

Las citoquinas en el absceso hepático amebiano: un ejemplo de investigación inmunología en el ámbito clínico

Cytokines in amoebic liver abscess: an example of immunological research within the clinical scope

Cruz Baquero Claudia Andrea PhD¹, Cruz Baquero César Augusto MSc²

Resumen

El propósito de esta revisión es resaltar la importancia de la investigación en el área de la inmunología y su aplicación en el ámbito clínico. En una primera parte se presentan los descubrimientos más importantes que ayudaron a dilucidar los principales procesos fisiológicos involucrados en las enfermedades y de esta manera ayudaron a redireccionar la investigación en el área de la inmunología. Seguido, se describe un ejemplo de investigación básica relacionada con el papel de las citocinas en el absceso hepático amebiano, mostrando el trabajo de varios grupos de investigación en el mundo, con el objetivo de entender la respuesta inmune contra el parásito. Lo anterior nos permite argumentar la relevancia que tiene la investigación inmunológica dentro del contexto clínico.

Palabras claves: inmunología, citoquinas, medicina clínica, absceso hepático amebiano.

Abstract

The purpose of this review is to highlight the importance of research in immunology and its application in the clinical setting. The first part presents the most important discoveries that helped to elucidate the main physiological processes involved in the diseases and in this way helped to redirect research in immunology. Then, we describe an example of basic research related to the role of cytokines in the amoebic liver abscess, showing the work of several research groups in the world, with the aim of understanding the immune response against the parasite. This allows us to argue the relevance of immunological research within the clinical context.

Keywords: immunology, cytokines, clinical medicinal, amoebic liver abscess.

1. Docente investigadora, Grupo de Investigación REMA, Departamento de Bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1041-9609>

2. Licenciado en Biología, Secretaría de Educación del Distrito, Bogotá D.C. Colombia
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8075-1266>

Bogotá, Colombia.

Correspondencia: candreacruz@unicolmayor.edu.co

Recibido: 15/10/2018
Aceptado: 29/12/2018

Introducción

La inmunología es una disciplina biológica que ha tenido avances significativos en lo que va corrido del siglo XXI, evidencia de ello ha sido dejar de ser sólo una actividad médica relacionada con la vacunación y algunas reacciones serológicas, para convertirse en una ciencia interdisciplinaria sustentada por teorías y conceptos, lo cual le ha permitido generar sus propios planteamientos y estrategias para resolver las problemáticas de su campo de acción. De esta forma, la inmunología ahora desempeña un papel clave tanto en la investigación básica como en su aplicación clínica (1).

Los avances en esta ciencia han ayudado a comprender los procesos de generación de varias enfermedades y de esta forma encontrar tratamientos para mejorar la salud de muchas personas alrededor del mundo (2). De hecho, uno de sus aportes más notables ha sido el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, por lo cual recibe el premio Nobel de medicina en 1984 el químico argentino César Milstein. Desarrollos como estos han permitido dilucidar varios procesos inmunológicos, lo cual ha posibilitado, desde finales del siglo XX hasta ahora, el desarrollo de nuevas tecnologías, convirtiendo a la inmunología en una rama independiente de la microbiología y una de las especialidades médicas que más futuro tiene.

En este documento se presentarán algunos aspectos que se deben tener en cuenta para el estudio de la inmunología clínica en la actualidad, además de presentar un ejemplo de la forma como se desarrolla la investigación, particularizando en el papel de las citoquinas

en el absceso hepático. De esta manera se pretende que este escrito suscite interrogantes y reflexiones para avanzar y seguir profundizando en esta importante disciplina científica.

Estado actual de la inmunología

Se comenzará por afirmar que la inmunología ha permitido no solamente desarrollar vacunas sino también tratar las distintas patologías que pueden afectar al sistema inmune (3). De hecho, al estudiar un sinnúmero de variables, esta ciencia se ha convertido en una especialidad tan compleja, que se la suele subdividir en ramas tales como inmunología clásica, clínica, diagnóstica, inmunoterapia e inmunología evolutiva. Ahora bien, resulta necesario aclarar que estas ramas no interviene independientemente una de otra en la práctica clínica, sino que se encuentran en constante interacción.

Con respecto a la inmunología clínica, su principal procedimiento es el inmunodiagnóstico (metodología que utiliza la reacción antígeno-anticuerpo como su principal medio de detección) a partir de técnicas avanzadas y la investigación científica. No obstante, también estudia las enfermedades que se presentan como consecuencia de diversos trastornos en el sistema inmune, los cuales se pueden clasificar en inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes e hipersensibilidades.

Al respecto de las inmunodeficiencias, se trata de enfermedades que disminuyen la eficacia de los componentes inmunitarios, como por ejemplo el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), la enfermedad más co-

nocida que afecta al sistema inmunitario y caracterizada por la pérdida de linfocitos T CD4+ y macrófagos, que son destruidos por el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Un segundo tipo de enfermedades son las que provocan que el sistema inmunitario reconozca a los propios tejidos como extraños y los ataque (enfermedades autoinmunes) (4); de estas, las más comunes son la diabetes tipo 1, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoidea, la anemia perniciosa, la esclerosis múltiple, la tiroiditis de Hashimoto y la esclerodermia, entre otras. Finalmente, están las enfermedades en las que la respuesta del sistema inmune es exagerada (hipersensibilidad), entre ellas encontramos las alergias y el asma.

Otro aspecto importante que estudian los inmunólogos clínicos es buscar la forma de prevenir el rechazo a trasplantes, puesto que el sistema inmunitario destruye antígenos extraños, mediante el reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (5). En este caso, el laboratorio clínico, con los avances recientes en tecnología, juega un papel importante en el cuidado del paciente al proporcionar resultados oportunos, precisos y confiables de la prueba. Tales resultados son utilizados por los miembros del equipo médico para hacer el diagnóstico, tratamiento y tomar las decisiones adecuadas de monitoreo.

Con respecto al desgaste de las funciones inmunológicas, la autoinmunidad y la infección, se ha determinado que son factores que subyacen a muchas enfermedades de la vejez, probablemente se lograría un control importante de dichas enfermedades mediante manipulaciones inmunológicas. Ejemplo de esto es alterando de forma activa el proceso inmune

gracias al desarrollo de la inmunofarmacología, y así ser capaces de aliviar al paciente alérgico. En otras palabras, vislumbra la posibilidad de inmunizar contra la inmunidad no deseada.

El estudio de las citoquinas como ejemplo de investigación

El término “citoquina” define un numeroso grupo de proteínas pequeñas no estructurales que están involucradas en la señalización celular. Se incluyen en la familia de las citoquinas: interleucinas (IL), interferones (IFN), quimiocinas, linfoquinas y factores de necrosis tumoral (TNF). Las citoquinas se producen generalmente en cascadas y actúan en secuencia, como parte de una red coordinada compleja; aunque su producción se regula cuidadosamente, tanto intracelularmente como extracelularmente. Este proceso está dirigido a que las citoquinas actúen sobre las células diana uniéndose a receptores específicos y desencadenando así rutas de transducción de señales dentro de la célula, lo cual demuestra su importante papel en el sistema inmune al regular tanto la intensidad como la duración de la respuesta inmune.

Hasta ahora, se ha descrito varias citoquinas, entre ellas el grupo de IL-1 a IL-38, lo cual ha possibilitado que las citoquinas se puedan dividir en dos grupos, de acuerdo con su función: citoquinas pro y antiinflamatorias. Las citoquinas proinflamatorias son las que favorecen la inflamación, siendo las principales responsables de las respuestas tempranas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Por el contrario, las citoquinas antiinflamatorias contrarrestan

diversos aspectos de la inflamación, incluida la producción de citoquinas proinflamatorias; aunque, algunas citoquinas pueden tener actividades pro y antiinflamatorias, dependiendo de la situación. El equilibrio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias determina el efecto neto de una respuesta inflamatoria, y una homeostasis alterada de las citoquinas deshabilita la función apropiada del sistema inmune. Esta dinámica hace posible que algunos parásitos puedan manipular la respuesta inmune para poder invadir y multiplicarse en el huésped, como es el caso del absceso hepático amebiano (AHA) en el cual los trofozoítos de *E. histolytica* pueden burlar la respuesta inmune e invadir el epitelio hepático. Estos procesos han sido objeto de investigación mediante estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, para analizar el papel de las citoquinas y otros componentes inmunes del huésped frente al parásito por medio de pruebas inmunodiagnósticas.

El absceso hepático amebiano (AHA) es una enfermedad mortal en la cual el parásito *Entamoeba histolytica* es capaz de diseminarse desde la pared intestinal a otros órganos como el hígado, donde produce citólisis de los hepatocitos y necrosis. Aunque se han desarrollado y probado varios modelos animales, ninguno de ellos ha proporcionado una explicación completa de los mecanismos inmunológicos que participan en la invasión y el establecimiento del parásito, aunque se ha obtenido bastante información sobre la complejidad de este microorganismo y la enfermedad que produce.

A pesar de que el ciclo de vida de la *E. histolytica* no se ha podido reproducir en modelos animales, se ha observado que hámsteres

con AHA no tratados mueren (6). De hecho, se ha descrito que la inoculación con *E. histolytica* induce, en estos animales, un infiltrado inflamatorio rápido, principalmente compuesto por neutrófilos, los que rodean los trofozoítos y los aíslan del parénquima hepático; después, hay una lisis significativa de neutrófilos, responsable en parte del daño parenquimatoso durante la evolución de AHA. Como resultado, esta patogenia conduce a más del 90% de mortalidad en hámsteres (7, 8). No obstante, en los seres humanos se ha observado una regeneración del hígado después de un tratamiento exitoso, probablemente por las características inflamatorias específicas (9).

Estudios *in vitro* previos con *E. histolytica* han demostrado que las moléculas amebianas inducen la secreción y expresión de citoquinas por leucocitos mononucleares y células epiteliales intestinales (9-14). La respuesta Th1 estaría implicada en la inmunidad protectora contra la amebiasis invasora (15). Por consiguiente, *E. histolytica* podría manipular la respuesta inmune hacia Th1 favoreciendo la invasión en el tejido (16). De igual manera, los estudios *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de ratón-humano SCID intestinal indicaron que IL-1b e IL-8 se produjeron por el injerto en respuesta a la infección por *E. histolytica* (17, 18, 19). En contraste, los niveles de expresión de IL-4, IL-10 y TGF- β son significativamente más altos en humanos con síntomas de amebiasis (intestinal o AHA) en comparación con controles sanos. Por otra parte, los pacientes que no presentan síntomas, pero que están infectados con *Entamoeba sp.* no mostraron diferencias en los niveles de citoquinas en comparación con el grupo control. Estas citoquinas (IL-4, IL-10

y TGF- β) podrían suprimir las respuestas inmunitarias celulares, lo que daría lugar a una infección sintomática (20).

Se ha demostrado que los linfocitos aislados de pacientes tratados con AHA expuestos al antígeno de *E. histolytica* pueden producir IFN- γ *in vitro* (21). En modelos animales de AHA, las lesiones hepáticas pueden ser provocadas por la inoculación directa de trofozoítos en el hígado de conejos, hámsteres o jerbos (22). La lectina *E. histolytica* Gal/GalNAc puede estimular la producción de TNF- α en macrófagos de médula ósea murina preparada con IFN- γ (23). Recientes estudios *in vitro* demostraron que el ADN genómico de *E. histolytica* estimula la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264 \AA 7 y aumenta los niveles de ARNm de TNF- α y la producción de proteína (24). Además, se ha informado que las células cultivadas del epitelio intestinal humano HT29 pueden producir IL-8 al entrar en contacto con el parásito y la lectina (25).

Estudios inmunohistoquímicos mostraron que, durante la evolución de AHA en hámsteres, los trofozoítos fueron capaces de inducir una importante respuesta inflamatoria compuesta de PMN y leucocitos mononucleares. Este hallazgo implicó aumentar gradualmente la expresión de TNF- α , IFN- γ , IL-8 e IL-1 β durante las primeras etapas del desarrollo de AHA, que posteriormente disminuyó lentamente a niveles basales en la etapa crónica de la infección. Además, se observó que los hepatocitos en el parénquima hepático que rodeaban los focos inflamatorios se indujeron a expresar TNF- α e IL-8 durante el desarrollo de AHA (26). La expresión de la citoquina reguladora IL-10 se produjo muy temprano después de la infección y alteró su patrón de

expresión en un período de tiempo muy estrecho. Esta rápida desactivación de la expresión de IL-10 es muy sugestiva de una posible supresión mediada por parásitos de la respuesta inmune reguladora a través de factores de virulencia amebiana (27, 28, 29, 30).

Durante la amebiasis, la supresión de las respuestas linfoproliferativas (tanto las células T y B) como la producción de citoquinas parecen ser sistémicas. En gerbos, el día 20 de AHA (fase aguda), los niveles de IL-2 parecen disminuir significativamente cuando se estimulan las células del bazo con Con A, en comparación con los controles no infectados. Dado que la IL-2 desempeña un papel en la activación y proliferación de las células T, la supresión de esta producción de citoquinas puede contribuir al establecimiento de la infección (31). Además, linfocitos T humanos aislados de pacientes curados farmacológicamente de amebiasis liberan IL-2 e IFN- γ cuando se expone a la lectina amebiana (32).

Aunque la inmunidad innata y adquirida se consideraba clásicamente entidades autónomas, los avances recientes en la comprensión de la señalización de los receptores Toll-like, identificaron la función de las citoquinas y la activación del complemento en una red de reguladores que dirigen el cambio de la inmunidad innata a la adquirida (33). Uno de esos factores es la citoquina inflamatoria IL-6, que a través del control diferencial del reclutamiento de leucocitos, la activación y la apoptosis, ha sido reconocida recientemente como un regulador de este interruptor inmunológico.

La generación de ratones 'knock-out' IL-6 (KO) en 1994 brindó una oportunidad úni-

ca para probar directamente las funciones de IL-6 *in vivo* (34). Los ratones con deficiencia de IL-6 se desarrollaron normalmente pero no controlaron las infecciones microbianas y fueron defectuosos en la producción de anticuerpos dependientes de células T (35, 36). Los ratones con deficiencia de IL-6 también se vieron comprometidos en sus respuestas de fase aguda a la lesión tisular (37). Una serie de estudios *in vivo* indicó que la IL-6 influye en la polarización de las células T (38, 39, 40). Sin embargo, IL-6 no actúa universalmente para la inducción de una respuesta de tipo Th1 o Th2. La interleucina 6 puede favorecer la producción de IL-2 y promover el desarrollo de una colitis murina mediada por células Th1 (41). Pero también se sabe que IL-6 suprime la polarización de las células T mediada por IL-12 y dirige la diferenciación de Th2 de las células T vírgenes en las células secretoras de IL-4 (42).

A lo largo de los años, a la IL-6 se le han asignado características pro y antiinflamatorias (43, 44). IL-6 podría definirse como un factor de resolución que equilibra las respuestas inmunológicas pro- y antiinflamatorias debido a su capacidad de orquestar la transición de la inmunidad innata a la adquirida. El control apropiado de este cambio inmunológico es esencial para la resolución exitosa de cualquier episodio inflamatorio, y la actividad de IL-6 parece ser crítica en el manejo efectivo de la inflamación aguda (45, 46, 47, 48).

Se identificaron bajos niveles de IL-6 en fluidos sobrenadantes de linfocitos activados expuestos a lectina de adhesión a membrana de *E. histolytica* de 220 kDa de mestizos mexicanos adultos sanos que se habían recuperado mucho antes de AHA, en comparación con

controles sanos. Además, los niveles de IL-5, IFN- γ y TNF- α también fueron más bajos en los pacientes, pero los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 fueron similares en ambos grupos (49). Por lo tanto, una producción de citoquina IL-6 regulada negativamente puede potenciar el desarrollo de AHA (50). Por otra parte, se ha observado el papel supresor de la IL-10 en la amebiasis, al estudiar células mononucleares periféricas aisladas de sujetos sintomáticos que expresaban altos niveles de IL-10 (51).

Los hepatocitos también pueden contribuir a la producción de citoquinas quimiotácticas que reclutan células inflamatorias en los sitios de infección hepática, formando un entorno inflamatorio exacerbado que puede facilitar el daño al tejido hepático y el desarrollo de AHA, en lugar de eliminar los trofozoítos. Los resultados obtenidos por el grupo de Pacheco-Yépez (26) sugieren que existe una correlación *in vivo* entre la expresión de citoquinas inflamatorias y la progresión de la amebiasis invasiva y que la ausencia de expresión TH2 reguladora/supresora de citoquinas, un factor importante que inhibe las moléculas proinflamatorias, puede conducir a un estado inflamatorio persistente que a su vez produciría extenso daño tisular en el hígado.

El papel de estas citoquinas en el patógeno de los abscesos hepáticos amebianos necesita más investigación, particularmente para buscar otros factores de crecimiento, como TGF- β , HGF e IGF, y citoquinas reguladoras para elucidar sus roles durante las etapas crónicas del desarrollo de AHA. Varios estudios han demostrado la importancia de los neutrófilos en la respuesta innata contra la invasión de *E. histolytica* (52). Los neutrófilos activados proporcionan señales para la activación y

maduración de los macrófagos, que a su vez liberan IL-1b, TNF-a, G-CSF y GM-CSF, de tal forma que estas citoquinas extienden la vida útil de los neutrófilos en los sitios de inflamación.

La interacción de lipopéptido fosfoglicano (LPPG) con TLR-2 y TLR-4 da como resultado la activación de NF-kappa B y la liberación de IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF-a de macrófagos humanos. Los neutrófilos activados aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activan NF-kB y aumentan degranulación de neutrófilos. Los gránulos primarios contienen mieloperoxidasa (MPO), defensinas, lisozima, proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI), neutrófilo elastasa (NE), proteinasa 3 (PR3) y catepsina G (CG). Los gránulos se-

cundarios se caracterizan por la presencia de lactoferrina, neutrófilo lipocalina asociada a gelatinasa (NGAL), proteína antimicrobiana catiónica humana 18 o cathelin (hCAP-18) y lisozima. MPO puede unirse a monocitos, que pueden conducir a la producción de ROS y citoquinas proinflamatorias (53, 54).

Estudios realizados por el grupo de Pacheco-Yepez han sugerido un papel importante de la MPO en la respuesta inmune contra trofozoítos de *E. histolytica* en modelos de AHA. Por un lado, en el modelo de resistencia (ratones Balb/c) se observó un aumento de actividad y expresión génica de MPO a diferencia del modelo de susceptibilidad (hámster) en el que se observa ausencia de la actividad y expresión génica de la enzima (55).

Tabla 1. Descripción de los modelos experimentales empleados en el estudio de las citoquinas en el absceso hepático amebiano.

MODELO EXPERIMENTAL	AUMENTO CITOQUINAS	DISMINUCION CITOQUINAS	REF
Xenoinjerto de ratón-humano SCID intestinal	IL-1b e IL-8		17, 18, 19
Humanos con síntomas de amebiasis (intestinal o AHA)	IL-4, IL-10 y TGF- β (suprimen la respuesta inmune celular)		20
Linfocitos aislados de pacientes tratados con AHA expuestos al antígeno de <i>E. histolytica</i>	IFN-c in vitro		21
Macrófagos de médula ósea murina preparada con IFN-c, estimuladas con lectina <i>E. histolytica</i> Gal / GalNAc	TNF- α		23
Línea celular de macrófagos de ratón RAW 264Æ7 estimulado con ADN genómico de <i>E. histolytica</i>	Niveles de ARNm de TNF- α y la producción de proteína		24
Células cultivadas del epitelio intestinal humano HT29 estimuladas con el parásito y la lectina	IL-8		25
Evolución del absceso hepático amebiano en hámster	Primeras etapas TNF- α , IFN-c, IL-8 e IL-1b	Etapa crónica TNF- α , IFN-c, IL-8 e IL-1b	26
Hepatocitos en los focos inflamatorios durante el AHA en Hamster	TNF- α e IL-8		26
Durante el AHA en hamster	IL-10 se produjo muy temprano	Rápida inactivación IL-10	27, 28, 29, 30

MODELO EXPERIMENTAL	AUMENTO CITOQUINAS	DISMINUCION CITOQUINAS	REF
AHA en jerbos día 20 de la infección, se toman células de bazo y estimula con CoA		IL-2	31
Linfocitos T humanos aislados de pacientes curados con tratamiento, estimulados con lectina amebiana	IL-2 e IFN- γ		32
Sobrenadantes de linfocitos de humano con antecedentes de amibiasis, estimulados con lectina amebiana		IL-6 IL-5, IFN- γ y TNF- α	49
Mononucleares de pacientes sintomáticos de amibiasis	IL-10		51
Macrófagos humanos con amibiasis activados con lipopéptido fosfoglicano	IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α		53, 54

Fuente. Elaboración propia.

Como se puede evidenciar, se han realizado varios estudios para determinar el papel de las citoquinas en el AHA tanto *in vitro* como *in vivo* (modelos animales experimentales). Aunque no se ha dilucidado la forma en que la *E. histolytica* manipula la respuesta inmune, los experimentos realizados con pruebas inmunodiagnósticas han producido nuevos conocimientos que fortalecen los conocimientos de la inmunología como ciencia básica y permiten desarrollar nuevas e innovadoras investigaciones en este campo.

No es fácil predecir el futuro, pero el ritmo de avance y acumulación de conocimientos básicos de la inmunología garantiza el advenimiento de novedades casi increíbles, ante las cuales quedarán anticuadas muchas fases de la práctica clínica actual (56-58). Dentro de lo previsible, se supone que será posible trasplantar prácticamente cualquier órgano con un porcentaje elevado de éxitos, corregir la mayoría del tipo de inmunodeficiencias ya sean heredados o adquiridos. Estaremos en condiciones de potenciar la resistencia a la infección, así como de tratar y prevenir gran parte de las infecciones que son resistentes a la antibioterapia. Tendríamos en un futuro

la certeza de diagnosticar el cáncer con más prontitud y precisión por métodos inmunológicos. Se llegará quizás a tratar con eficacia formas de cáncer utilizando varias clases de inmunoterapias, cirugía y quimioterapia, y se podrá manipular la respuesta inmune para prevenir algunas enfermedades (59).

Confiamos enormemente en que la mayoría de estas predicciones, si no la mayoría, se cumplirán en este nuevo siglo gracias a la aplicación de los nuevos hallazgos de la investigación básica y aplicada.

Referencias

1. Cohn M 1. Learning from a contemporary history of immunology. *Immunologic Research*. June 2017, Volume 65, Issue 3, pp 573–591.
2. Sofia MA, Rubin DT . The Impact of Therapeutic Antibodies on the Management of Digestive Diseases: History, Current Practice, and Future Directions. *Dig Dis Sci*. 2017 Apr;62(4):833-842. doi: 10.1007/s10620-017-4479-0.
3. Dustin ML, Baldari CT . The Immune Synapse: Past, Present, and Future. *Methods Mol Biol*. 2017; 1584:1-5. doi: 10.1007/978-1-4939-6881-7_1.
4. Ishii M. Immunology proves a great success for trea-

- ting systemic autoimmune diseases - a perspective on immunopharmacology: IUPHAR Review 23. *Br J Pharmacol.* 2017 Jul;174(13):1875-1880. doi: 10.1111/bph.13784. Epub 2017 Apr 24.
5. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev (Orlando).* 2017 Jan;31(1):10-17. doi: 10.1016/j.trre.2016.10.006. Epub 2016 Oct 11.
 6. Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res* 2006; 37: 210 – 220 (Review).
 7. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; 117: 81– 91
 8. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; 130: 112 –119.
 9. Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica*. In Cohen S, Warren K (eds): *Immunology of Parasitic Diseases*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1982: 170 –191.
 10. Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 1995; 96(3): 1269–1279.
 11. Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of alactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun* 1997; 65(7): 2522–2527.
 12. Sharma M, Bhasin D, Vohra H. Differential induction of immunoregulatory circuits of phagocytic cells by Gal / Gal NAc lectin from pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*. *Clin Immunol* 2008; 28(5): 542–557.
 13. Sharma M, Vohra H, Bhasin D. Enhanced pro-inflammatory chemokine / cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology* 2005; 131(Pt 6): 783–796.
 14. Sierra-Puente RE, Campos-Rodriguez R, Jarillo-Luna RA, et al. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol* 2009; 31(7): 384– 391.
 15. Kretschmer RR, López-Osuna M. Effector mechanisms and immunity to amebas. In Kretschmer R (ed.): *Amebiasis: Infection and Disease by E. Histolytica*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1990: 105 –122.
 16. Murray JS. How the MCM selects Th1/Th2 immunity. *Immunol Today* 1998; 19: 157 –163)
 17. Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun* 2000; 68(1): 400–402.
 18. Seydel KB, Zhang T, Stanley SL Jr. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997; 65(9): 3951–3953
 19. Seydel KB, Li E, Swanson PE , Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xeno-graft model of amebiasis. *Infect Immun* 1997; 65(5): 1631– 1639.
 20. Bansal D, Sehgal R, Charla Y, Malla N, Majan C. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol* 2005; 27: 37 – 43.
 21. Salata RA, Murray HW, Rubin BY, Ravdin JI. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37(1): 72–78.
 22. Lotter J, Gaworski I, Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 2006; 74: 118 –124.

23. Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. The tumor necrosis factor alpha- stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun* 1997; 65(7): 2522–2527.
24. Ivory CP, Prystajecy M, Jobin C, Chadee K. Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA. *Infect Immun* 2008; 76(1): 289–297.
25. Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* 1995; 96(3): 1269–1279.
26. J. Pacheco-Yépez, J. M. Galván-Moroyoqui, I. Meza, V. Tsutsumi & M. Shibayama. Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. *Parasite Immunology*, 2011, 33, 56–64.
27. Blazquez S, Rigotherier MC, Huerre M, Guillen N. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose / N-acetyl-D-galactosamine lectin. *Int J Parasitol* 2007; 37(3–4): 425–433.
28. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Anti-sense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 1999; 34(3): 463–472
29. Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Ali V, Nozaki T. A retromer-like complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* 2005;16(11): 5294–5303.
30. Pacheco J, Shibayama M, Campos R, et al. In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal / GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol Int* 2004; 53(1): 35–47.
31. Campbell D, Gaucher D, Chadee K. Serum from *Entamoeba histolytica* infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. *J Infect Dis* 1999; 179: 1495–1501.
32. Schain DC, Salata RA, Ravdin JI. Human T-lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactose-inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1992; 60(5): 2143–2146.
33. Hoebe K, Janssen Beutler B. The interface between innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2004; 10: 971–974.
34. Kopf M, Gros G, Coyle A, Kosco-Vilbois M, Brombacher F. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6- deficient mice. *Immunol Rev* 1995; 148: 45 – 69.
35. Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Luciano LA, Murray R. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1996; 64: 3231–3235.
36. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 1994; 264: 561–563.
37. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, et al. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180: 1243–1250.
38. Romani L, Mencacci A, Cenci E, et al. Impaired neutrophil response and CD4 + T- helper cell-1 development in interleukin-6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 1996; 183: 1345–1355.
39. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell M. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4 + T-cells. *J Exp Med* 1997; 185: 461–469.
40. La Flamme AC, Pearce EJ. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression,

- and B-cell responses. *J Immunol* 1999; 162: 5829 – 5837
41. Yamamoto I, Yoshizaki K, Kishimoto T; Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* 2000; 164: 4878 – 4882.
 42. Wang J, Homer RJ, Chen Q; Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibits aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 4051–4061.
 43. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311–320 31.
 44. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA; Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83: 113 – 118.
 45. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, et al. Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001; 14: 705–714.
 46. Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide gAHActosamine septic shock model. *Infect Immun* 1993; 61: 1496 –1499.
 47. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D; del Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines: interleukin-6 and transforming growth factor β inhibit acute inflammation. *Am J Pathol* 1991; 138: 1097 –1101.
 48. Onogawa T. Local delivery of soluble interleukin-6 receptors to improve the outcome of α -toxin producing *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Immunobiology* 209: 651– 660.
 49. Bekker C, Arellano J, Talamas P, Kretschmer R, Perez-Rodriguez ME. Amebic lectin stimulation of lymphocytes of Mexican Mestizos recovered from amebic abscess of the liver induces decreased production of IL5 and IL6. *Arch of Med Res* 2000; 31 (4 Suppl.): S96 – S97.
 50. Bekker-Mendez VC, Perez-Castillo VL, Rico-Rosillo MG, et al. Downregulation of selected cytokines in amoebiasis. *Arch Med Res* 2006; 37: 556 – 558.
 51. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol* 2005; 27(1–2): 37–43.
 52. Campos-Rodriguez R, Gutierrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Drago-Serrano ME, Abarca-Rojano E, Ventura-Juarez J, Cardenas-Jaramillo, LM, Pacheco-Yepe, J. 2016. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite*. 23 (6).
 53. Choi MH, Sajed D, Poole L, Hirata K, Herdman S, Torian BE, Reed SL. 2005. An unusual surface peroxidase protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(1), 80–89.
 54. Tseng CW, Liu GY. 2014. Expanding roles of neutrophils in aging hosts. *Current Opinion in Immunology*, 29C, 43–48.
 55. Cruz-Baquero A, Cárdenas Jarmillo LM, Gutiérrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R, Rivera-Aguilar V, Milliar-García A, Pacheco-Yepe J. Different behavior of myeloperoxidase in two rodent amoebic liver abscess models. *Plos One*. Aug 10;12(8). (2017)
 56. Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L., Cortés, S. Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *NOVA*. 2016; 14 (26): 95-111
 57. Ospino, K., Castilla, M., Sánchez, R. Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. *NOVA*. 2018; 16 (29): 91-100
 58. Pinilla, G., Bautista, A., Cruz, C., Chavarro, B., Navarrete, J., Muñoz, L., Gutiérrez, J. Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de

biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. NOVA. 2017; 15 (27): 67 - 75

59. Boegemann M, Aydin AM, Bagrodia A , Krabbe LM . Prospects and progress of immunotherapy for bladder cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2017 Nov;17(11):1417-1431. doi: 10.1080/14712598.2017.1366445. Epub 2017 Aug 23.