer-Stenger, K. Cabral, G. A., Marciano-Cabral, F.** (1990). The interaction of *Naegleria fowleri* amoebae with murine macrophages cell-lines. *J Protozool*. 37:168-174.
- [13] **Fischer-Stenger, K., Cabral, G. A., Marciano-Cabral, F.** (1992). Separation of soluble amoebicidal and tumoricidal activity of activated macrophages. *J Protozool*. 39:235-241.
- [14] **Heritage, P. L., Underdown, B. J., Arsenault, A. L. Snider, D.P., McDermott, M. R.** (1997). Comparison of Murine Nasal-associated Lymphoid Tissue and Peyer's Patches. *Am J Respir Crit Care Med*. 156: 1256-1262.
- [15] **Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi T., Oike, M., Ito, Yasukawa M., Niho, Y.** (1997). Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol*. 82:133-40.

- [16] **Hiroi, T., Iwatani, K., Iijima, H., Kodama, S., Yanagita, M., Kiyono, H.**(1998). Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol.* 28:3346-53.
- [17] **Holbrook, T. W., Boackle, R. J., Parker, B. W., Vesely, J.** (1980). Activation of the alternative complement pathway by *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* 30:58-61.
- [18] **Jarillo-Luna, A., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez-Monroy, M. A., Lara-Padilla, E., Rojas-Hernández, S.** (2008). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol.* 30:31-8.
- [19] **Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J., 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.
- [20] **John, D.T.** (1993). Parasitic protozoa. 2nd edition. Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.
- [21] **Koornstra, P. J., Duijvestijn, A. M., Vlek, L. F., Marres, E. H., van Breda Vriesman, P. J.** (1992). Tonsillar (Waldeyer's ring equivalent) lymphoid tissue in the rat: lymphocyte subset binding to high endothelial venules (HEV) and in situ distribution. *Reg Immunol.* 4:401-408.
- [22] **Koornstra, P. J., de Jong, F. I., Vlek, L. F, Marres, E. H, van Breda, Vriesman, P. J.**(1991). The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol.* 111:591-9.

- [23] **Kraal, G., Samsom, J. N., Mebius, R. E.** (2006). The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunol Rev.* 213:119-30.
- [24] **Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., van Breda Vriesman, P. J., Sminia, T.** (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today.* 13:219-224.
- [25] **Lamm, M. E.** (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 51:311-340.
- [26] **Marciano-Cabral, F., Cabral, G. A.** (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51:243-59
- [27] **Martínez, A. J., Duma, R. J., Nelson, E. C., 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.
- [28] **Martínez, A.J., Visvesvara, G.S.** (1997). Amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7:583-598.
- [29] **McIntyre, T. M., Kehry, M. R., Snapper, C. M.** (1995). Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *J Immunol.* 154:3156-61.
- [30] **Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., Mc Ghee, J. R., Mayer, L.** (2005). Mucosal Immunology. En *Desarrollo de Linfocitos B IgA+*. Strober, W., Fagarasan, S. y Licke, N., ed. Elsevier. San Diego, Ca., pp. 583-616.
- [31] **Michelson, M. K., Henderson, W. R. Jr., Chi, E. Y., Fritsche, T. R., 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.

- [32] **Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagil, H., Afkarian, M., Murphy, T. L.** (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol.* 18:451-494.
- [33] **O'Garra, A.** (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8:275-283.
- [34] **O'Garra, A., Arai, N.** (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 10:542-550.
- [35] **Oh, Y. H., Jeong, S. R., Kim, J. H., Song, K. J., Kim, K., Park, S., Sohn, S., Shin, H. J.** (2005). Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody. *Parasite Immunol.* 27:453-459.
- [36] **Reilly, M. F., White, K.L., Bradley, S. G.,** (1983). Host Resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infec Immun.* 42:645-652.
- [37] **Rengarajan, J., Szabo, S. J., Glimcher, L. H.** (2000). Transcriptional regulation of TH1/TH2 polarization. *Immun Today.* 21:479-483.
- [38] **Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M. A., Lopez-Revilla, R., Resendiz-Albor, A. A., Moreno-Fierros, L.** (2004a). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infec Immun.* 72:4368-4375.
- [39] **Rojas-Hernandez, S., Jarillo-Luna, A., Rodriguez-Monroy, M. A., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodriguez, R.** (2004b). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res.* 94:31-36.

- [40] **Schuster, F.L., Visvesvara, G.S.** (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 34:1001-1027.
- [41] **Shibayama, M., Serrano-Luna, J. J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R., Tsutsumi, V.** (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Can J Microbiol.* 49:164-170.
- [42] **Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jang, M. H., Fukuyama, S., Tamura M., Kubo, T., Ishikawa, H., Kiyono, H.** (2004). IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J Immunol.* 172: 6259-6264.
- [43] **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 Hyg.* 74-570-576.
- [44] **van der Ven, I., Sminia, T.** (1993). The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Reg Immunol.* 5:69-75.
- [45] **Whiteman, L. Y., Marciano-Cabral, F.** (1989). Resistance of highly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae to complement-mediated lysis. *Infec Immun.* 57:3869-3875.
- [46] **Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R. J., Staats, H. F., Fujihashi, K., Burrows, P. D., Elson, C. O., Pillai, S., McGhee, J. R.** (1993). Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med.* 178:1309-20
- [47] **Yanagita, M., Hiroi, T., Kitagaki, N., Hamada, S., Ito, H. O., Shimauchi, H., Murakami, S., Okada, H., Kiyono, H.** (1999). Nasopharyngeal-associated

lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 162:3559-65.

- [48] Zuercher, A. W., Cebra, J. J. (2003).** Structural and functional differences between putative mucosal inductive sites of the rat. *Eur J Immunol.* 32:3191-3196.

