

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE VETERINÀRIA**  
**DEPARTAMENT DE SANITAT I ANATOMIA ANIMALS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE  
ADHESIÓN ENDOTELIAL DURANTE LA LISTERIOSIS MURINA  
EXPERIMENTAL. IMPORTANCIA DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL  
DESARROLLO DE LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

**Santiago López**

**Memòria presentada per  
optar al grau de Doctor en  
Veterinària**

**Bellaterra, 2003**

Alberto Jesús Marco Valle, professor titular del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la tesi doctoral titulada “CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ENDOTELIAL DURANTE LA LISTERIOSIS MURINA EXPERIMENTAL. IMPORTANCIA DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL DESARROLLO DE LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL”, de la que és autor el llicenciat en Veterinària Santiago López, s’ha realitzat als laboratoris de la Unitat d’Histologia i Anatomia Patològica de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la meva direcció.

I perquè així consti, a tots els efectes, firmo el present certificat a Bellaterra

Decembre del 2002

Alberto Jesús Marco Valle

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Listeriosis murina experimental.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Listeria monocytogenes.....	9
1.1.2. Curso de la infección.....	9
1.1.1. Caracterización microbiológica de la infección.....	10
1.1.2. Caracterización histopatológica.....	11
1.1.3. Lesiones nerviosas.....	12
1.1.3. Inmunidad contra la infección.....	15
1.1.4. Inmunidad inespecífica.....	15
1.1.5. Inmunidad específica.....	20
<b>1.2. Inflamación y moléculas de adhesión celular.....</b>	<b>22</b>
1.2.1. El proceso de reclutamiento celular.....	23
1.2.1.1. Fase de adhesión transitoria o fenómeno de “rolling”.....	23
1.2.1.2. Fase de activación leucocitaria y adhesión firme.....	25
1.2.2. Expresión en modelos de inflamación.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Agradecimientos.....</b>	<b>91</b>

## ***1. INTRODUCCIÓN***

### **1.1. Listeriosis murina experimental**

La listeriosis murina experimental es y ha sido un modelo de infección ampliamente utilizado en el estudio de la inmunidad celular, especialmente la dirigida contra patógenos microbianos intracelulares.

En los años 60, Mackaness caracteriza el curso de la infección de la listeriosis murina experimental por vía intravenosa y demuestra por primera vez la existencia de una inmunidad mediada por células (Mackaness, 1962, 1964, 1968). A partir de los estudios pioneros de Mackaness y gracias a las características propias del modelo (listeria crece fácilmente en medios de cultivo comunes, causa infecciones experimentales reproducibles y fácilmente cuantificables y no conlleva un riesgo excepcional para los manipuladores) la listeriosis murina experimental se convierte en uno de los modelos animales más utilizados para el estudio de los mecanismos de defensa del organismo contra los patógenos intracelulares facultativos (Kaufmann, 1988; Czuprynski y Haak-Frendscho, 1997; Edelson y Unanue, 2000).

La utilización de la listeriosis murina como modelo experimental, ha contribuido de forma importante no solo al concepto de que la inmunidad mediada por células T es un componente esencial de la resistencia del organismo a las infecciones intracelulares, sino también al estudio de las complejas interacciones entre la inmunidad específica (adquirida) e inespecífica (innata) en el establecimiento de una inmunidad eficaz contra las infecciones bacterianas.

Finalmente, y en parte debido al notable aumento en los últimos años de casos de listeriosis sistémica en la especie humana que han afectado, especialmente a individuos aparentemente inmunocompetentes, la utilización de la listeriosis murina experimental como modelo para el estudio de la enfermedad en esta especie se ha visto incrementado. No obstante, si bien existen numerosos datos relativos al establecimiento de una inmunidad eficaz contra la infección, aspectos como la vía de entrada al organismo, dosis infectiva y patogenia de las lesiones nerviosas durante la listeriosis humana no han sido completamente elucidados.

### **1.1.1. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram-positivo, anaerobio facultativo, no esporulado, catalasa positivo, oxidasa negativo que crece fácilmente en agar sangre produciendo  $\beta$ -hemólisis incompleta (Gray y Killinger, 1966; Farber y Peterkin, 1991). Posee un flagelo polar y es móvil a temperatura de 25°C. Aunque su crecimiento es óptimo entre 30-37°C, es capaz de multiplicarse a temperatura de refrigeración (4-10°C), cualidad que permite su separación de otros contaminantes mediante el cultivo prolongado a esta temperatura (técnica de enriquecimiento en frío). Aunque *Listeria monocytogenes* crece bien en medios de cultivo comunes (Gray y Killinger, 1966), se han desarrollado también medios selectivos para su aislamiento a partir de especímenes clínicos (Schuchat y col, 1991). En estos especímenes, *L. monocytogenes* puede adoptar aspecto de coco, diplococo o difterioide y ser variable a la tinción de Gram.

El género *Listeria* comprende siete especies diferentes: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi* and *L. murray* (Seeliger y Jones, 1986; Rocourt y col 1992), de las cuales *L. monocytogenes* es el principal patógeno. *L. ivanovii*, aunque ha sido aislada en casos de listeriosis en la especie humana, es principalmente patógeno en animales. De acuerdo con los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), existen dieciséis serovares de *L. monocytogenes*, de las cuales los tipos 4b, 1/2a y 1/2b son los más frecuentemente detectados en los aislamientos clínicos (Gellin y Broome, 1989).

### **1.1.2. *Curso de la infección***

El curso de la listeriosis murina experimental ha sido clásicamente caracterizado gracias al estudio microbiológico e histopatológico del bazo e hígado, órganos diana de la infección listérica. Aunque la infección por vía intravenosa ha sido la vía más ampliamente utilizada en la caracterización de la infección, otras vías como la intraperitoneal, subcutánea, oral e intragástrica también han sido utilizadas.

### **1.1.1. Caracterización microbiológica de la infección**

Tras la inoculación intravenosa de *L. monocytogenes*, aproximadamente el 60-90 % del inóculo es rápidamente eliminado de la circulación por las células de Kupffer en el hígado donde la mayoría de las bacterias son inactivadas (Mackaness, 1962; Lepay y col, 1985). El 10-40% restante es captado principalmente por macrófagos esplénicos situados en la zona marginal de la pulpa blanca del bazo y en menor medida por células pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico presentes en la pulpa roja (Conlan, 1996). Durante las 2-4 horas siguientes, el inóculo inicial es reducido aproximadamente al 50% en ambos órganos. Tanto en el bazo como en el hígado, las listerias que sobreviven a esta primera barrera de defensa proliferan de forma exponencial, provocando una infección progresiva del parénquima hepático y esplénico alcanzando el máximo entre los tres y cuatro días post-infección (d.p.i). Es a partir de este momento cuando los recuentos de listerias comienzan a disminuir progresivamente hasta desaparecer alrededor del 10<sup>o</sup> d.p.i. (Mackaness, 1962; Lepay y col, 1985).

Cuando la vía subcutánea es utilizada, el curso de la infección es similar al de la vía intravenosa aunque está ligeramente retardado. Tras la inoculación, *Listeria monocytogenes* se disemina rápidamente desde el lugar de inoculación a los linfonodos regionales y de allí al hígado y el bazo. El máximo de multiplicación bacteriana en los órganos diana ocurre entre el 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> d.p.i. y disminuyen progresivamente siendo casi inexistentes el 9<sup>o</sup> d.p.i. (Marco y col., 1991; Prats y col., 1992).

Tras la inoculación oral o intragástrica, *Listeria monocytogenes* invade el epitelio intestinal y/o las placas de Peyer, se disemina a los ganglios linfáticos regionales y posteriormente vía la circulación, al hígado y bazo (Czuprynski y Haak-Frendscho, 1997; Marco y col, 1997). *Listeria* es detectada en pequeñas cantidades en el bazo y en el hígado a las 24 y 48 horas post-infección (h.p.i.) respectivamente. Tras un ligero aumento, los recuentos descienden gradualmente, desapareciendo del hígado el 6<sup>o</sup> d.p.i. y del bazo el 5<sup>o</sup> d.p.i. (Marco y col., 1992; Marco y col, 1997).

### **1.1.2. Caracterización histopatológica**

Las primeras lesiones tras la infección por la vía intravenosa son visibles 24 h.p.i. En el hígado, estas lesiones consisten en pequeños acúmulos de células inflamatorias compuestos principalmente por neutrófilos (PMNN) y, en menor número, por macrófagos. Las listerias son poco o raramente visibles en este estadio de la infección. A 48 h.p.i., las lesiones son de mayor tamaño y los PMNN en el centro son rodeados por varias capas de macrófagos asociados a la presencia de numerosas listerias. A 72 h.p.i., los PMNN en el centro de la lesión aparecen picnóticos, acompañados de gran cantidad de restos celulares y la presencia de macrófagos es más numerosa. En el cuarto d.p.i., los PMNN han prácticamente desaparecido, la inflamación pasa a ser puramente granulomatosa y se observan gran cantidad de figuras mitóticas. Posteriormente, durante los días quinto y sexto post-infección, los focos de inflamación aparecen de forma más dispersa y las listerias son ya difícilmente visibles (Mackaness, 1962).

En el bazo, tras una infección por vía intravenosa o intraperitoneal, las primeras lesiones son ya visibles a 6-12 h.p.i. y consisten en pequeños acúmulos de PMNN en la zona marginal de la pulpa blanca y en la pulpa roja (Marco y col, 1991; Conlan, 1996). Gracias a la utilización de técnicas inmunocitoquímicas (Domingo y col, 1986), *Listeria monocytogenes* es detectada en el citoplasma de células fagocíticas en la zona marginal de la pulpa blanca (Marco y col, 1991).

A 24 h.p.i., los infiltrados de PMNN son más extensos y afectan también a la pulpa blanca. Las listerias son visibles tanto en el interior de los microabscesos como en zonas sin inflamación aparente. Posteriormente los folículos linfoides aparecen deplecionados e infiltrados masivamente por PMNN. Este infiltrado inflamatorio se extiende tanto a la pulpa blanca como a la pulpa roja y adquiere un carácter piogranulomatoso o necrotizante con la presencia de trombosis. Es a partir del 4<sup>o</sup> d.p.i cuando, tras una infección subletal, las lesiones son menos prominentes y las listerias son raramente visibles, posiblemente un reflejo del comienzo de la superación de la infección en el bazo (Mackaness, 1962; Marco y col 1991; Conlan, 1996). En este estadio de la infección se observa una gran actividad mitótica y una proliferación de folículos secundarios prominentes (Marco y col, 1991).

Mediante la utilización de la vía i.p y s.c, se ha observado la presencia de una infección generalizada de los linfonodos produciendo una linfadenitis piogranulomatosa y/o necrotizante acompañada de una intensa depleción linfoide. La reacción inflamatoria se localiza tanto en el córtex interfolicular como en el paracórtex, especialmente alrededor de las vénulas de endotelio alto. En los animales que no resisten la infección estas lesiones progresan hacia una linfadenitis necrotizante. La distribución de las lesiones es diferente en los ganglios linfáticos que drenan el lugar de inoculación. En este caso las lesiones son localizadas principalmente en los senos subcapsulares y medulares reflejando el carácter aferente de la infección. Las lesiones en los ganglios linfáticos desaparecen alrededor del 6 d.p.i acompañados de una prominente actividad regenerativa de este órgano (Marco y col, 1991).

Las lesiones observadas tras la inoculación por vía subcutánea son similares a las producidas tras la inoculación peritoneal e intravenosa pero difieren en intensidad y distribución. Además, de la misma manera que los recuentos bacterianos, la aparición de las lesiones esta también ligeramente retardada.

Tras la infección, *Listeria* se disemina rápidamente a los ganglios linfáticos que drenan la zona de inoculación. Posteriormente, macrófagos infectados con listerias diseminan la infección por vía hematógena al bazo y al hígado, resultando de ello un cuadro lesional equivalente a la vía intravenosa e intraperitoneal (Marco y col, 1991).

### **1.1.3. Lesiones nerviosas**

El sistema nervioso central es un órgano comúnmente afectado durante el curso de la listeriosis en la especie humana, siendo responsable de la alta mortalidad y la presencia de secuelas en los individuos afectados (Farber y Peterkin, 1991).

A diferencia de los rumiantes donde la romboencefalitis es la lesión predominante, en la especie humana la forma más frecuente es una meningitis o meningoencefalitis (Gray y Killinger, 1966; Lorber, 1997; Schuchat y col, 1997; Mylonakis y col, 1998), siendo la afección del parénquima cerebral consecuencia de la extensión

del proceso meníngeo (Gray y Killinger, 1966). La presencia de cuadros de romboencefalitis o de abscesos/cerebritis es poco usual en la especie humana (Gray y Killinger, 1966; Gellin y Broome, 1989; Lorber, 1997; Mylonakis y col, 1998).

En la encefalitis listérica de los rumiantes las lesiones son consecuencia de una ascensión neurotrópica vía diferentes nervios craneales, especialmente el nervio trigémino, afectando principalmente el tronco cerebral (Charlton y Garcia, 1977) . Sin embargo, en la especie humana la afección del sistema nervioso central (SNC) se asume que es probablemente consecuencia de una diseminación hematógena (Gray y Killinger, 1966).

Cuadros de meningitis y meningoencefalitis comparables a los observados en la especie humana han sido reproducidos utilizando diversos modelos experimentales en animales de laboratorio. Aunque la vía intracraneana y/o intracerebral han sido ampliamente utilizadas (Tsai y col, 1980; Frei y col, 1993; Seebach y col, 1995), la utilización de vías de infección sistémica como la vía intravenosa, subcutánea u oral permiten el estudio de la patogenia de estas lesiones en un contexto más cercano a la infección real donde la diseminación hematógena de la bacteria es considerada.

Las lesiones nerviosas durante la listeriosis murina experimental tras la infección por vía subcutánea o intravenosa, consisten principalmente en una leptomeningitis/meningoencefalitis mixta (PMNN y macrófagos) acompañada de coroiditis y ventriculitis supurativa con presencia de listerias en el interior de PMNN y macrófagos. La presencia masiva de PMNN en los ventrículos llega en algunos casos a obliterar el lumen ventricular (Marco y col, 1992, Berche, 1995, Altimira y col, 1999). La ingestión repetida por la vía oral causa lesiones en el SNC similares a la descritas anteriormente (meningitis, coriomeningitis) pero acompañada también de cuadros de romboencefalitis (Altimira y col., 1999).

Durante la listeriosis murina experimental por vía subcutánea, la aparición de lesiones nerviosas es un fenómeno tardío en el curso de la infección, aumentando en incidencia y gravedad cuando los recuentos bacterianos en el hígado y bazo comienzan a disminuir (Prats y col, 1992). De hecho, Berche muestra que la aparición de meningoencefalitis durante la listeriosis murina es consecuencia de una

bacteriemia persistente resultado de la multiplicación de la listeria en el hígado y bazo (Berche, 1995). Por la vía oral, y a diferencia de dosis únicas, la utilización de dosis repetidas de *L. monocytogenes* causa probablemente una bacteremia subclínica persistente que permite el desarrollo de lesiones en el SNC de los ratones infectados (Altimira, y col. 1999).

Se han expuesto dos hipótesis principales para explicar el acceso de *L. monocytogenes* al SNC. *L. monocytogenes* podría alcanzar el espacio subaracnoideo a través de vasos leptomenigeos y diseminarse posteriormente a través del líquido cefalorraquídeo (LCR). Alternativamente, *L. monocytogenes* podría acceder al SNC a través del endotelio fenestrado presente en los plexos coroideos. Debido a que es en esta zona donde células del sistema monoclear fagocítico migran normalmente al SNC, la posibilidad de que macrófagos infectados ejerzan de vehículo para la entrada de *L. monocytogenes* al encéfalo ha sido considerada (Marco y col, 1992, Altimira y col, 1999; Drevets, 1999; Drevets 2001). Estudios de la patogenia de la meningitis causada por *Streptococcus suis* en cerdos, muestran que monocitos circulantes infectados migran al LCR siendo el plexo coroideo el principal punto de acceso (Williams y Blakemore, 1990).

Durante la listeriosis murina experimental, *L. monocytogenes* circula en el torrente sanguíneo de forma libre y también en el interior de fagocitos, principalmente macrófagos y en menor medida PMNN, (Drevets, 1999). Independientemente de la localización de entrada al SNC, experimentos *in vitro* muestran que *L. monocytogenes* libre en el torrente sanguíneo puede invadir directamente las células endoteliales o diseminarse a partir de células fagocíticas infectadas previamente adheridas a la célula endotelial (Drevets y col, 1995). De hecho, ha sido sugerido que la activación de las células endoteliales durante la fase bacteriémica de la infección por *L. monocytogenes* puede facilitar la adhesión y la transmigración de monocitos infectados promoviendo la infección del SNC (Drevets, 1999).

### **1.1.3. Inmunidad contra la infección**

La inmunidad contra la infección listérica puede ser dividida en dos fases. La primera, inespecífica, mediada principalmente por células del sistema mononuclear fagocítico, neutrófilos y células asesinas naturales y, la segunda, una fase de inmunidad adquirida, necesaria para la resolución completa de la infección, mediada principalmente por linfocitos T específicos.

### **1.1.4. Inmunidad inespecífica**

La respuesta inmune inespecífica durante la listeriosis es llevada a cabo gracias a la interacción entre varios tipos celulares, básicamente células del sistema mononuclear fagocítico, neutrófilos y células asesinas naturales, la producción de numerosas citocinas y la activación del sistema del complemento (Unanue, 1997). De hecho, la resistencia temprana a la infección listérica es independiente de la presencia de linfocitos T o B, de forma que ratones deficientes en linfocitos T y B resisten la infección temprana de la misma forma que ratones completamente inmunocompetentes (Rogers y Unanue, 1993).

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la primera barrera de defensa inespecífica durante la infección listérica es llevada a cabo por células del sistema mononuclear fagocítico, especialmente las células de Kupffer hepáticas que eliminan de la circulación aproximadamente entre el 60-90% del inóculo (Mackaness, 1962, Gregory y col, 2002). Sin embargo, se ha sugerido recientemente que la mayoría de las listerias eliminadas por las células de Kupffer permanecen en realidad adheridas extracelularmente sin ser inicialmente fagocitadas. Se ha postulado que es la interacción posterior de los neutrófilos reclutados en el hígado rápidamente tras la infección con las células de Kupffer la responsable de la fagocitosis e inactivación de la mayoría de las listerias (Gregory y col, 2002; Gregory y Wing, 2002). El resto del inóculo es captado principalmente por macrófagos esplénicos situados en la zona marginal de la pulpa blanca del bazo y en menor medida por mononuclear fagocitos de la pulpa roja (Conlan, 1996).

Los neutrófilos, que aparecen en los focos de infección en las primeras 24h, juegan un papel clave en la fase temprana de la infección. Czuprynski y colaboradores muestran en un modelo de fagocitosis *in vitro* la alta capacidad listericida de PMNN peritoneales obtenidos en la fase temprana de la infección y sugieren la importante contribución de los PMNN en la resistencia contra la listeriosis y posiblemente contra otros patógenos intracelulares (Czuprynski y col, 1984).

Estudios tomando como órgano de referencia el bazo, muestran que durante los tres primeros días tras la infección se produce un incremento significativo de la capacidad listericida en este órgano que coincide con una afluencia masiva de neutrófilos. Contrariamente, el número de células mononucleares fagocíticas no empieza a incrementarse hasta el día 3 o 4 post-infección, sugiriendo que la llegada temprana y masiva de neutrófilos al bazo limita de forma importante la multiplicación de la listeria antes de que ocurra la afluencia de los macrófagos inflamatorios (Kratz y Kurlander, 1988).

Posteriormente, la importancia de los PMNN ha sido demostrada por numerosos autores gracias a la utilización de anticuerpos monoclonales que deplecionan específicamente la población de neutrófilos *in vivo*.

Cuando ratones infectados con una dosis subletal de listeria por vía sistémica son deplecionados de PMNN mediante el anticuerpo RB6-8C5 o son tratados con un anticuerpo contra el receptor de la fracción 3 del complemento (5C6), se produce un incremento de la mortalidad de los animales asociado a un aumento de listerias en el bazo y en el hígado (Rosen y col, 1989; Rogers y Unanue, 1993; Conlan y North, 1994, Czuprynski y col, 1994). En el hígado, este incremento de mortalidad está asociado a una ausencia total de PMNN en los focos de infección hepáticos y a un incremento del número de bacterias visibles en el interior de hepatocitos (Conlan y North, 1991, 1993, 1994, Czuprynski y col, 1994). A partir de estos resultados, ha sido sugerido que una de las funciones de los PMNN en el hígado durante la fase temprana de la infección es la de lisis de los hepatocitos infectados permitiendo la exposición extracelular de las bacterias, su fagocitosis y eliminación, previniendo al mismo tiempo su diseminación a través del parénquima hepático (Conlan y North, 1991, 1992, 1993, Gregory y col, 1996). Otros autores sugieren que, en condiciones

normales, la infección de los hepatocitos por *Listeria* inicia un proceso de apoptosis en estas células, promueve la liberación de moléculas quimiotácticas para los neutrófilos e incrementa la adhesión de neutrófilos, resultando en la formación de microabcesos y en la inhibición de la multiplicación de las listerias (Boury y Czuprynski, 1995; Rogers y col, 1996). Además, la depleción de neutrófilos puede resultar en una menor activación y en un menor reclutamiento de monocitos hacia los focos de infección (Rakhmilevich, 1995).

El incremento del número de bacterias en el bazo de animales deplecionados de neutrófilos, es generalmente menor que en el hígado. Este hecho parece ser debido a una menor permisividad de las células esplénicas a la multiplicación intracelular de la listeria (Conlan y North, 1994).

Este incremento de la carga bacteriana y de la mortalidad asociada no ocurre cuando la depleción de neutrófilos se induce tardíamente tras la infección (5 y 7 d.p.i.) probablemente debido a la presencia de macrófagos listericidas activados en los focos de infección (Rogers y Unanue, 1993). Sin embargo, un estudio de Rakhmilevich (Rakhmilevich, 1995) muestra que cuando el anticuerpo es administrado a 4 y 6 días postinfección, los ratones también desarrollan una infección letal.

Si la temprana llegada de los PMNN limita de forma importante la multiplicación de las listerias, los macrófagos, que empiezan a acumularse en los focos de infección entre las 24-72 horas post-infección contribuyen a la disminución de la carga bacteriana y tienen una importancia fundamental en la fase tardía de la infección. La secreción de factores estimulantes de colonias durante la fase temprana de una infección primaria, principalmente CM-CSF, induce la llegada al hígado de numerosos monocitos sanguíneos derivados de la médula ósea (Gregory y Wing, 1993a).

Durante la fase temprana de la infección por listeria monocytogenes, la producción de citocinas juega un papel importante en el control inicial de la multiplicación de la bacteria.

Durante una infección subletal, TNF- $\alpha$  es producido localmente en los órganos donde se multiplica la listeria, alcanzando el máximo de su producción entre 24 y 72 h.p.i. (Nakane y col, 1992; Poston y Kurlander, 1992). Este incremento de la producción de TNF- $\alpha$  es asociado a la llegada de PMNN al hígado y bazo y a un incremento de la capacidad listericida en ambos órganos (Kratz y Kurlander, 1988).

Cuando ratones infectados con una dosis subletal de *Listeria monocytogenes* son tratados con un anticuerpo contra TNF- $\alpha$  previamente a la infección o durante las primeras 72 horas se produce una exacerbación de la infección que conlleva a un incremento de la mortalidad asociada a un incremento del número de bacterias en el bazo e hígado y a una importante disminución del número de células inflamatorias en los focos de infección (Havell, 1987; Nakane y col, 1988; Havell, 1989; Nakane y col, 1992; van Furth y col, 1994). Por contra, la administración previa a la infección de TNF- $\alpha$  recombinante protege contra una infección letal (Havell, 1989).

La supresión de la resistencia a la infección causada por la administración de un anticuerpo anti TNF- $\alpha$  es debida en parte a la inhibición de la generación de macrófagos activados (Nakane y col, 1988; Langermans y col, 1992). Adicionalmente, van Furth y col, sugieren que los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  inhiben el flujo de granulocitos y monocitos a los focos de infección, probablemente debido a que inhiben el efecto estimulante de TNF- $\alpha$  en la expresión de moléculas de adhesión endotelial y la producción de quemoquinas en las células endoteliales y por lo tanto bloquean la migración transendotelial de las células fagocitarias (van Furth y col., 1994 ).

Como ha sido mencionado anteriormente, la producción temprana de TNF- $\alpha$  permite la generación de macrófagos activados. La estimulación de macrófagos no listericidas por TNF- $\alpha$  y también por IFN- $\gamma$  induce una sobre-regulación del receptor de la fracción 3 del complemento y por tanto de la capacidad fagocítica mediada por este receptor así como de la capacidad listericida (Drevets y col, 1996).

De hecho, el sistema del complemento es otro de los mecanismos involucrados en la defensa inespecífica durante la listeriosis murina. *L. monocytogenes* activa la vía alternativa del complemento, permitiendo su opsonización y posterior fagocitosis principalmente por células expresando el receptor C3 como los macrófagos

activados o inflamatorios (van Kessel y col, 1981; Drevets y Campbell, 1991; Croize y col, 1993). La opsonización de *L. monocytogenes* por la fracción C1q del complemento también contribuye a la fagocitosis por los macrófagos (Alvarez-Dominguez y col, 1993).

Sin embargo, la fagocitosis a través del receptor de la fracción 3 del complemento es esencial para desencadenar en los macrófagos activados la eliminación de la bacteria. El bloqueo del receptor de la fracción 3 del complemento en macrófagos listericidas por medio de anticuerpos específicos inhibe su capacidad listericida (Drevets y col, 1993). Cuando la fagocitosis ocurre por medio de otros receptores diferentes al receptor de la fracción 3 del complemento, la capacidad listericida es inhibida (Drevets y col, 1993; Schlech, 1996).

La secreción precoz de IFN- $\gamma$  juega también un papel importante en el control de la infección. IFN- $\gamma$  es detectado en la circulación, en los bazo y ganglios linfáticos de animales infectados 24 horas tras la infección (Nakane y col, 1990, Dunn y North, 1991). La administración, previa a la infección, de un anticuerpo neutralizante contra IFN- $\gamma$  conlleva la incapacidad para controlar una infección subletal (Nakane y col, 1990; Dunn y North, 1991). La producción de IFN- $\gamma$  en este estadio de la infección es llevada a cabo principalmente por las células asesinas naturales. Las listerias son fagocitadas por los macrófagos, los cuales secretan TNF- $\alpha$  al mismo tiempo que procesan los antígenos bacterianos. La presencia de TNF- $\alpha$  y posiblemente de estos antígenos derivados de listeria induce la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células asesinas naturales que a su vez estimulan la capacidad listericida de los macrófagos (Dunn y North, 1991; Wherry y col, 1991; Poston y Kurlander, 1992; Unanue, 1997). Adicionalmente, IFN- $\gamma$  contribuye directamente a la eliminación de la listeria en el hígado mediante la activación de la capacidad microbicida de los hepatocitos (Gregory y Wing, 1993b).

La producción de IFN- $\gamma$  por las células asesinas naturales permite al hospedador incrementar temporalmente el poder de la defensa inespecífica contra la infección antes que la respuesta inmune dependiente de linfocitos T pueda ser generada.

IL-12 es otra citocina esencial en la defensa contra la infección listérica. IL-12 es secretada por macrófagos tras la infección y media la producción de IFN- $\gamma$  por las células asesinas naturales. En la ausencia de IL-12, se produce un aumento marcado de la multiplicación de la listeria en los órganos diana consecuencia de la falta de producción de IFN- $\gamma$  por las células asesinas naturales. Además, IL-12 es una de las principales citocinas que participa en la comunicación entre la inmunidad innata y adquirida facilitando el la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T (Unanue, 1997).

#### **1.1.5. Inmunidad específica**

La resistencia del organismo a la infección y la eliminación completa de la listeria de los tejidos en los animales infectados así como la resistencia a una infección posterior es dependiente de la instauración de una inmunidad celular mediada por células T (North, 1973, 1975; Emmerling y col, 1977; Takeya y col, 1977) y la posterior activación de los macrófagos (Mackaness, 1962, 1964, 1968).

Tanto los linfocitos T ayudantes (CD4+) como los citotóxicos/supresores (CD8+) son necesarios para la instauración de una resistencia eficaz contra la infección (Kaufmann y col, 1985; Czuprynski y Brown, 1987; Kaufmann, 1987; Sasaki y col, 1990). Sin embargo, experimentos en los que han sido utilizados ratones deficientes en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II (MHCI/MHCII), sugieren que los linfocitos T CD8+ son probablemente las células efectoras principales y críticas en la defensa contra la infección por *Listeria monocytogenes* (Gregory y Liu, 2000).

La secreción de factores solubles, especialmente IFN- $\gamma$ , constituye uno de los principales mecanismos efectores mediante el cual los linfocitos T específicos y las células asesinas naturales median la resistencia contra la infección listérica (Mackaness, 1968; Gregory y Wing, 1993b). Tanto los linfocitos T ayudantes (CD4+) como los citotóxicos (CD8+) son responsables de la producción de IFN- $\gamma$  durante la infección (Nakane y col, 1991).

Tras la infección por *L. monocytogenes*, antígenos derivados de *Listeria* asociados al complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) son presentados por células presentadoras de antígeno a los linfocitos T ayudantes específicos. Estos linfocitos secretan IFN- $\gamma$  e interleucina 2 y activan respectivamente a los macrófagos y a los linfocitos T citotóxicos. A su vez, los linfocitos citotóxicos activados secretan IFN- $\gamma$  incrementando así la capacidad bactericida de los macrófagos (Kaufmann, 1987). De hecho, la producción de IFN- $\gamma$  durante la infección por *L. monocytogenes* está correlacionada con la activación de macrófagos y la eliminación de la bacteria. La administración de un anticuerpo neutralizante a ratones infectados inhibe la generación de macrófagos activados e inhibe la capacidad del ratón a eliminar la bacteria (Buchmeier y Schreiber, 1985). Del mismo modo, la administración de IFN- $\gamma$  recombinante a ratones infectados incrementa la resistencia de los animales y disminuye la multiplicación de la *Listeria* (Sasaki y col, 1990; Gregory y Wing, 1993b). Adicionalmente, ha sido sugerido que la activación de la capacidad microbicida de los hepatocitos es uno de los mecanismos efectores por los cuales IFN- $\gamma$  contribuye a la defensa contra la infección en el hígado (Gregory y Wing, 1993b).

La patogenicidad de *Listeria monocytogenes* depende de su capacidad para escapar del endosoma y multiplicarse en el citoplasma de las células infectadas. Antígenos derivados de *Listeria* en esta localización son entonces presentados en la membrana celular acompañados del MHC I, siendo este hecho crítico para la inducción de inmunidad (Gregory y Liu, 2000). Los linfocitos T citotóxicos específicos reconocen los antígenos derivados de *Listeria* que son presentados acompañados del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y producen la lisis de las células infectadas, permitiendo así la fagocitosis de las bacterias por macrófagos con alta capacidad listericida (Kaufmann, 1987, Gregory y Liu, 2002). La capacidad citolítica de los linfocitos T CD8+ ocurre mediante dos mecanismos diferentes; el primero dependiente de la secreción de perforina, el cual parece ser importante en la fase temprana de la infección, y el segundo, importante en una fase más tardía, dependiente de la interacción de CD95 (Fas) con su ligando (FasL) (Wing y Gregory, 2002).

Los linfocitos CD4 son la subpoblación de linfocitos T más abundante en las lesiones granulomatosas presentes en los órganos de los animales infectados. Su activación contribuye a la protección contra la infección mediante la atracción y subsecuente activación de células mononucleares provenientes del torrente circulatorio (Mielke y col, 1989). Sin embargo, en el caso de una re-infección, el rápido reconocimiento de hepatocitos infectados por los linfocitos T específicos es suficiente para limitar el número de listerias sin necesidad de reclutar un gran número de células mononucleares fagocíticas derivadas de la médula ósea (Gregory y Wing, 1993b).

## **1.2. Inflamación y moléculas de adhesión celular**

Fundamentalmente, la inflamación se caracteriza por la acumulación de leucocitos en los lugares donde se localiza el estímulo inflamatorio. Cuando la inflamación es consecuencia de la invasión por un microorganismo, la respuesta inflamatoria tiene como objetivo localizar, destruir y eliminar el agente invasor.

Clásicamente, la acumulación de leucocitos en los focos de inflamación era explicada por la presencia en estas células de receptores para moléculas quimiotácticas liberadas en el lugar donde el estímulo inflamatorio estaba localizado. Gracias a la presencia de un gradiente de concentración de estas moléculas, los leucocitos eran guiados al espacio extravascular y posteriormente al origen del estímulo. En este modelo, el endotelio jugaba únicamente un papel pasivo basado en la simple retracción celular que permitía el paso de las células inflamatorias al espacio extravascular (Cronstein y Weissmann, 1993).

Sin embargo, ha sido mostrado posteriormente que el reclutamiento de los leucocitos y su posterior extravasación a los focos de infección es el resultado de un complejo proceso de sucesivas interacciones mediadas por la expresión de moléculas de adhesión celular en la membrana de las células endoteliales e inflamatorias.

Los leucocitos deben adherirse al endotelio antes de dejar la circulación y migrar hacia los tejidos. Esta adhesión y posterior migración transendotelial tiene lugar

principalmente en a nivel de las venas postcapilares en los tejidos no linfoides y en las venas de endotelio alto presentes en los linfonodos (Adams y Shaw, 1994).

Una vez los leucocitos han dejado el torrente sanguíneo y han pasado al compartimento extracelular, son entonces capaces de seguir el gradiente quimiotáctico hacia el lugar de origen del estímulo.

### **1.2.1. El proceso de reclutamiento celular**

El proceso de adhesión endotelial previo a la extravasación de los leucocitos se divide principalmente en dos etapas que ocurren de forma consecutiva:

- Adhesión transitoria de los leucocitos al endotelio induciendo un fenómeno de “*rolling*”.
- Activación leucocitaria y adhesión firme.

#### **1.2.1.1. Fase de adhesión transitoria o fenómeno de “*rolling*”**

Esta primera fase del proceso de extravasación leucocitaria consiste en la adhesión transitoria de los leucocitos circulantes al endotelio produciendo un fenómeno de “*rolling*” de los leucocitos a lo largo de la vasculatura. Esta interacción transitoria permite al leucocito encontrar factores de activación específicos expresados en la membrana de la célula endotelial que inducirán su adhesión firme y posterior extravasación. En caso de ausencia de estos factores de activación, la célula inflamatoria perderá contacto y volverá al torrente sanguíneo (Adams y Shaw, 1994).

Esta interacción transitoria está mediada por proteínas de la familia de las selectinas. Las selectinas son proteínas de membrana que contienen un dominio extracelular aminoterminal de tipo lectina seguido por un módulo similar al factor de crecimiento epitelial, múltiples copias de la unidad repetida de consenso de la proteína reguladora del complemento, y un corto dominio intracitoplasmático. La familia de las selectinas está compuesta de tres miembros: P-selectina, E-selectina y L-selectina, denominados según la célula donde fueron identificados por primera vez: plaqueta, endotelio y linfocito respectivamente (Bevilacqua y col, 1991).

P-selectina (CD62P, GMP-140, PADGEM) se encuentra de forma constitutiva en la membrana de los gránulos densos de las plaquetas, en los megacariocitos y en los corpúsculos de Weibel-Palade de las células endoteliales. La expresión de P-selectina en las células endoteliales se concentra especialmente en pequeñas venas y vénulas, precisamente las regiones del endotelio donde ocurre principalmente la migración de leucocitos (McEver y col, 1989).

La expresión de P-selectina está regulada a dos niveles diferentes. Tras activación del endotelio por trombina, histamina o radicales de oxígeno, P-selectina es transportada en pocos minutos y de forma transitoria desde los gránulos secretorios a la superficie celular (McEver y col, 1989). Adicionalmente, en las células endoteliales, la síntesis de P-selectina está regulada a nivel transcripcional por citocinas como TNF- $\alpha$  o por LPS (Weller y col, 1992; Sanders y col 1992; Hahne y col, 1993; Gotsch y col, 1994).

E-selectina (ELAM-1), se expresa únicamente en células endoteliales activadas. Tras la activación de la célula endotelial por diversas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), endotoxina o sustancia P, la célula endotelial sintetiza “*de novo*” E-selectina y es expresada de forma transitoria en el endotelio (Bevilacqua y col 1987; Dianzani y Malavasi, 1995).

L-selectina (LEC.CAM-1, LECAM-1, LAM-1, MEL-14, Leu-8, TQ1, DREC.56), se expresa de forma constitutiva en todos los leucocitos excepto en una subpoblación de linfocitos T de memoria (Konstantopoulos y McIntire, 1996).

Las selectinas reconocen secuencias específicas de carbohidratos presentes ya sea en los leucocitos (P- y E selectina) o en el endotelio (L-selectina). Oligosacáridos como sialyl Lewis<sup>x</sup> y su isómero sialyl Lewis<sup>a</sup> actúan como ligandos para las tres selectinas (Konstantopoulos y McIntire, 1996). Adicionalmente, PSGL-1, una glicoproteína expresada en los leucocitos e inicialmente definida como específica para la P-selectina, contribuye también a la unión de L- y E-selectina aunque probablemente con afinidades relativas diferentes (Konstantopoulos y McIntire, 1996; McEver y Cummings, 1997).

La contribución de cada una de las selectinas al reclutamiento de las diferentes células inflamatorias ha sido ampliamente estudiado *in vitro*, tanto en modelos estáticos como en condiciones de flujo, e *in vivo* mediante la utilización de la microscopía intravital. Estos estudios han puesto en evidencia que tanto L-, P- y E-selectina median la adhesión transitoria y el fenómeno de “rolling” de determinadas subpoblaciones de leucocitos en diferentes condiciones experimentales, tanto en endotelios activados como en endotelios no estimulados (Lasky, 1992; Munro y col, 1992; Abbasi y col, 1993; Tedder y col, 1995; Frenette y Wagner, 1996). Adicionalmente, la expresión de L-selectina en los linfocitos media principalmente el tráfico de estas células a través de los órganos linfoides (Dianzani y Malavasi, 1995).

#### 1.2.1.2. Fase de activación leucocitaria y adhesión firme

Tras el primer contacto mediado por las selectinas, diferentes factores de activación presentes en la superficie endotelial como, PAF (factor activador de plaquetas), componentes de la pared bacteriana, productos del complemento y especialmente la presencia de factores quimiotácticos para diferentes leucocitos activan la capacidad adhesiva de las células inflamatorias induciendo una adhesión más estable al endotelio (Adams y Shaw, 1994; Zimmerman y col 1996). Adicionalmente, ha sido también demostrado que la interacción previa de L-selectina con su ligando actúa como factor de activación del PMNN induciendo su adhesión (Gopalan y col, 1997).

Este incremento de la capacidad adhesiva de los leucocitos es debida a la sobre-regulación y, particularmente, a la alteración de la conformación extracelular de moléculas pertenecientes a la familia de las integrinas (Huber y col, 1991; Cronstein y Weissmann, 1993; Mackay y Imhof, 1993).

Las integrinas son una familia de glicoproteínas heterodiméricas de membrana compuestas de una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ . La familia se subdivide en diversas subfamilias dependiendo de la subunidad  $\beta$  que contienen. Las integrinas más importantes en la interacción leucocito-endotelio son las pertenecientes a la familia  $\beta 2$ , denominadas moléculas leucocitarias de adhesión celular, y las integrinas  $\beta 1$  también llamadas

proteínas VLA (“very late antigen”). Las integrinas  $\beta 2$  contienen la subunidad  $\beta 2$  (CD18) apareada a las diferentes subunidades alfa CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1) o CD11c (gp150,95) mientras que las integrinas  $\beta 1$  contienen la subunidad  $\beta 1$  (CD29) apareada a las diferentes subunidades alfa CD49a-CD49f (Cronstein y Weissman, 1993; Adams y Shaw, 1994).

LFA-1 (CD11a/CD18; “*lymphocyte function antigen*”) en linfocitos, Mac-1 (CD11b/CD18) en PMNN y monocitos y VLA-4 (CD49d/CD29) en linfocitos, monocitos y eosinófilos, son las principales integrinas involucradas en la mediación de la adhesión leucocitaria al endotelio (Cronstein y Weissmann, 1993; Adams y Shaw, 1994).

Estas moléculas de adhesión se expresan de forma constitutiva en todos los leucocitos y tras su activación interaccionan con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresados en el endotelio. Las integrinas  $\beta 2$  interaccionan con las moléculas de adhesión intercelular -1 y -2 (ICAM-1, ICAM-2). Por su parte, VLA-4 interacciona con la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1).

Si bien ICAM-2 se expresa de forma constitutiva en el endotelio y participa al reclutamiento celular basal, la síntesis y expresión de ICAM-1 y de VCAM-1 en las células endoteliales es estimulada por la presencia de citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ) y de LPS, participando al reclutamiento de leucocitos al endotelio inflamado (Cronstein y Weissmann, 1993; Hahne y col, 1993; Haraldsen col, 1996).

La expresión de ICAM-2 e ICAM-1 en la célula endotelial contribuye a la migración de PMNN a través del endotelio en condiciones basales y de activación mediante su interacción con LFA-1 y Mac-1 (Issekutz y col, 1999).

La interacción VCAM-1/VLA-4, media principalmente la adhesión de monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos a células endoteliales previamente activadas por citocinas o LPS (Adams y Shaw, 1994; Elangbam, 1997).

MadCAM es otro miembro de la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en células endoteliales de mucosas e interacciona con L-selectina y la integrina  $\alpha 4\beta 7$ . La interacción de MAdCAM con la integrina  $\alpha 4\beta 7$  es importante en la migración de los linfocitos hacia las diferentes mucosas del organismo (Adams y Shaw, 1994).

### **1.2.2. *Expresión en modelos de inflamación***

Como ha sido mencionado anteriormente, durante un proceso infeccioso, la capacidad del sistema inmunitario para eliminar el patógeno invasor es dependiente de la capacidad de los leucocitos para migrar a través de la barrera endotelial y dirigirse a la zona inflamada.

El papel clave que juegan las moléculas de adhesión en este proceso es evidente en pacientes que sufren una inmunodeficiencia caracterizada por un déficit de adhesión leucocitaria-1 (LAD-1). Se trata de una rara enfermedad caracterizada por una reducción o una ausencia total de integrinas  $\beta 2$  en los leucocitos que impide la migración de neutrófilos a los lugares de infección. En estos pacientes, esta disminución del reclutamiento leucocitario se traduce en la presencia de infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes (Adams y Shaw, 1994). Otra enfermedad similar, LAD-2, caracterizada por una deficiencia en la capacidad migratoria de los neutrófilos es debida a la ausencia en estas células del principal ligando de las selectinas, sialyl Lewis X, que impide la interacción con E- y P-selectina (Mckay y Imhof, 1993).

La utilización de ratones genéticamente deficientes en una o varias moléculas de adhesión celular y el desarrollo en los últimos años de anticuerpos específicos para las diferentes moléculas de adhesión ha permitido evaluar el papel que juegan éstas moléculas en el proceso de reclutamiento celular en diferentes modelos de inflamación, y ha contribuido de forma importante al estudio de la patogenia de numerosas enfermedades inflamatorias.

Así, la importancia de las selectinas en el reclutamiento celular, especialmente de neutrófilos y monocitos/macrófagos ha sido puesta en evidencia mediante la

utilización de ratones deficientes en E- y P-selectina, los cuales expresan un fenotipo de deficiencia de adhesión leucocitaria caracterizado por infecciones mucocutáneas, proliferación de células plasmáticas en los órganos linfoides, hipergammaglobulinemia y deficiencia en el fenómeno de “rolling” (Bullard y col, 1996). Estos animales muestran una inhibición casi completa de la migración inicial de neutrófilos en un modelo de peritonitis infecciosa y un aumento de la morbilidad y mortalidad acompañada de una bacteriemia persistente en un modelo de infección sistémica por *Streptococcus pneumoniae* (Bullard y col, 1996; Muñoz y col, 1997). La deficiencia en la capacidad de adhesión y migración leucocitaria es también evidente cuando los animales son deficientes en E-selectina y en CD18 (ligando de ICAM-1). En este caso los animales muestran una incapacidad total para el reclutamiento de neutrófilos a las zonas inflamadas. De hecho, la viabilidad de estos animales está seriamente reducida debido a su incapacidad de instaurar una respuesta inflamatoria adecuada (Mizgerd y col, 1999; Forlow y col, 2000). La contribución directa de ICAM-1 al reclutamiento leucocitario ha sido puesta de manifiesto mediante la utilización de ratones genéticamente deficientes en ICAM-1 en modelos de inflamación (Kunkel y col, 1996) y también en modelos de isquemia/reperfusión (Jones y col, 2000). Adicionalmente, la contribución de ICAM-1 en la defensa contra patógenos bacterianos queda ilustrada en un modelo de infección bacteriana por *Staphylococcus aureus* en ratón, donde la ausencia de ICAM-1 reduce significativamente la protección contra la enfermedad sistémica pero también el desarrollo de artritis en estos animales (Verdrengh y col, 1996).

Mediante estudios inmunohistoquímicos, la correlación entre la expresión de las diferentes moléculas de adhesión y la infiltración leucocitaria ha sido descrita en múltiples procesos inflamatorios tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), artritis sépticas, procesos inflamatorios renales, dermatitis y asma entre otros (Wegner y col, 1990; Bruijn and Dinklo, 1993; Nakamura y col, 1993; Tang y col, 1994; Bruijn and Heer, 1995; Henseleit y col, 1996; Austrup y col, 1997; Fuhlbrigge y col, 1997; Walter e Issekutz, 1997). De la misma manera, E-selectina, P-selectina e ICAM-1 participan también en el reclutamiento leucocitario al SNC. En un modelo de meningitis experimental inducida por citocinas, la deficiencia de E- y P-selectina provoca una inhibición casi completa de la extravasación leucocitaria al SNC (Tang y col, 1996). Contrariamente, E- y P-selectina no parecen estar involucradas en el

reclutamiento de células inflamatorias en un modelo de encefalitis autoinmune experimental en ratón (Engelhardt y col, 1997). Sin embargo, la expresión de ICAM-1 juega un papel importante en el reclutamiento de los linfocitos en este mismo modelo (Steffen y col, 1994; Dopp y col, 1994). La sobre-regulación de la expresión de ICAM-1 en el SNC ha sido también descrita en la microcirculación cerebral alrededor de placas activas en casos de esclerosis múltiple en la especie humana (Sobel y col, 1990), en modelos de contusión cerebral (Isaksson y col, 1997) y en modelos de encefalitis bacteriana y parasitaria experimental (Engelhardt y col, 1994; Weber y col, 1995; Rudin y col, 1997; Deckert-Schlüter y col, 1999).

La contribución de las diferentes moléculas de adhesión a la patogenia de la listeriosis *in vivo* no han sido estudiados. Sin embargo, estudios *in vitro* muestran que la infección de células endoteliales humanas por *Listeria monocytogenes* induce la expresión y sobre-regulación de E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en estas células, e induce la adhesión de PMNN (Krull y col, 1997; Drevets, 1998), siendo la adhesión de los neutrófilos inhibida cuando son utilizados anticuerpos monoclonales específicos (Drevets, 1997). Adicionalmente, la infección *in vitro* de hepatocitos con *L. monocytogenes* induce la sobre-expresión de ICAM-1 facilitando la adhesión de los neutrófilos a estas células (Boury y Czupynski, 1995).

Estas observaciones sugieren que la capacidad de *L. monocytogenes* para estimular la adhesión leucocitaria por medio de la expresión de moléculas de adhesión endotelial puede ser un mecanismo patogénico importante durante la listeriosis.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de la patogenia de la listeriosis murina experimental mediante el estudio de los mecanismos involucrados en el reclutamiento celular a los focos de infección, y en especial al sistema nervioso central. La listeriosis murina experimental se caracteriza por la rápida llegada de PMNN y macrófagos a los órganos diana (hígado, órganos linfoides y sistema nervioso central). En general, la eliminación de los agentes patógenos por el sistema inmunitario depende en gran medida de la capacidad de los leucocitos para traspasar la barrera endotelial y dirigirse al lugar de infección. De acuerdo con estas premisas generales, uno de los objetivos principales de este trabajo doctoral fue el estudio de la expresión de moléculas de adhesión en el transcurso de la listeriosis murina experimental. En concreto, se pretende caracterizar la expresión de aquellas moléculas principalmente involucradas en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos/macrófagos hacia los focos de infección.

Las lesiones nerviosas en la listeriosis murina experimental se caracterizan por la afluencia masiva de PMNN hacia las meninges y al sistema ventricular. Sin embargo, de la misma manera que el rápido reclutamiento de estas células a los focos de infección es vital para el control inicial de la infección, no se puede excluir la posibilidad de que el reclutamiento de neutrófilos en el sistema nervioso central sea también responsable de la mayoría de las secuelas observadas en la listeriosis humana. Por otra parte, es conocida la capacidad de las células fagocitarias (PMNN, macrófagos) para vehicular listerias y generalizar la diseminación de la bacteria por diferentes zonas del organismo. Según estos presupuestos, otro de los objetivos fundamentales de este trabajo doctoral ha sido estudiar en qué medida la modulación de la migración del PMNN al sistema nervioso central podría modificar el patrón lesional característico de la listeriosis murina experimental.

En resumen, los objetivos concretos que se plantearon para el desarrollo de este trabajo doctoral fueron:

1. Puesta a punto y estandarización de técnicas inmunohistoquímicas adecuadas para la detección de E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en tejidos de ratón fijados en formol e incluidos en parafina.
2. Estudiar la expresión de E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en el transcurso de la listeriosis murina experimental y determinar la posible existencia de correlación entre la expresión de dichas moléculas y las lesiones inflamatorias observadas.
3. Intentar elucidar la importancia de los PMNN en la patogenia de las lesiones nerviosas durante la listeriosis murina experimental mediante la utilización del anticuerpo monoclonal RB6-8C5, el cual depleciona específicamente la población de PMNN "*in vivo*".

### **3. ARTÍCULOS PUBLICADOS**

## BRIEF METHODS

### Immunohistochemical Detection of Adhesion Molecules Intercellular Adhesion Molecule-1 and E-Selectin in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Mouse Tissues

Santiago López, Daniel Borràs, Carles Juan-Sallés, Neus Prats, Mariano Domingo, and Alberto Jesús Marco

**I**ntercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 or CD54) and E-selectin (CD62E) play an important role in leukocyte adherence to endothelium and extravasation at sites of inflammation [Bevilacqua et al, 1987; Springer, 1990]. Immunohistochemical techniques on frozen sections have been used to detect these molecules in animal and human tissues [Fries et al, 1993; Harsels et al, 1995; Kuzu et al, 1993; Neumann et al, 1996]. Using two commercially available antibodies against mouse ICAM-1 and E-selectin and standard antigen-unmasking protocols, we have now detected these molecules in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from normal and lipopolysaccharide-stimulated mice. No immunohistochemically detectable constitutive expression of E-selectin was found in any normal tissue. Ninety minutes after lipopolysaccharide inoculation, E-selectin expression was detected on endothelial cells in most evaluated organs, except for liver sinusoidal endothelial cells and vessels of neural parenchyma. ICAM-1 was constitutively expressed, and it was up-regulated in all organs 90 minutes after lipopolysaccharide inoculation. Although the distribution and patterns of expression of both molecules examined in this study parallel previous reports in which immunohistochemistry on frozen sections was used, the present methods have the advantages of improved resolution and easier handling of tissue samples. The possibility of detecting these adhesion molecules in routinely-processed tissues permits retrospective study as well as improved morphologic resolution.

After routine processing of tissues for histopathologic examination, a decrease in antigenicity of these molecules is produced, and the use of antigen-retrieval techniques is required. Tissue sections (5 to 6  $\mu$ m) on adhesive-coated slides were deparaffinized, rehydrated, and placed for 30 minutes in a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in distilled water for endogenous peroxidase inhibition. After washing in Tris-buffered saline (TBS, pH 7.5), sections were treated for antigen retrieval. To unmask E-selectin, slides were placed in a 0.1% pronase E (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) solution in distilled

water at room temperature for 8 minutes. For ICAM-1, sections were placed in 0.01 M citrate buffer (pH 7.4) and heated for 5 minutes (5 rounds of 1 minute each) in a microwave oven (850 W, Moulinex FM A735A, Moulinex Espana, Madrid, Spain). After washing sections in TBS, endogenous biotin was blocked with a commercially available blocking kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California). Nonspecific binding was blocked with a 10% goat normal serum solution in TBS for 1 hour at room temperature. Sections were incubated with primary antibodies at the working dilutions at 4°C overnight. The secondary antibody was incubated for 1 hour at room temperature for E-selectin and at 37°C for ICAM-1 detection.

Reaction was developed with the avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Dako, Glostrup, Denmark) using as chromogen a 0.05% solution of 3-3' diaminobenzidine (Sigma) with 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M imidazole buffer (pH 7.1) for 4 minutes. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Sections incubated with isotype-matched antibodies served as negative controls. Primary rat monoclonal antibodies against mouse ICAM-1 (Clone KAT-1) and E-selectin (Clone 10E9.6), which were tested for use on frozen sections, were purchased from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom) and Pharmingen (San Diego, California), respectively. Working dilutions were 1:100 for ICAM-1 and 1:50 for E-selectin, both of which were diluted in 0.05 M TBS (pH 7.5). The secondary biotinylated rabbit anti-rat IgG antibody was obtained from Dako and diluted 1:200 in TBS (pH 7.5).

Animals used in this study were 10 female Swiss mice given an intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide (155:B5, *Escherichia coli*; Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) at a single dose of 500  $\mu$ g in 0.5 ml of saline. Five animals inoculated with saline were used as controls. Samples from brain, liver, spleen, kidney, mesenteric lymph node, salivary gland, lung, heart, skin, small and large intestine, mesentery, and genital system were placed in neutral buffered formalin for 48 hours, embedded in paraffin, and processed for immunohistochemistry.

Typical results are shown in Figure 1. E-selectin was predominant on endothelial cells of venules, arterioles, capillaries, and large-diameter vessels (Fig. 1, a and b), as well as in renal glomeruli from lipopolysaccharide-stimulated mice (Fig. 1c). A faintly positive reaction was distributed along the endocardial endothelium. In the lymphoid system, E-selectin expression was reduced to a few scattered venules in the medullary cords, and it was weak in high endothelial venules. A few nodular arterioles in the splenic white pulp and very few red pulp sinusoidal endothelial cells showed a faintly positive reaction. ICAM-1 was expressed on endothelial cells of venules, capillar-

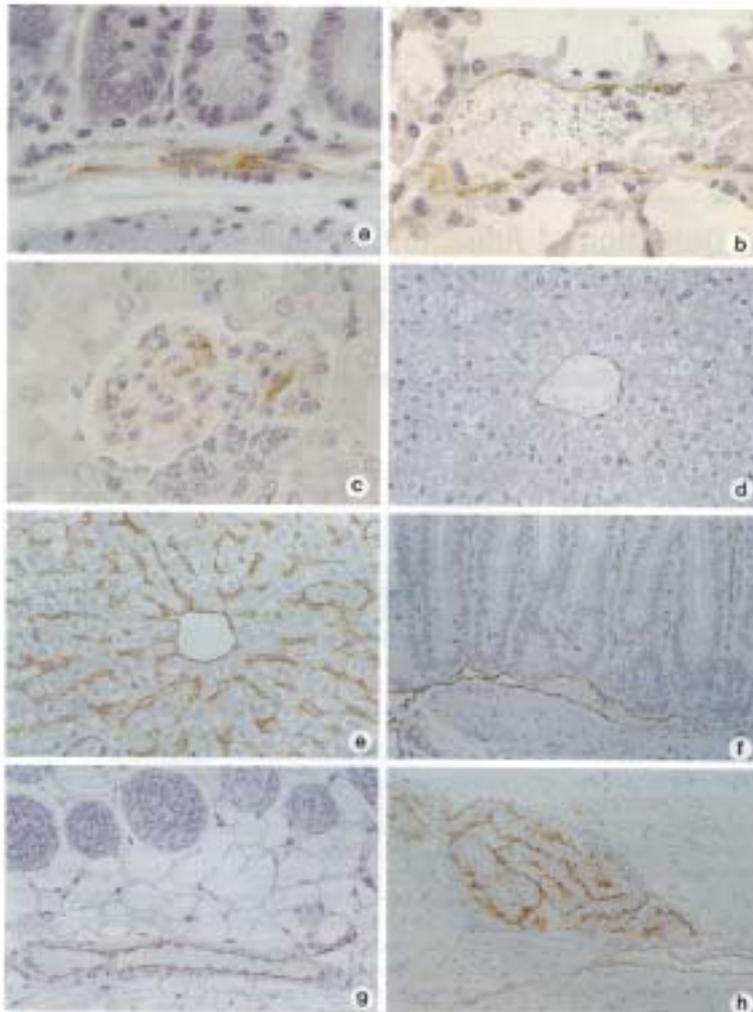
Received April 28, 1997.

*Affiliations:* Department of Pathology and Animal Production, Veterinary School, Bellver, Barcelona, Spain.

*This work was supported by the Comisión Interdepartamental de Ciencia y Tecnología (AGP93-CO2-02).*

*Address reprint requests to:* Dr. S. L. Orpina, *Histología i Anatomia Patològica, Departament de Patologia i Producció Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellver, Barcelona, Spain. Fax: 34 3 5623142.*

López et al



**Figure 1.** a to c, Expression of E-selectin 90 minutes after intraperitoneal inoculation of mice with lipopolysaccharide in vessels of the intestine (a) and lung (b) and in a renal glomerulus (c). d to h, Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in normal (d) and LPS-stimulated (e to h) mouse tissues. ICAM-1 was clearly up-regulated 90 minutes after LPS stimulation in sinusoidal endothelial cells of the liver (d = normal; e = stimulated). Strong positive staining was found in the vasculature of the intestine (f) and skin (g) and in the apical surface of the choroid plexus epithelial cells of LPS-stimulated animals (h). Avidin-biotin peroxidase immunostaining counterstained with hematoxylin, all of formalin fixed and paraffin embedded specimens. Original magnification: a to c,  $\times 1071$ ; d to g,  $\times 428$ ; h,  $\times 214$ .

ies, and some larger veins and arteries, as well as on choroid plexus epithelial cells (Fig. 1, d to h), basal keratinocytes, and pulmonary alveolar epithelial cells (Kang et al, 1996; Silber et al, 1994; Steffen et al, 1996). It was also expressed in the center of secondary follicles in the lymph nodes, Peyer patches, and spleen, possibly corresponding to high levels of expression by follicular dendritic cells (Koopman et al, 1991).

**References**

Bavikouja MP, Pober JB, Mendrick DL, Cobran RS, and Gimbrone MA (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8238-8242.

Fries J, Williams A, Atkins R, Newman W, Lipscomb M, and Collins T (1993). Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol* 143:725-737.

Hensels U, Steinbrink K, Goebeler M, Roth J, Vestweber D, Sorg C, and Sunderkötter C (1994). E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice. *J Pathol* 180:317-325.

Kang BH, Manderscheid BD, Huang YCT, Crapo JD, and Chang LY (1996). Contrasting response of lung parenchymal cells to inhaled TNF alpha and IFN gamma: The inducibility of specific cell ICAM-1 in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:540-550.

Koopman G, Pamerleir HK, Schuurman H, Newman W, Meijer C.J.M., and Pals ST (1991). Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J Exp Med* 173:1297-1304.

Kuzu I, Bicknell R, Fletcher CDM, and Gatter KC (1993). Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab Invest* 69:322-328.

Neumann B, Machfeldt T, Lifka A, Pfaffler K, Vestweber D, Mak TW, Holzmann B, and Kronke M (1995). Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol* 156:1587-1593.

Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, and Ringler DJ (1994). Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab Invest* 70:163-175.

Springer TA (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434.

Steffen BJ, Brewer G, Butcher EC, Schutz M, and Engelhardt B (1995). ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Pathol* 148:1519-1638.

## Animal Model

# Expression of E-Selectin, P-Selectin, and Intercellular Adhesion Molecule-1 during Experimental Murine Listeriosis

Santiago López, Neus Prats, and  
Alberto Jesús Marco

From the Department of Pathology and Animal Production,  
Veterinary School, Bellaterra, Barcelona, Spain

The expression of adhesion molecules E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was immunohistochemically investigated during the course of experimental murine listeriosis. Infection was monitored by microbiological count of blood, liver, and spleen. After an early generalized expression of P-selectin and ICAM-1, a later regulation occurred specifically to areas of inflammation. Expression of E-selectin was faint and inconsistently detected in all of the studied organs. In the liver, typical lesions of murine listeriosis were related to the expression of ICAM-1 on sinusoidal endothelial cells and the biliary system and to the *de novo* expression of P-selectin in hepatic portal vessels. Inflammation in the spleen was related to the expression of ICAM-1 on red pulp sinusoidal cells, especially in the marginal sinus. High endothelial venules of inflamed lymph nodes also expressed P-selectin and ICAM-1. Lesions in the central nervous system appeared on day 3 after infection as a pyogranulomatous leptomeningitis associated with an intense expression of P-selectin and ICAM-1 in meningeal vessels, especially those in the hippocampal sulcus, suggesting a way through which inflammation initially reach the central nervous system during experimental murine listeriosis. Leptomeningitis was followed by the presence of ventriculitis, which was related to the up-regulation of ICAM-1 on choroid plexus epithelial cells, periventricular vessels and ependymal cells. Up-regulation of P-selectin and ICAM-1 during experimental murine listeriosis could play an important role in the recruitment of leukocytes, especially to the liver, lymphoid organs, and central nervous system. (*Am J Pathol* 1999; 155:1391-1397)

Experimental murine listeriosis has long served as a model for studying host defense against infections caused by intracellular pathogens in general,<sup>1</sup> and listeriosis in particular.<sup>2-6</sup>

Systemic murine listeriosis is characterized by the rapid influx of leukocytes, especially neutrophils but also macrophages, into the site of initial bacterial replication, especially the liver and spleen. These cells have been shown to be essential for the early defense against the infection.<sup>7,8</sup> Leukocyte recruitment to inflammatory sites consists of a complex series of interactions mediated by cell adhesion molecules expressed on the surface of inflammatory and endothelial cells. The initial step in the adhesion cascade is the tethering and rolling of leukocytes along the endothelium, which is mediated by the interaction of members of the selectin family and their carbohydrate ligands.<sup>9-11</sup> E- and P-selectin, expressed on the endothelial cell surface, have been shown to support the initial rolling phase of neutrophils and monocytes *in vitro* and *in vivo*. Firm adhesion to endothelium and subsequent emigration through the vessel wall is dependent on leukocyte  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrin activation and their interaction with members of the immunoglobulin-like superfamily on the endothelium, including intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).<sup>9,11</sup>

The use of the subcutaneous route of infection has been shown as a suitable model of systemic murine listeriosis, and can also reproduce central nervous system (CNS) lesions similar to those of listeria meningitis in humans and other species. The main feature of these lesions is the recruitment of inflammatory cells, especially macrophages and neutrophils, to the subarachnoid and ventricular space causing meningitis and choroiditis.<sup>6</sup>

Supported by the Comisión Interdepartamental de Ciencia y Tecnología (CICYT), AGFB3-C02-02.

Accepted for publication June 15, 1999.

Address reprint requests to Santiago López, Histología i Anatomia Patològica, Departament de Patologia i Produccions Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08100 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: santiago.lopez@cc.uab.es.

1391

1392 López et al  
*AJP* October 1999, Vol. 155, No. 4

Despite of being extensively used as an experimental model for the study of the pathogenesis of and host defense against intracellular bacteria, the expression and contribution of endothelial cell adhesion molecules to the pathogenesis of *Listeria monocytogenes* during experimental murine listeriosis have not been characterized yet. Therefore, the aim of this study was to detect by immunohistochemistry the expression of E-selectin, P-selectin, and ICAM-1, especially in the liver, lymphoid organs and CNS of mice during the course of experimental murine listeriosis using the subcutaneous route of infection, and to determine whether correlation exists between the expression of these adhesion molecules and the inflammatory infiltrate.

### Materials and Methods

*L. monocytogenes* (serovar 4b, strain P-14B) was grown on brain heart infusion broth (BHI, Difco) at 37°C for 24 hours with orbital shaking. After centrifugation the organisms were collected and resuspended in sterile 0.9% saline to the required dose.

### Animals

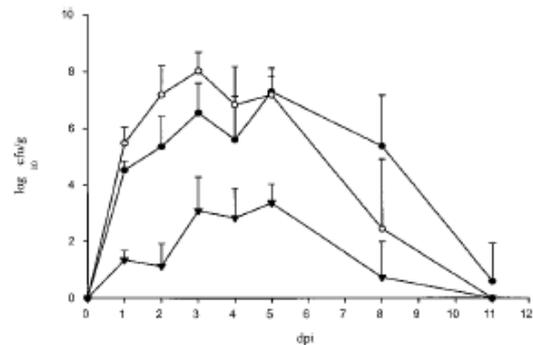
Forty-eight female 25-g SPF CD1 mice (Interfauna, Spain) were inoculated subcutaneously with  $5 \times 10^8$  colony-forming units of viable *L. monocytogenes* in a 0.2 ml of solution in the lumbar zone. At various time intervals (days 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11 after infection) (p.i.) groups of mice were killed by anesthetic (halothane) overdose. Immediately, blood collected from the cava vein was placed in heparin-coated microtubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and 0.5 ml were directly plated on brain-heart infusion agar (BHIA). Samples of liver and spleen were aseptically removed, homogenized in Tris-buffered saline, and plated in 10-fold serial dilutions in BHIA for bacterial count. Plates were incubated for 24 hours at 37°C.

Samples of liver, spleen, lymph nodes, stomach, small and large intestine, pancreas, kidney, adrenal gland, urinary bladder, uterus, ovary, lung, heart, thymus, bone marrow, spinal cord, and brain were taken immediately after killing the animals, fixed for 48 hours in buffered formalin, embedded in paraffin, and processed for histopathology and immunohistochemistry.

Animal experiments were performed under the supervision of the Animal Care Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

### Immunohistochemistry

Primary rat monoclonal antibodies against mouse ICAM-1 (clone KAT-1) (R&D Systems, Abingdon, UK), E-selectin (clone 10E9C) (Pharmingen, San Diego, CA), neutrophils (clone 7/9) (Immunokontakt, Bioggio, Switzerland) and polyclonal rabbit against mouse P-selectin (Pharmingen) were used. Immunohistochemistry to detect ICAM-1 and E-selectin was performed as previously



**Figure 1.** Bacterial growth in organs of mice infected subcutaneously with  $5 \times 10^8$  colony-forming units of viable *L. monocytogenes* in liver (●), spleen (○), and blood (▼). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD (five to eight mice per time point).

described.<sup>12</sup> To detect P-selectin and neutrophils in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, sections were placed in 0.01 mol/L citrate buffer (pH 6) and heated for 10 minutes (P-selectin) or 5 minutes (neutrophils) in a microwave oven (Moulinex FM A735A, 850 W) for antigen retrieval. After blocking nonspecific binding, sections were incubated with the primary antibody diluted 1:250 (P-selectin) and 1:800 (neutrophils) in 0.05 mol/L Tris-buffered saline, pH 7.6, at 4°C overnight. A biotinylated goat anti-rabbit IgG and a biotinylated goat anti-rat IgG (Dako, Glostrup, Denmark) were used as a secondary antibodies diluted in Tris-buffered saline, pH 7.6, at 1:400 and 1:200, respectively. Reaction was developed with the avidin-biotin horseradish peroxidase complex using as chromogen 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) with 0.03%  $H_2O_2$  in 0.1 mol/L imidazole buffer (pH 7.1). *L. monocytogenes* was immunohistochemically detected by a modified technique from Domingo et al<sup>13</sup> using the avidin-biotin complex system (Dako). Sections incubated with isotype-matched antibodies served as negative controls in each technique.

### Results

#### Clinical and Microbiological Results

Neither symptoms nor deaths were seen until day 4 p.i., with the exception of one mouse that died on day 3 p.i. On day 4 p.i. many animals rested immobilized and showed hair bristling. From day 5 p.i. to the end of the experiment, most animals showed neurological signs such as ataxia and tremors, and three of them, circling. During this period two animals died and many had to be euthanized due to severe symptomatology. Results of bacterial counts in the liver, spleen, and blood are shown in Figure 1. *Listeria* was detected from day 1 p.i. through the end of the experiment. The maximum bacterial count in the liver ( $10^7$  colony-forming units/g) and the spleen ( $10^6$  colony-forming units/g) occurred between days 3 and 5 p.i., after which they gradually decreased and became undetectable on day 11 p.i. *Listeria* was de-

tected in blood at low levels (10/ml) during the first two days but reached levels of  $10^3$ /ml on day 3 p.i. that lasted until day 5 p.i., then declined until there were undetectable levels on day 11 p.i. This period of bacteremia was coincident with the period of maximal bacterial replication in the spleen and liver.

### Histopathology and Immunohistochemistry

#### Control Animals

As previously reported<sup>12,14</sup> no E-selectin expression was immunohistochemically detected in endothelial cells in any of the studied organs from control animals. Although P-selectin is preformed and stored in Weibel-Palade bodies of endothelial cells, platelets, and megakaryocytes of unstimulated animals,<sup>15</sup> P-selectin was only detected in megakaryocytes and circulating platelets of control animals. ICAM-1 was constitutively expressed in all of the studied organs. In the liver, ICAM-1 was faintly expressed on sinusoidal endothelial cells, especially around the centrilobular vein and also in some branches of the portal vein and hepatic artery. In lymphoid organs, ICAM-1 expression was detected in some splenic red pulp sinusoidal endothelial cells and in the center of lymphoid follicles, as well as in the medullary and subcapsular sinuses of lymph nodes. In the CNS, ICAM-1 was expressed in subarachnoid venules and capillaries, especially those in the hippocampal sulcus, and with less intensity in periventricular vessels. Choroid epithelial cells also expressed ICAM-1 in their apical membrane. ICAM-1 was also detected in venules and capillaries of the rest of organs, as well as in the endocardium and pulmonary alveolar epithelial cells.

#### Infected Animals

Typical lesions of septicemic listeriosis affecting the liver, spleen, and lymph nodes<sup>1,3-5</sup> began to appear on day 2 p.i. and were present until the end of the experiment. However, up-regulation and *de novo* expression of some of the adhesion molecules was already evident on day 1 p.i.

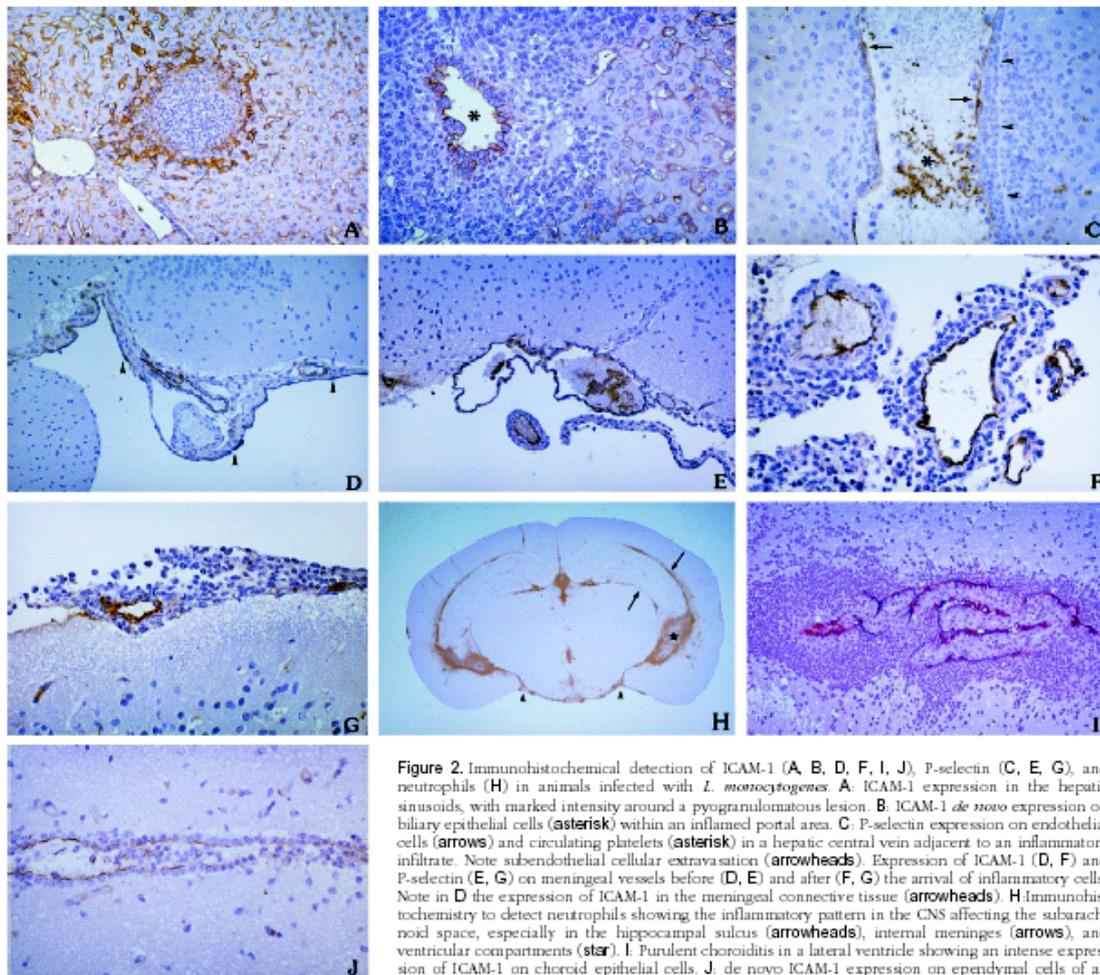
After inoculation, progressive ICAM-1 up-regulation in liver sinusoidal endothelial cells was observed, and reached the highest level of expression on days 2 to 3 p.i. and returned to basal levels on day 11 p.i. This up-regulation consisted not only of an increment in the intensity of the reaction but also of the distribution, which was markedly centrilobular on day 1 p.i. and became generalized during days 2 to 3 p.i. At this time, small pyogranulomatous foci of inflammation were randomly distributed throughout the hepatic parenchyma with the presence of *Listeria* in the center of the lesions. Sinusoidal endothelial cells immediately adjacent to these areas showed a more intense ICAM-1 staining (Figure 2A). This overexpression around the inflamed areas lasted to the end of the experiment, independently of the inflammatory cell composition, and the expression level in the rest of the sinusoidal cells. On days 3 to 4 p.i., lesions were

pyogranulomatous and necrotizing with great numbers of *Listeria* and were most severe on day 5 p.i. On day 3 p.i., at the same time that sinusoidal expression was returning to its basal levels, a marked progressive up-regulation was detected in portal vessels associated with the presence of margination, diapedesis and periportal infiltration of neutrophils and macrophages. Moreover, ICAM-1 was *de novo* expressed in the latero-apical cell surface of biliary epithelial cells (Figure 2B). This expression in the portal area was maximum on day 5 p.i.; at this time inflammation and bacterial burden was maximum in this organ. Between days 5 and 8 p.i., pyogranulomatous cholecystitis and the presence of free and phagocytosed *Listeria* in bile ducts were common findings. Expression of P-selectin in the liver could be detected in centrilobular and portal veins and some portal capillaries on day 1 p.i. and became slightly reduced between days 2 and 3 p.i. However, on days 5 and 8 p.i. most of the animals had again marked expression of P-selectin in the centrilobular and portal veins and also in capillaries located near or within inflamed areas (Figure 2C). Between days 4 and 8 p.i. P-selectin was markedly expressed in the cytoplasm of circulating megakaryocytes in hepatic sinusoids. From day 8 p.i. to the end of the experiment, lesions became smaller and populated by a great proportion of macrophages and lymphocytes. On day 11 p.i. inflammation was almost absent, hepatocytes were vacuolated, and there was extramedullary hematopoietic activity with numerous megakaryocytes circulating within sinusoids and showing less P-selectin expression. Endothelial P-selectin expression had disappeared and ICAM-1 was at its basal levels with the exception of sinusoidal cells adjacent to small granulomas. E-selectin was only detected in some capillary and venule endothelial cells located in inflamed portal areas of the liver of two animals on days 3 and 4 p.i.

In the spleen, on day 2 p.i., inflammatory cells, predominantly neutrophils and macrophages, were mainly located in the periarteriolar lymphoid sheath and in red pulp, with higher presence in the marginal sinus. The inflammatory lesion was usually accompanied by a variable degree of lymphoid depletion in the periarteriolar lymphoid sheath. Between days 3 and 5 p.i. some animals showed a necrotizing splenitis. In these mice, lymphoid depletion was almost complete. From day 5 p.i. to the end of the experiment, lesions became more granulomatous, and the lymphocyte population was restored on day 11 p.i. Different degrees of *L. monocytogenes* immunostaining were always observed in macrophages and neutrophils associated with the lesions from day 2 to 8 p.i.

Neither P-selectin nor E-selectin was immunohistochemically detected in splenic endothelial cells from infected animals. Only megakaryocytes and platelets in the red pulp showed cytoplasmic P-selectin expression. On day 1 p.i., there was an up-regulation of the ICAM-1 constitutive expression in the spleen, and some animals also showed positive reaction in some nodular and trabecular arteries. Intralesional macrophages and those within the red pulp also showed ICAM-1 expression in the cell membrane. Endothelial expression in the red pulp

1394 López et al  
*AJP* October 1999, Vol. 155, No. 4



**Figure 2.** Immunohistochemical detection of ICAM-1 (A, B, D, F, I, J), P-selectin (C, E, G), and neutrophils (H) in animals infected with *L. monocytogenes*. A: ICAM-1 expression in the hepatic sinusoids, with marked intensity around a pyogranulomatous lesion. B: ICAM-1 *de novo* expression on biliary epithelial cells (asterisk) within an inflamed portal area. C: P-selectin expression on endothelial cells (arrows) and circulating platelets (asterisk) in a hepatic central vein adjacent to an inflammatory infiltrate. Note subendothelial cellular extravasation (arrowheads). Expression of ICAM-1 (D, F) and P-selectin (E, G) on meningeal vessels before (D, E) and after (F, G) the arrival of inflammatory cells. Note in D the expression of ICAM-1 in the meningeal connective tissue (arrowheads). H: Immunohistochemistry to detect neutrophils showing the inflammatory pattern in the CNS affecting the subarachnoid space, especially in the hippocampal sulcus (arrowheads), internal meninges (arrows), and ventricular compartments (star). I: Purulent choroiditis in a lateral ventricle showing an intense expression of ICAM-1 on choroid epithelial cells. J: *de novo* ICAM-1 expression on ependymal cells of an animal with ventriculitis. Inflammatory cells are seen in the ventricular lumen. Original magnification,  $\times 214$  (A, D, E, I);  $\times 428$  (B, C, F, G, J);  $\times 128$  (H). Hematoxylin counterstain.

was maximal on day 5 p.i., and returned to basal levels on day 11 p.i.

Lymph node lesions consisted of paracortical pyogranulomatous infiltrates associated with bacterial antigen. Although some animals had lesions in the inguinal and lumbar lymph nodes on day 1 p.i., most were present from day 2 p.i. through day 8 p.i. P-selectin and ICAM-1 but not E-selectin were *de novo* expressed on the endo-

thelium of some veins in the medullary cords and high endothelial venules of some animals with lesions. Circulating macrophages in the medullary sinuses also showed intense ICAM-1 expression in their membrane.

CNS lesions appeared on day 3 p.i. and were present through experiment. The course of lesions is summarized in Table 1. As in the liver and spleen, induction and up-regulation of the studied adhesion molecules were detected soon after infection. ICAM-1 was already up-regulated on day 1 p.i., especially in subarachnoid venules and capillaries (Figure 2D), and was also expressed in large veins and arterioles. Subarachnoid vessels also showed *de novo* P-selectin expression (Figure 2E), which was more intense in the vessels of the hippocampal sulcus. Meningeal connective tissue, especially in this sulcus, also expressed ICAM-1 (Figure 2D). Some parenchymal vessels, and sinusoidal endothelial cells in the choroid plexus also had faint expression of P-selectin.

**Table 1.** Time Course of Lesions in the CNS of Mice after Subcutaneous Inoculation of  $5 \times 10^8$  Colony-Forming Units of Viable *L. monocytogenes*

Lesion	Days after Infection						
	1	2	3	4	5	8	11
Meningitis	0/6	0/8	6/8	6/8	7/8	5/5	2/5
Ventriculitis	0/6	0/8	0/8	1/8	5/8	2/5	1/5
Encephalitis	0/6	0/8	0/8	0/8	2/8	5/5	3/5

Data are number of affected animals per total.

This expression pattern remained constant during the experiment but with less intensity, and only vessels adjacent to inflammation, showed intense ICAM-1 and P-selectin expression from day 3 p.i. through the end of the experiment (Figure 2, F and G). Lesions first appeared on day 3 p.i. and consisted of the presence of few inflammatory cells, predominantly neutrophils in the subarachnoid space. This inflammatory infiltrate was always more prominent in the hippocampal sulcus and hippocampus-associated internal meninges (Figure 2H). Presence of *L. monocytogenes* was associated with these lesions. At this time, a marked overexpression of P-selectin and ICAM-1 (Figure 2, G and F) was seen in meningeal venules and capillaries adjacent to the lesions, as well as, in the case of ICAM-1, in the meningeal connective tissue. On day 4 p.i., macrophages expressing ICAM-1 on the cell membrane were prominent in the meningeal lesions and some cells were in the ventricular lumen causing ventriculitis. On day 5 p.i. expression of ICAM-1 in meninges was maximal and all of the animals showed an intense pyogranulomatous meningitis with numerous macrophages, and most of them also suppurative ventriculitis with *Listeria*-laden neutrophils. In most of these animals, ventriculitis was associated with choroiditis and ependymitis, with necrosis of choroidal and ependymal cells. Animals with ventriculitis-choroiditis also showed increased expression of ICAM-1 on the choroid epithelial cells (Figure 2I) and, most, *de novo* expression on ependymal cells (Figure 2J). *Listeria*-laden neutrophils were detected adhered to ICAM-1-expressing ependymal cells (Figure 2J). In animals with ventriculitis, expression of ICAM-1 but not P-selectin, in periventricular vessels, especially venules, was clearly up-regulated in association with adhesion and diapedesis of neutrophils and macrophages. Some animals, from days 8 to 11 p.i., also showed perivascular accumulation of macrophages and neutrophils in the rombencephalon, with little *Listeria* antigen. These vessels showed intense expression of ICAM-1 while the rest of parenchymal vessels were faintly positive. P-selectin expression was not detected in these inflammatory lesions but some meningeal and parenchymal vessels, apparently unrelated to the infiltrate, had a slightly positive expression. On day 11 p.i. vascular and epithelial expression of ICAM-1 had returned to basal levels and only faint meningeal expression of ICAM-1 was still present.

As in other organs, E-selectin expression in the CNS was detected in few animals (4/47) and few vessels. It was expressed in some meningeal venules and capillaries in the subarachnoid space of the hippocampal sulcus. On day 5 p.i., expression in periventricular capillaries and in sinusoidal endothelial cells of the choroid plexus was detected in two animals.

In other organs, consistent lesions were multifocal pyogranulomatous adrenalitis (40%) and myocarditis (37%). These lesions were most severe and affected most animals on day 5 p.i. and between days 5 and 8 p.i., respectively. Between days 5 and 8 p.i. most animals had pyogranulomatous myocarditis involving atria and ventricles and some also showed pyogranulomatous valvular endocarditis. In these organs there was not expression of

selectins, and the basal expression of ICAM-1 on the adrenal capillary network and on the endocardium and myocardial capillaries and venules was clearly up-regulated after infection. Venules and capillaries adjacent to inflammatory lesions in the heart had intense ICAM-1 expression.

### Discussion

This report describes the up-regulation of ICAM-1 and the *de novo* expression of endothelial E- and P-selectin during the course of experimental murine listeriosis. After an early, generalized expression of endothelial adhesion molecules in the liver, spleen, and CNS, a further regulation occurred specifically within areas of inflammation. The initial generalized up-regulation of ICAM-1 expression and P-selectin induction in the studied organs were already demonstrable on day 1 p.i. At this time, inflammatory lesions were not evident, but *L. monocytogenes* was systemically disseminated as microbiological counts of blood, liver, and spleen revealed. This suggests a systemic nonspecific endothelial activation that may allow leukocytes to scavenge the organism to find the inflammatory stimulus. During systemic *L. monocytogenes* infection, the liver and spleen are the major target organs for initial bacterial replication and inflammatory cell recruitment, especially neutrophils.<sup>1,6</sup> In the liver, a marked up-regulation of ICAM-1 occurred on day 1 p.i. along all sinusoidal endothelial cells at the same time that P-selectin was induced in postsinusoidal and portal veins but not in the sinusoid. The absence selectin expression on sinusoidal endothelial cells suggests that these molecules are not necessary to mediate the "rolling" phenomenon of leukocytes on the sinusoids of the liver. This is in agreement with other study where P-selectin was shown not to be involved in the initial neutrophil sequestration in hepatic sinusoids during endotoxemia.<sup>16</sup> However, in the same study, P-selectin was critically involved in neutrophil margination and diapedesis in centrilobular and portal veins of mice inoculated with interleukin-1, endotoxin, or tumor necrosis factor- $\alpha$ . Thus, the high up-regulation observed during our experiment suggests that sinusoidal ICAM-1 expression may play a crucial role in the early migration of neutrophils and macrophages to the liver. Furthermore, ICAM-1 has been shown to be essential for the neutrophil-dependent injury of hepatocytes seen during endotoxemia in galactosamine-sensitized mice.<sup>17</sup> After the extensive ICAM-1 sinusoidal expression that lasted to day 3 p.i., only sinusoidal up-regulation surrounding inflammatory lesions and portal vessels was detected through the experiment. This more restricted expression suggests that the organism may direct and recruit inflammatory cells to those places where *Listeria* has been able to survive and multiply. This expression was maximum on day 5 p.i., when bacterial replication and inflammation in the liver were most pronounced. Intense periportal inflammation and the presence of *Listeria* free and within inflammatory cells in the lumen of bile ducts could be seen at the same time that expression of ICAM-1 was induced in biliary epithelial

cells, maybe reflecting a mechanism to reduce both inflammation and bacterial burden from the liver by bile excretion. It has been shown that during the period of maximal hepatic bacterial replication in systemic murine listeriosis, *Listeria* is eliminated through the biliary system.<sup>18</sup>

As in the liver, no expression of any selectin was detected through the experiment in splenic red pulp sinusoidal cells, and only up-regulation of ICAM-1 was demonstrable. The sinusoidal nature of the vascular system in the spleen where blood cells are allowed to have intimate contact with endothelial cells and macrophages in the marginal sinuses of the red pulp could explain, in the same manner that in the liver, the absence of selectin expression and the no necessity of the selectin-mediated rolling in this organ. In lymph nodes even though the immunohistochemical reaction was faint, expression of both P-selectin and ICAM-1 was correlated with leukocyte recruitment to lymph nodes through high endothelial venules.

CNS involvement is a common feature during listeriosis of humans and other animal species.<sup>6,19</sup> However, neither the precise mechanism of leukocyte migration across the blood-brain-barrier nor the signals attracting leukocytes to the CNS are completely understood. In this study, and a previous report,<sup>5</sup> the occurrence of CNS lesions was a late phenomenon after infection and was coincident with the onset of a period of bacteremia. As previously reported, persistent bacteremia is required for the invasion of the murine CNS by *L. monocytogenes* during experimental murine listeriosis using the intravenous route of infection.<sup>2</sup> In our experiment, and in the same way as in the liver and spleen, induction and up-regulation of P-selectin and ICAM-1 in the CNS occurred on day 1 p.i. However, neither inflammation nor *Listeria* antigen were evident until day 3 p.i., when animals showed slight pyogranulomatous leptomeningitis associated with *Listeria* antigen. Interestingly, leptomeningeal inflammation was more evident in the hippocampal sulcus where endothelial P-selectin and ICAM-1 as well as meningeal ICAM-1 were strikingly up-regulated at the time lesions appeared. This indicates that both molecules may play a key role in the recruitment of leukocytes and development of meningitis during experimental murine listeriosis. Supporting these findings, after intracerebral lipopolysaccharide (LPS) inoculation, neutrophil cuffing around ICAM-1-positive vessels in the hippocampal sulcus,<sup>20</sup> and P-selectin expression in almost all veins and venules in the leptomeninges were observed.<sup>21</sup> Contribution of endothelial selectins to the development of meningitis has been shown in a cytokine-induced meningitis model in mice deficient for P- and E-selectin.<sup>22</sup> ICAM-1 has also been reported to be critically involved in the early phase of bacterial meningitis in rats after intracisternal inoculation of pneumococcal cell wall.<sup>27</sup> Expression of ICAM-1 in the subarachnoid connective tissue has been previously shown after LPS inoculation of mice and could contribute to leukocyte adhesion and migration along the subarachnoid space after vascular extravasation.<sup>24</sup> In our experiment ventriculitis/choroiditis followed leptomeningitis and was not associated with P-selectin

and ICAM-1 expression on the choroid sinusoidal endothelial cells but with the expression of ICAM-1 on choroidal and ependymal cells. Furthermore, *Listeria* was first detected in association with meningeal inflammation whereas choroid plexus did not show any lesion at that time. This suggests that in this model, inflammatory cells first enter the subarachnoid space through meningeal vessels and not through the choroid plexus as it had been previously suggested.<sup>9</sup> Similar results regarding the time-course of CNS inflammation has been previously reported after intracerebral infection with *L. monocytogenes*.<sup>25</sup> Although our results suggest the possible route taken by leukocytes to reach the subarachnoid space, the way through which *Listeria* arrives to the CNS remains unclear. It has been suggested that some neurotropic bacteria gain access to the cerebrospinal fluid (CSF) through the choroid plexus carried by bacteria-laden macrophages.<sup>6,23</sup> In our conditions, it seems unlikely that *L. monocytogenes* enters the CNS through the choroid plexus, suggesting that probably reaches the CSF through meningeal vessels. In fact, early lesions affecting the ventricular system respected the integrity of the choroidal epithelial cells without apparent inflammatory exocytosis through them, and consisted of an accumulation of inflammatory cells together with numerous *Listeria* in the ventricles. The time course and the histopathological characteristics of the observed lesions indicate that the development of choroiditis could be the consequence of passive accumulation of *Listeria* free and within phagocytes from the subarachnoid space. Furthermore, inflammatory cells could reach the ventricular space from periventricular vessels, which had marked ICAM-1 expression associated with margination and diapedesis when ventricular inflammation was present. Constitutive expression of ICAM-1 on choroid plexus epithelial cells has been reported to function as a costimulatory molecule in antigen presentation and to maintain the proper scavenger function of ependymal cells.<sup>24,26</sup> Intense inflammation in the CSF could be responsible for the marked up-regulation of ICAM-1 epithelial expression on the choroid plexus as well as the induction on some ependymal cells promoting the adhesion of leukocytes helping them to move along the ventricles to scavenge their surface.

As the CNS, the heart was a commonly affected organ during the late phase of the infection. Endothelial expression of ICAM-1 seems to be involved in the development of myocardial inflammatory infiltrates, which could play an important role on mortality during systemic murine listeriosis.

In summary, strong up-regulation of P-selectin and ICAM-1 occurs during the course of experimental murine listeriosis. This expression is correlated with leukocyte recruitment during murine listeriosis, especially to the liver and CNS. Expression of P-selectin and up-regulation of ICAM-1 in meningeal vessels, especially in those located in the hippocampal sulcus, associated with the initial meningeal inflammation suggest that leukocytes probably reach the CNS through these vessels during experimental murine listeriosis. Additional studies are needed to find out the route taken by *L. monocytogenes* to enter the CNS.

## References

- McKenss GB: Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 1962, 116:381-406
- Berche P: Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microbiol Pathog* 1995, 18:323-326
- Conlan JW: Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J Med Microbiol* 1996, 44:295-302
- Marco AJ, Altimira J, Prats N, López S, Domínguez L, Domingo M, Briones V: Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microbiol Pathog* 1997, 23:255-263
- Marco AJ, Prats N, Ramos JA, Briones V, Blanco M, Domínguez L, Domingo M: A microbiological, histopathological, and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* 1992, 107:1-9
- Prats N, Briones V, Blanco M, Altimira J, Ramos JA, Domínguez L, Marco A: Chorditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992, 11:744-777
- Conlan JW: Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, salmonella typhimurium, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1997, 65:630-635
- Czuprynski CJ, Brown JF: Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1996, 64:3946-3949
- Cronstein BN, Weissmann G: The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993, 36:147-157
- Lasky L: Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992, 258:964-969
- Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990, 346:425-434
- López S, Borrás D, Juan-Sallés C, Prats N, Domingo M, Marco A: Immunohistochemical detection of adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in formalin-fixed, paraffin-embedded mouse tissues. *Lab Invest* 1997, 77:543-544
- Domingo M, Ramos JA, Domínguez L, Marco AJ: Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. *J Vet Med* 1986, 33:537-542
- Henseler U, Steinbrink K, Goebeler M, Roth J, Vestweber D, Sorg C, Sunderkötter C: E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice. *J Pathol* 1996, 180:317-325
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF: GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989, 84:92-99
- Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, Hoover JL, Farhood A, Jaeschke H: Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature, and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Leukocyte Biol* 1998, 63:288-296
- Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H: Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 1995, 21:1632-1639
- Briones V, Blanco M, Marco AJ, Prats N, Fernández-Garayzabal JF, Suarez G, Domingo M, Domínguez L: Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. *Am J Vet Res* 1992, 53:191-193
- Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV: Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 1991, 4:169-183
- Bell MD, Perry VH: Adhesion molecule expression on murine cerebral endothelium following the injection of a proinflammatory or during acute neuronal degeneration. *J Neurocytol* 1995, 24:695-710
- Gotsch U, Jäger U, Dominis M, Vestweber D: Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- $\alpha$  in vivo. *Cell Adhes Commun* 1994, 2:7-14
- Tang T, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD: Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* 1996, 97:2485-2490
- Williams AE, Blakemore WF: Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis* 1990, 162:474-481
- Endo H, Sasaki K, Tonosaki A, Kayama T: Three-dimensional and ultrastructural ICAM-1 distribution in the choroid plexus, arachnoid membrane and dural sinus of inflammatory rats induced by LPS injection in the lateral ventricles. *Brain Res* 1998, 793:297-301
- Seebach J, Bartholdi D, Frei K, Spanaus K, Ferrero E, Widmer U, Isenmann S, Strieter RM, Schwab M, Pfister H, Fontana A: Experimental *Listeria* meningoencephalitis. *J Immunol* 1995, 155:4367-4375
- Steffen BJ, Butcher EC, Schulz M, Engelhardt B: Icam-1, Vcam-1, and MadCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am J Physiol* 1996, 148:1819-1838
- Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U: Anti Icam-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 1995, 63:63-68

## Critical Role of Neutrophils in Eliminating *Listeria monocytogenes* from the Central Nervous System during Experimental Murine Listeriosis

SANTIAGO LÓPEZ,<sup>1</sup> ALBERTO JESÚS MARCO,<sup>1\*</sup> NEUS PRATS,<sup>1</sup>  
 AND CHARLES J. CZUPRYNSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Animal Productions, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain, and <sup>2</sup>Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin—Madison, Madison, Wisconsin 53706

Received 10 December 1999/Returned for modification 10 February 2000/Accepted 3 May 2000

**Neutrophils are the main inflammatory cell present in lesions involving the central nervous system (CNS) during human and murine listeriosis. In this study, administration of the neutrophil-depleting monoclonal antibody RB6-8C5 during experimental murine listeriosis facilitated the multiplication of *Listeria monocytogenes* in the CNS. These data suggest that neutrophils play a key role in eliminating bacteria that gain access to the CNS compartment. In addition, we provide evidence that their migration into the CNS may be necessary for the subsequent recruitment of macrophages and activated lymphocytes.**

Experimental murine listeriosis has long served as a general model for the study of cellular immunity to intracellular bacteria (14) and as an animal model for human listeriosis (1, 3, 12, 14). The early stages of listeriosis are characterized by a rapid influx of neutrophils and macrophages into the liver and the spleen, which are the organs where listeriae are trapped during systemic infection (14). The role of neutrophils in the early resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection has been studied using the antigramulocyte monoclonal antibody (MAb) RB6-8C5. Administration of this MAb renders mice severely neutropenic for 2 to 3 days after inoculation (5, 16, 17). Neutrophils were found to play a critical role in reducing the bacterial burden in the liver and spleen during the first 3 days postinfection (PI) (2, 4–7, 11, 16, 17). Neutropenic mice die rapidly after inoculation with a sublethal dose of *L. monocytogenes*, due to massive bacterial multiplication in various organs, especially in the liver and spleen.

Central nervous system (CNS) involvement is a common feature of human listeriosis that accounts for the high mortality rate and neurological sequelae reported to occur in infected human beings (10). Neutrophils are the main inflammatory cell present in histopathological sections from the CNS lesions (i.e., meningitis, ventriculitis and choroiditis, and rhombencephalitis) that can develop during the course of human or experimental murine listeriosis (1, 3, 10, 13, 15). However, the role of neutrophils in the development or prevention of these CNS lesions is not well understood. CNS involvement occurs late after infection and has been reported to be highly dependent on the level and duration of bacteremia (3). Bacteremia in turn is induced by rapid bacterial multiplication in the liver and the spleen (3). A rapid influx of neutrophils into the subarachnoid space, after the arrival of *L. monocytogenes* in the CNS compartment, has been reported. This polymorphonuclear leukocyte recruitment process has been related to the enhanced expression of adhesion molecules (i.e., P-selectin and intercel-

lular adhesion molecule 1 [ICAM-1]) in subarachnoid venules (13). Recruited neutrophils are thought to contribute to the elimination of *L. monocytogenes*, although they also could be involved in the development of progressive brain injury via the release of harmful mediators.

To elucidate the role of neutrophils in the pathogenesis of CNS lesions during experimental murine listeriosis, we depleted mice of neutrophils at a time when they had already emigrated into the liver and spleen but before CNS lesions became evident. To do this, 8- to 12-week-old female CD1 mice (Charles River Laboratories, Indianapolis, Ind.) were inoculated subcutaneously in the lumbar zone with  $10^9$  CFU of viable *L. monocytogenes* strain EGD. At 60 or 84 h PI, mice were given an intraperitoneal injection of 250  $\mu$ g of the RB6-8C5 MAb. Control mice were injected intraperitoneally with rat immunoglobulin G instead of the RB6-8C5 MAb. Wright-stained blood smears were prepared to verify neutrophil depletion. Groups of mice were killed by halothane overdose on days 2, 4, 5, 6, and 8 PI. Samples of liver, spleen, and brain tissue were removed, homogenized, and plated on blood agar to estimate viable bacterial counts. In addition, blood collected from the vena cava was also plated to detect bacteremia. For histopathological evaluation, organ samples were removed, fixed in 10% buffered formalin, and processed by routine procedures. Bacterial counts were analyzed using one-way analyses of variance. Tukey's tests were used to establish post hoc differences among different treatments for each day PI.

As previously reported, administration of the RB6-8C5 MAb to *L. monocytogenes*-infected mice significantly increased bacterial counts in the liver and spleen (Table 1). Mice inoculated with this neutrophil-depleting antibody at 60 h PI were unable to eliminate the listeriae from their livers and spleens. Mice so treated died or were euthanized because of their morbidity between days 4 and 6 PI. Mice inoculated with the RB6-8C5 MAb at 84 h PI also exhibited higher bacterial counts in the spleen and liver than did control animals, although these mice seemed better able to control the infection, as reflected by their progressively decreased bacterial levels until the end of the experiment.

As previously reported (4, 6, 7, 16), histopathological evaluation of the liver sections of mice treated with the RB6-8C5

\* Corresponding author. Mailing address: Histologia i Anatomia Patològica, Departament de Patologia i Produccions Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: 34-3-5811420. Fax: 34-3-5813142. E-mail: Alberto.Marco@cc.uab.es.

TABLE 1. Effect of RB6-8C5 MAB administration on the *L. monocytogenes* bacterial count in the spleens, livers, and brains of infected mice

Days after challenge	Time of MAB RB6-8C5 treatment (h PI) <sup>b</sup>	Mean log <sub>10</sub> CFU of <i>L. monocytogenes</i> ± SEM <sup>a</sup> in:		
		Spleen	Liver	Brain
2	—	7.23 ± 0.95	6.10 ± 1.12	2.32 ± 1.17
4	—	8.41 ± 0.11	8.75 ± 0.15	4.99 ± 0.46
	60	8.91 ± 0.19	8.19 ± 0.11	6.20 ± 0.71
5	—	6.76 ± 1.0	6.17 ± 1.08	2.93 ± 1.04
	60	8.68 ± 0.07	8.51 ± 0.13	4.79 ± 0.23
	84	7.75 ± 0.70	7.65 ± 0.63	4.42 ± 2.22
6	—	3.43 ± 0.32 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0.62 ± 0.62 <sup>c</sup>
	60	8.64 ± 0.26 <sup>a,d</sup>	7.95 ± 0.05 <sup>a,d</sup>	3.98 ± 0.02 <sup>a,d</sup>
	84	6.01 ± 1.07	4.97 ± 0.74 <sup>c</sup>	1.37 ± 0.83

<sup>a</sup> Groups of mice were inoculated with the RB6-8C5 MAB at 60 or 84 h after subcutaneous infection with *L. monocytogenes*. There were four animals per group.

<sup>b</sup> —, no MAB treatment.

<sup>c</sup> Mean for three mice.

<sup>d</sup> Value differs significantly ( $P < 0.05$ ) from that for the control.

<sup>e</sup> Value differs significantly ( $P < 0.05$ ) from those for the control and the 60-h treatment group.

MAB at 60 h PI revealed large areas of bacterial replication within hepatocytes, without apparent inflammatory cell infiltration. Splenic lesions in these mice consisted of a necrotizing splenitis with a marked lymphoid depletion. Large numbers of listeriae could be seen mainly located under the splenic capsule, as well as around splenic blood vessels. These severe lesions persisted through the end of the experiment. Hepatic lesions in animals inoculated with the RB6-8C5 MAB at 84 h PI exhibited small areas of bacterial replication with foci of granulomatous inflammation. On day 5 PI two animals of this group had lesions consisting almost entirely of foci of heavily infected hepatocytes with a paucity of inflammatory cells. These mice displayed less severe pyogranulomatous splenic lesions than mice that received the RB6-8C5 MAB at 60 h PI.

Thus, in our experimental model, neutrophils seem to be essential for limiting listerial multiplication in the liver and the spleen during the first 4 days of experimental listeriosis. After day 4 PI, acquired resistance may be sufficient to allow RB6-8C5 MAB-treated mice to survive, although they are not as efficient as control mice in limiting bacterial growth. Two of eight mice inoculated with the RB6-8C5 MAB in the present study developed hepatic and splenic lesions with signs of uncontrolled bacterial growth. This finding suggests that these mice were unable to control the infection before administration of the neutrophil-depleting RB6-8C5 MAB. Efficiently reducing the listerial burden in the liver and the spleen during the first 4 days of infection is likely to be crucial for the development of a protective adaptive immune response.

Bacteremia has been previously reported to be required for invasion of the CNS during experimental murine listeriosis (3). Bacteremia lasted through the end of the experiment (day 6 PI) in the RB6-8C5 MAB-treated groups ( $6.67 \pm 0.85$  and  $2.88 \pm 1.48 \log_{10}$  CFU/ml, in the group depleted of neutrophils at 60 and 84 h PI respectively), whereas it was resolved after day 4 PI in the control group. Consistent with the prolonged bacteremia, CNS lesions were more numerous in the RB6-8C5 MAB-treated groups of mice. Of the mice inoculated with the RB6-8C5 MAB at 60 and 84 h PI, 55 and 50% respectively, had CNS lesions, compared to 16% of the controls. In addition to

the increased frequency of CNS lesions in the RB6-8C5 MAB-treated mice, striking differences between the histopathological appearance of CNS lesions in RB6-8C5 MAB-treated mice and that of CNS lesions in control mice were also observed. Typical lesions in control mice consisted of pyogranulomatous meningitis with few intralosomal bacteria. By contrast, two different lesional patterns were found in RB6-8C5 MAB-inoculated mice. Lesions observed at 36 h after RB6-8C5 MAB treatment consisted of large numbers of bacteria in the leptomeninges, with few inflammatory cells. Curiously, in all these cases, free listeriae were located mainly in the meningeal tissue of the choroid velum over the fourth ventricle (Fig. 1); the choroid plexus was not affected. In contrast to a recent report of large numbers of neutrophils associated with subarachnoid vessels in the hippocampal sulcus during experimental murine listeriosis (13), we observed only a few inflammatory cells, or listeriae, in the subarachnoid space in RB6-8C5 MAB-treated mice. On days 5 and 6 PI, two animals in each RB6-8C5 MAB-treated group had mild CNS lesions similar to those of control mice. These consisted of mild mononuclear meningitis without visible intralosomal bacteria. Most of the inflammatory cells seen infiltrating the subarachnoid compartment of RB6-8C5 MAB-inoculated mice had the histological appearance of immature cells of the myelomonocytic lineage. These cells stained dimly positive by immunohistochemistry (data not shown) for the neutrophil differentiation antigen 7/4 (12). Because the RB6-8C5 MAB specifically binds to and depletes mature neutrophils (4), it is not surprising that immature cells of the myelomonocytic lineage were released from the bone marrow into the bloodstream. These immature cells would be expected to have less bactericidal capability, resulting in poorer control of bacterial growth in the subarachnoid space.

An unexpected result of our study was that large numbers of listeriae were recovered from the brains of RB6-8C5 MAB-treated mice on day 4 PI, without any evidence of CNS lesions. We suggest that this reflects a greater level of bacteremia, resulting from the inability of RB6-8C5 MAB-treated mice to restrict listerial multiplication in the livers and the spleens and their impaired ability to clear listeriae once they reached the CNS. Intracellular listeriae were observed within circulating macrophages in blood smears from all the treatment groups.

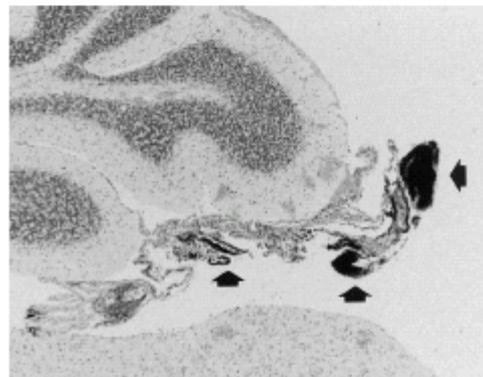


FIG. 1. Large amounts of *L. monocytogenes* located in the meningeal tissue forming the choroid velum over the fourth ventricle 36 h after RB6-8C5 MAB treatment (arrowheads). The sample was Gram stained. Magnification,  $\times 42.5$  (original magnification,  $\times 50$ ).

Furthermore, and as previously reported (9), listeriae were occasionally observed within circulating neutrophils in blood smears from control animals. Although *L. monocytogenes* can gain access to the CNS compartment within phagocytic cells (3, 8, 9, 15), in vitro studies have also shown that *L. monocytogenes* can invade and multiply within microvascular endothelial cells (18). We speculate that the depletion of blood neutrophils in RB6-8C5 MAb-treated mice allowed more listeriae to circulate freely in the bloodstream, perhaps facilitating endothelial invasion and multiplication within the brain compartment, leading in turn to lesion development.

The significance of our observation of large numbers of extracellular gram-positive rods in the roof of the fourth ventricle is unknown. The concomitant presence of inflammatory cells in the subarachnoid space, rather than at the site where most of the listeriae were present, suggests that *L. monocytogenes* and inflammatory cells may utilize different mechanisms to reach the CNS. Some of us recently reported that the arrival of inflammatory cells in the subarachnoid space is related to the increased expression of P-selectin and ICAM-1 in subarachnoid vessels, especially those located in the hippocampal sulcus (13). In the present study, we observed no significant difference in the endothelial expression of P-selectin and ICAM-1 by RB6-8C5 MAb-treated mice, compared to that of control mice (data not shown). In the absence of neutrophils, other inflammatory cells, with the exception of a few immature myelomonocytic cells, were not detected in the subarachnoid space. This finding suggests that the migration of neutrophils into the brain is a prerequisite for the subsequent recruitment of macrophages and activated lymphocytes. Deficient macrophage recruitment to other organs during experimental murine listeriosis in neutrophil-depleted mice has been reported previously (4, 5, 16).

In conclusion, the administration of the neutrophil-depleting RB6-8C5 MAb during experimental murine listeriosis enhanced the multiplication of *L. monocytogenes* and lesion formation in the CNS of infected mice. These data indicate that neutrophils are crucial for preventing the access or multiplication of *L. monocytogenes* in the CNS compartment. Furthermore, the initial emigration of neutrophils into the CNS may be necessary for the subsequent recruitment of macrophages and activated lymphocytes.

This work was supported by the Comisión Interdepartamental de Ciencia y Tecnología (CICYT) AGP93-C02-02, and by funds from the U.S. Department of Agriculture and the School of Veterinary Medicine of the University of Wisconsin—Madison.

Editor: R. N. Moore

## REFERENCES

1. Altshuler, J., N. Prats, S. López, M. Domingo, V. Briones, L. Dominguez, and A. Marco. 1999. Repeated oral dosing with *Listeria monocytogenes* in mice as a model of central nervous system listeriosis in man. *J. Comp. Pathol.* **121**: 117-125.
2. Appelberg, R., A. J. Castro, and M. T. Silva. 1994. Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. *Immunology* **83**:302-307.
3. Berche, P. 1995. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* **18**:323-336.
4. Conlan, J. W., and R. J. North. 1994. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **179**: 259-268.
5. Conlan, J. W. 1997. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **65**:630-635.
6. Crupyski, C. J., J. F. Brown, R. D. Wagner, and H. Suidberg. 1994. Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infect. Immun.* **62**:5161-5163.
7. Crupyski, C. J., C. Theben, and J. F. Brown. 1996. Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **64**: 3046-3049.
8. Dreves, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Pector, and P. A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* **63**:4268-4276.
9. Dreves, D. A. 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect. Immun.* **67**:3512-3517.
10. Fauber, J. M., and P. I. Peterka. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.
11. Gregory, S. H., A. J. Saginval, and E. J. Wing. 1996. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J. Immunol.* **157**:2514-2520.
12. Hirsch, S., and S. Gordon. 1983. Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 74. *Immunogenetics* **18**:129-139.
13. López, S., N. Prats, and A. J. Marco. 1999. Expression of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. *Am. J. Pathol.* **155**:1391-1397.
14. Madhans, G. B. 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* **116**: 381-406.
15. Prats, N., V. Briones, M. Blanco, J. Altshuler, J. A. Ramos, L. Dominguez, and A. Marco. 1992. Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 764-777.
16. Bakhmiretch, A. L. 1995. Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Leukoc. Biol.* **57**: 827-831.
17. Rogers, H. W., and E. R. Unanue. 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* **61**: 5090-5095.
18. Wilson, S. L., and D. A. Dreves. 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **178**: 1658-1666.

## ***4. DISCUSIÓN***

En este trabajo, hemos desarrollado técnicas inmunohistoquímicas para la detección de las moléculas de adhesión endotelial E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en tejidos de ratón fijados en formol e incluidos en parafina. La estandarización de estas técnicas ha sido llevada a cabo mediante la caracterización de su expresión en ratones normales y en un modelo de activación endotelial por lipopolisacárido bacteriano (LPS). Gracias a la utilización de estas técnicas, hemos caracterizado la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina, E-selectina e ICAM-1 durante el curso de la listeriosis murina experimental por vía subcutánea. El estudio cronológico de la expresión de estas moléculas *in situ*, junto a la caracterización histopatológica y microbiológica de la infección, nos ha permitido estudiar el papel que juegan en el reclutamiento leucocitario a los órganos diana, especialmente al sistema nervioso central. Adicionalmente, se han dilucidado algunos aspectos relativos a la importancia de los neutrófilos en el control y la eliminación de *Listeria monocytogenes* en el sistema nervioso central.

El estudio de la expresión de E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en diferentes modelos experimentales de infección e inflamación ha sido llevado a cabo tradicionalmente en muestras congeladas (Dustin y col, 1986; Fries y col, 1993; Kuzu y col, 1993; Gotsch y col, 1994; Henseleit y col, 1996, ). Si bien esta técnica tiene la ventaja de una mejor conservación antigénica, era necesaria la puesta a punto de una técnica inmunohistoquímica que permitiera detectar la expresión de E, P-selectina e ICAM-1 en tejidos de ratón fijados en formol, e incluidos en parafina; hecho que permite una mejor resolución morfológica y una visualización más precisa de la localización de estas moléculas y su posible asociación a las lesiones presentes en los órganos estudiados. Adicionalmente, la utilización de estas técnicas permiten la realización de estudios retrospectivos. Con objeto de poner a punto estas técnicas, se estandarizó la expresión de estas moléculas en ratones normales y en ratones sometidos a un modelo de activación endotelial mediante la inyección sistémica de LPS.

E-selectina no fue detectada en los animales normales en ninguno de los órganos estudiados. La ausencia de expresión constitutiva de E-selectina ha sido descrita

previamente en estudios *in vitro* e *in vivo* tanto utilizando técnicas de biología molecular como mediante técnicas inmunohistoquímicas en tejidos congelados. Únicamente, tras activación endotelial, E-selectina es rápidamente sintetizada y expresada de forma transitoria en el endotelio (Bevilacqua y col 1987, Fries y col, 1993, Henseleit y col, 1996; Neumann y col, 1996).

Es nuestro modelo de activación endotelial, E-selectina fue principalmente detectada en la superficie endotelial de vénulas pero también en capilares, arteriolas y en grandes vasos de la mayoría de órganos estudiados, con la excepción del parénquima nervioso y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos.

La expresión de E-selectina *in vivo* ha sido previamente estudiada en tejidos congelados humanos y animales siendo los resultados variables posiblemente debido a las diferentes condiciones en las que fue investigada. En un modelo de activación endotelial similar al utilizado en nuestro trabajo, la expresión de E-selectina fue detectada en vénulas del pulmón, riñón y corazón de ratones inoculados con LPS (Fries y col, 1993). Neumann y col., describen la expresión de E-selectina en vasos pulmonares pero no en el riñón ni en el hígado tras estimulación con TNF- $\alpha$  (Neumann y col, 1996). Adicionalmente, la expresión de E-selectina ha sido también descrita en vénulas de la dermis, de la mucosa y submucosa intestinal y en los capilares glomerulares renales en diferentes modelos de inflamación (Cotran y Pober, 1989; Munro y col, 1989; Bruijn y Dinklo, 1993; Nakamura y col, 1993; Silber y col, 1994).

En nuestro modelo, algunos vasos meníngeos y células sinusoidales hepáticas mostraron un patrón de expresión diferente caracterizado por la presencia de una reacción puntiforme débil en el interior del citoplasma. La detección de E-selectina en esta localización podría corresponder al compartimento lisosomal, descrito recientemente, donde E-selectina es rápidamente internalizada tras su expresión en la membrana celular (Kuijpers y col, 1994).

ICAM-1 fue detectada de forma constitutiva en células endoteliales - principalmente en vasos de mediano calibre y capilares- de todos los órganos estudiados tal y como ha sido descrito en tejidos congelados en la especie humana (Dustin y col, 1986; Kuzu y col, 1993; Kang y col, 1996). Tras la activación por LPS, en nuestros experimentos ICAM-1 se sobreexpresó de manera evidente, tanto en lo relativo a la intensidad de la inmunotinción como en lo referente a la cantidad de vasos reactivos.

Además de la expresión endotelial de ICAM-1, y como ha sido ya descrito por otros autores, ICAM-1 fue también detectada en células epiteliales de los plexos coroideos, queratinocitos basales, células epiteliales pulmonares y en folículos linfoides de los órganos linfoides secundarios (Dustin y col, 1986; Koopman y col, 1991; Silber y col, 1994; Bell y Perry, 1995; Kang y col, 1996; Steffen y col, 1996).

La expresión de P-selectina en tejidos humanos *in vitro* e *in vivo*, ha sido descrita en los corpúsculos de Weibel-Palade de células endoteliales, en plaquetas y en megacariocitos (McEver y col, 1989). En nuestros experimentos, P-selectina fue detectada en megacariocitos y en plaquetas circulantes de ratones control pero no en el endotelio de los diferentes órganos estudiados. Sin embargo, la expresión de P-selectina en la superficie endotelial fue claramente detectada tras la infección por *L. monocytogenes*. Este hecho sugiere que el epitopo de P-selectina reconocido por el anticuerpo utilizado en nuestro trabajo está probablemente enmascarado cuando la molécula se encuentra en el interior de los corpúsculos de Weibel-Palade de la célula endotelial (Coughlan y col, 1994). Es conocido que P-selectina se halla preformada en los corpúsculos de Weibel-Palade de las células endoteliales y que, tras la activación del endotelio, es rápidamente transportada a la superficie celular, localización funcional de la molécula (McEver y col, 1989). Es en esta localización donde P-selectina parece ser detectada por el anticuerpo utilizado en nuestro trabajo.

En resumen, los resultados obtenidos mediante la detección de la expresión de E-selectina, P-selectina e ICAM-1 en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina están en concordancia con los resultados obtenidos previamente por otros autores en tejidos congelados. Sin embargo, gracias a la mejor preservación de la morfología tisular, la utilización de esta técnica permite una localización más precisa de la expresión de estas moléculas, especialmente en el curso de procesos inflamatorios. Adicionalmente, la disponibilidad de estas técnicas nos ha permitido establecer el patrón de expresión de estas moléculas durante la listeriosis murina experimental, donde la migración de neutrófilos y monocitos/macrófagos a los lugares de multiplicación bacteriana es esencial en la defensa inicial contra la infección (MacKanness 1962; Czuprinsky y col, 1994; Conlan, 1997).

En el modelo murino de listeriosis por vía subcutánea, utilizado en nuestro trabajo, las lesiones típicas de listeriosis septicémica que afectan al hígado, bazo y nódulos linfáticos comenzaron a ser evidentes hacia el 2<sup>o</sup> dpi. El desarrollo de estas lesiones fue precedido el 1<sup>er</sup> dpi por la inducción de la expresión endotelial de P-selectina y la sobre-expresión de ICAM-1 prácticamente en todos los órganos estudiados. Este incremento generalizado de la expresión de ambas moléculas refleja posiblemente un estado de activación endotelial inespecífico, debido a la diseminación sistémica de la bacteria, que permitiría a los leucocitos explorar el organismo en busca del origen del estímulo inflamatorio. Tras esta primera fase de activación endotelial inespecífica, la sobre-expresión de ambas moléculas estuvo principalmente asociada a la presencia de lesiones inflamatorias en los órganos diana de la infección.

A diferencia de lo observado en el modelo de activación endotelial por LPS, E-selectina fue detectada únicamente de forma esporádica en nuestro modelo de listeriosis murina. La expresión de E-selectina en únicamente un bajo número de capilares y vénulas de un reducido número de animales pudiera ser debida a una baja sensibilidad de la técnica. Sin embargo, debido al hecho de que pudo ser detectada en la mayoría de órganos en nuestro modelo de estimulación endotelial por LPS, la posibilidad de que E-selectina juegue un papel menos importante que P-selectina e ICAM-1 en el reclutamiento de células inflamatorias durante la listeriosis murina experimental no puede ser descartada.

En el hígado, ICAM-1 fue sobreexpresada rápida e intensamente en los sinusoides hepáticos, en las venas centrolobulillares y, de forma muy débil, en vasos del espacio porta, al mismo tiempo que P-selectina era expresada en venas y capilares del espacio porta y también en las venas centrolobulillares. Sin embargo, P-selectina no fue expresada en ningún momento en los sinusoides hepáticos. Esta misma distribución de la expresión de ambas moléculas en el hígado ha sido previamente descrita en un modelo de endotoxemia murina (Essani y col, 1998). De la misma manera, E-selectina tampoco fue detectada en las células endoteliales de los sinusoides hepáticos en ninguno de los animales y a diferencia de la P-selectina únicamente dos animales mostraron una débil expresión en algunos capilares y vénulas del espacio porta durante los días tercero y cuarto pi.

Se acepta generalmente que el contacto inicial de los leucocitos con la célula endotelial ocurre a través de la interacción entre moléculas de la familia de las selectinas y sus ligandos, provocando un fenómeno de «rolling» y de frenado de los leucocitos (Cronstein y Weissmann, 1993; Adams y Shaw, 1994; Elangbam y col, 1997). Sin embargo, la ausencia de expresión de selectinas en las células sinusoidales en nuestros experimentos refleja posiblemente la falta de necesidad del fenómeno de «rolling» de los leucocitos en los sinusoides hepáticos. En concordancia con nuestros resultados, Essani y col, muestran que la utilización de anticuerpos contra P-, L- y E-selectina en un modelo de endotoxemia murino, no tiene ningún impacto en el número de PMNN presentes en los sinusoides hepáticos (Essani y col, 1998). De hecho, ha sido sugerido que en el hígado, durante un proceso inflamatorio, los neutrófilos pueden ser atrapados en el sinusoides hepático únicamente de forma mecánica como resultado de un aumento del volumen celular de las células endoteliales activadas, una constricción sinusoidal activa y una disminuida capacidad deformable del neutrófilo (Essani y col, 1998). Este hecho, facilita probablemente la interacción de las integrinas del neutrófilo activado con ICAM-1 en las células sinusoidales sin necesidad de un contacto previo mediante las selectinas. Sin embargo, la expresión de P-selectina en el endotelio venoso a nivel centrolobulillar y portal sugiere que P-selectina contribuye probablemente al reclutamiento leucocitario en estas localizaciones y no a nivel de los sinusoides. Apoyando esta interpretación, Essani y col, muestran en un modelo de endotoxemia, que la administración de un anticuerpo anti-P-selectina aunque no reduce el número de PMNN en los sinusoides hepáticos sí provoca una disminución de la marginación leucocitaria tanto a nivel centrolobulillar como a nivel portal (Essani y col, 1998). En este mismo modelo, la administración de un anticuerpo anti-ICAM-1 no previene la acumulación de neutrófilos en el sinusoides aunque sí el daño del parénquima hepático, sugiriendo que la expresión de ICAM-1 en los sinusoides es necesaria para la extravasación de los neutrófilos pero no para su “secuestro” en el espacio sinusoidal (Essani y col, 1995). Gregory y col., han sugerido que la fuerte expresión de ICAM-1 en el sinusoides hepático, que ocurre rápidamente tras la infección por *Listeria monocytogenes*, facilita la adhesión de PMNN a las células de Kupffer y la posterior eliminación de la *Listeria* (Gregory y col, 2002).

Es de destacar que tras la primera fase de expresión de ambas moléculas ocurrida durante los dos primeros días post-infección, una segunda fase de activación endotelial fue observada entre los días 5-8 pi coincidiendo con el momento de mayor prevalencia y gravedad de las lesiones hepáticas y cuando los recuentos bacterianos fueron máximos en este órgano. Sin embargo, a diferencia de la primera fase donde se observó una activación endotelial generalizada, en esta segunda fase se pudo observar un aumento de la expresión de P-selectina y una re-localización de ICAM-1 a nivel de los espacios porta claramente asociada a la presencia de infiltrados inflamatorios periportales. La fuerte expresión de ICAM-1 en los sinusoides quedó restringida a las zonas adyacentes a las lesiones inflamatorias. Este hecho podría ser interpretado como un intento del organismo de reclutar las células inflamatorias de forma más localizada a esos lugares donde la *Listeria* ha sido capaz de sobrevivir y multiplicarse, con el objetivo fundamental de fagocitar y eliminar las bacterias de una forma más eficiente. Al mismo tiempo, esta estrategia, evita posiblemente un daño hepático extenso resultado de una posible migración generalizada hacia el espacio sinusoidal. Adicionalmente, ICAM-1 fue detectada en la membrana de los hepatocitos de algunos animales. La expresión de ICAM-1 en hepatocitos infectados con *Listeria monocytogenes* ha sido demostrada *in vitro*, y tiene como consecuencia un incremento de la adherencia de neutrófilos asociada a un aumento del estrés oxidativo hacia los hepatocitos (Boury y col, 1995). En consecuencia, la expresión de ICAM-1 en los hepatocitos infectados con *Listeria* facilitaría la adhesión de los neutrófilos y la posterior lisis de la célula infectada permitiendo la exposición extracelular de las bacterias, así como su fagocitosis y eliminación. Adicionalmente, prevendría la diseminación de las bacterias a través del parénquima hepático (Conlan y North, 1991, 1992, 1993, Gregory y col, 1996).

Otro hallazgo relevante en nuestro experimento ha sido la expresión de ICAM-1 en el epitelio biliar coincidiendo con la presencia de colecistitis piogranulomatosas y de listerias libres y/o fagocitadas en los conductos biliares. Durante la infección por *Listeria monocytogenes*, y coincidiendo con el periodo de máxima multiplicación bacteriana, *Listeria* es eliminada por la vía entero-hepática a través del sistema biliar (Briones y col, 1992). Esta observación sugiere que ICAM-1 contribuye probablemente a la eliminación de la *Listeria* por la vía entero-hepática facilitando el paso de neutrófilos y macrófagos a través del epitelio biliar.

En resumen, en la fase inicial de la listeriosis murina experimental, los leucocitos son reclutados en el hígado posiblemente por dos vías migratorias diferentes, una vía selectina-independiente a través del sistema sinusoidal hepático y otra, siguiendo el mecanismo clásico donde la interacción previa mediada por P-selectina seguida de una interacción firme mediada por ICAM-1 permite la extravasación de los leucocitos a nivel post-sinusoidal y del espacio porta. Es de destacar que la máxima expresión de ambas moléculas en el espacio porta ocurre entre el 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> dpi, coincidiendo con la disminución de la expresión de ICAM-1 en el sinusoides y con la presencia de numerosos macrófagos en las lesiones inflamatorias. Esta observación sugiere que los PMNN que acceden al hígado en la fase inicial de la infección son probablemente reclutados a través del sistema sinusoidal, permitiendo una llegada rápida a los focos de infección; por el contrario, los monocitos/macrófagos son reclutados principalmente a nivel del espacio porta gracias a la fuerte expresión endotelial de P-selectina e ICAM-1.

De la misma forma que en el hígado, la ausencia de expresión tanto de P- como de E-selectina en el bazo, sugiere que debido al carácter sinusoidal de la circulación en este órgano, donde las células circulantes están en íntimo contacto con células endoteliales y macrófagos de la zona marginal de la pulpa blanca, el fenómeno de “rolling” mediado por las selectinas es probablemente innecesario. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otras moléculas como L-selectina, la cual está involucrada en la migración de linfocitos a los linfonodos a través de las vénulas de endotelio alto (VEA) (Girard y Springer, 1995).

La sobre-expresión - rápidamente tras la infección- de ICAM-1 en la zona marginal de la pulpa blanca y su expresión “de novo” en las arteriolas centrales y trabeculares, junto a la posterior presencia de la mayoría de las lesiones en estas localizaciones (zona marginal y en la vaina linfóide periarteriolar), sugiere que ICAM-1 participa de forma importante en el reclutamiento leucocitario en éste órgano, especialmente en la zona marginal de la pulpa blanca. De hecho, debido a las características de la vascularización esplénica, es en esta localización donde se produce el primer contacto entre la sangre y el parénquima esplénico. Adicionalmente, es en esta localización donde *Listeria* puede acceder a la pulpa

blanca posiblemente vehiculadas en el interior de macrófagos o libremente gracias a su capacidad de transmisión intracelular (Conlan,1996).

En los linfonodos, tal y como ha sido descrito previamente (Marco y col, 1991), las lesiones de carácter piogranulomatoso asociadas a la presencia de *Listeria* se localizaron principalmente en la zona paracortical de los nódulos linfáticos. Estas lesiones estuvieron acompañadas de la expresión de P-selectina e ICAM-1 en el endotelio de las VEA. El hecho de que únicamente los linfonodos con presencia de linfadenitis mostraran expresión de P-selectina e ICAM-1 en las VEA sugiere que ambas moléculas contribuyen probablemente al reclutamiento de células inflamatorias, especialmente PMNN, a través de este endotelio altamente especializado. Ha sido previamente sugerido que tras una infección sistémica, *Listeria monocytogenes* llegaría a la zona paracortical de los nódulos linfáticos posiblemente vehiculada en el interior de fagocitos siguiendo la vía de migración normal de estas células a éstos órganos (Marco y col, 1991). Probablemente, la llegada y la posterior multiplicación de *Listeria monocytogenes* en esta zona induce la expresión de P-selectina e ICAM-1 en las VEA favoreciendo así el reclutamiento de células inflamatorias hacia el linfonodo afectado. Este hecho explicaría la ausencia de expresión de ambas moléculas en linfonodos no lesionados.

El sistema nervioso central es un órgano comúnmente afectado durante el curso de la listeriosis en la especie humana y también en otras especies, siendo responsable de la alta mortalidad y de la presencia de posibles secuelas en los individuos afectados (Gray y Killinger, 1966; Farber y Peterkin, 1991; Schuchat y col, 1991). Cuando el SNC está afectado, las meningitis y meningoencefalitis purulentas son las lesiones más frecuentes en la listeriosis humana. Aunque con mucha menor incidencia, la presencia de abscesos en el tronco del encéfalo y/o cerebritis sin afección meníngea han sido también descritos (Mylonakis y col, 1998). Sin embargo, los mecanismos y vías de migración de los leucocitos a través de la barrera hemato-encefálica, así como la vía de entrada de la bacteria al SNC durante la listeriosis no han sido completamente elucidados.

En este estudio, y como ha sido previamente descrito por otros autores utilizando la vía de inoculación subcutánea (Prats y col, 1992), la aparición de lesiones nerviosas fue un fenómeno relativamente “tardío” tras la infección que coincidió con el periodo de máxima replicación bacteriana en el hígado y bazo y con un periodo de bacteriemia alrededor del 3<sup>er</sup> dpi. De hecho, la bacteriemia es probablemente debida a la liberación de listerias a la circulación desde las lesiones inflamatorias hepato-esplénicas con intensa replicación bacteriana (Prats y col, 1992; Berche, 1995). De la misma forma que por la vía subcutánea, cuando es utilizada la vía de infección intravenosa, la presencia de bacteriemia persistente parece ser también un evento necesario para el acceso de *Listeria monocytogenes* al SNC (Berche, 1995).

Como ocurrió en el resto de los órganos estudiados, rápidamente tras la infección y previamente a la aparición de lesiones nerviosas, se observó una inducción y una sobre-regulación generalizada de la expresión de P-selectina e ICAM-1 en el SNC. La expresión de ambas moléculas fue especialmente intensa en vénulas del espacio subaracnoideo y especialmente en aquellas situadas a nivel del surco del hipocampo. Sin embargo, esta expresión inicial no estuvo relacionada ni con la presencia de lesiones ni con la presencia de *Listeria*.

En el SNC, las primeras lesiones consistieron principalmente en una leptomeningitis purulenta/piogranulomatosa asociada a la presencia variable de listerias. Es de destacar que la reacción inflamatoria estuvo localizada principalmente en el espacio subaracnoideo situado a nivel del surco del hipocampo, localización donde la expresión endotelial de P-selectina e ICAM-1 era más intensa. Paralelamente, el infiltrado inflamatorio estuvo también relacionado con la expresión intensa de ICAM-1 en las meninges. Estas observaciones sugieren que tanto P-selectina como ICAM-1 participan en el reclutamiento de PMNN y monocitos/macrófagos hacia el espacio subaracnoideo durante la listeriosis murina experimental. Resultados similares han sido descritos tras la inyección intracraneal de LPS, donde los PMNN fueron únicamente observados alrededor de vasos localizados en la fisura del hipocampo, los cuales presentaron una fuerte expresión de ICAM-1 (Bell y Perry, 1995). De la misma manera, una fuerte inducción de la expresión de P-selectina ocurre en prácticamente todas las vénulas leptomeníngeas (Gotsch y col, 1994). La contribución de las selectinas al reclutamiento de células inflamatorias hacia el LCR

ha sido mostrada en un modelo de meningitis inducida por citocinas en ratones deficientes en E- y P-selectina (Tang y col, 1996). La importancia de ICAM-1 en el reclutamiento leucocitario inicial en el SNC ha sido también demostrado en un modelo de meningitis en ratas (Weber y col, 1995). Adicionalmente, se ha sugerido que la expresión de ICAM-1 en las leptomeninges puede promover la migración de los leucocitos a lo largo del sistema ventricular de una manera eficiente (Endo y col, 1998).

Resultados similares en cuanto al patrón de distribución lesional han sido descritos tras la inoculación intracerebral de *Listeria monocytogenes* (Seebach y col, 1995) y en un modelo de meningitis inducida por citocinas (Tang y col, 1996). En estos estudios, PMNN y macrófagos fueron detectados en primera instancia en las meninges provocando una gran exudación hacia el LCR. Este hecho, reafirma la hipótesis de que la ruta de llegada de las células inflamatorias al SNC está posiblemente relacionada con la expresión de P-selectina e ICAM-1 en los vasos del espacio subaracnoideo observados en nuestro modelo, y que esta vía de entrada es probablemente independientemente de la vía de entrada de la *Listeria* a éste órgano. Adicionalmente, la presencia de ventriculitis y coroiditis en nuestro modelo fue un fenómeno posterior a la inflamación meníngea y no estuvo relacionada con la expresión de P-selectina e ICAM-1 en el endotelio de los plexos coroideos, indicando que las células inflamatorias llegan al SNC principalmente a nivel de los vasos subaracnoideos y no a través del endotelio fenestrado de los plexos coroideos como ha sido sugerido previamente (Prats y col, 1992). Sin embargo, esta hipótesis no descarta la posible llegada de *Listeria monocytogenes* al SNC por otras vías.

A este respecto, dos mecanismos diferentes de acceso de *Listeria monocytogenes* al SNC han sido sugeridos. El primero postula que *Listeria monocytogenes*, libre en la sangre como consecuencia de su liberación a la circulación desde el hígado y bazo, podría adherirse y penetrar directamente en el endotelio de la barrera hematoencefálica. La capacidad de *Listeria monocytogenes* para penetrar y multiplicarse en células endoteliales de la microcirculación cerebral ha sido demostrada *in vitro* (Wilson y Drevets, 1998). Alternativamente, la segunda hipótesis sugiere que *Listeria* podría acceder al SNC vehiculada pasivamente en el interior de fagocitos (Drevets y col, 1995; Drevets, 1999; Drevets, 2001). De hecho, este mecanismo ha sido

demostrado en otras infecciones bacterianas del SNC como la meningitis porcina por *Streptococcus suis* (Williams y Blakemore, 1990). Ha sido sugerido que el endotelio fenestrado del plexo coroideo es quizás la vía de entrada de diferentes bacterias neurotrópicas al líquido cefalorraquídeo vehiculadas por células fagocitarias (Williams y Blakemore, 1990; Prats y col, 1992). Sin embargo, en nuestro modelo, este hecho parece improbable ya que la presencia de coroiditis/ventriculitis fue un fenómeno posterior a la presencia de meningitis. Adicionalmente, en las lesiones iniciales observadas a nivel ventricular, las células epiteliales de los plexos coroideos permanecieron intactas y no se observó exocitosis celular a través del epitelio. En concreto, las lesiones consistieron en una acumulación de gran número de células inflamatorias en el espacio ventricular - especialmente PMNN- y la presencia de numerosas listerias libres y en el interior de fagocitos. Estos resultados sugieren que el desarrollo de coroiditis es probablemente consecuencia de a la acumulación pasiva en el espacio ventricular de células inflamatorias provenientes del espacio subaracnoideo. Adicionalmente, la fuerte expresión de ICAM-1 en los vasos periventriculares asociada con imágenes de marginación celular y diapedesis sugiere que estos vasos contribuyen también al reclutamiento inflamatorio hacia el ventrículo. La fuerte sobre-regulación de ICAM-1 en las células epiteliales coroideas y en las células endimarias observadas en nuestro trabajo han sido también descrita en otros modelos inflamatorios del SNC (Deckert-Schlüter y col, 1994; Steffen y col, 1996; Endo y col, 1998). Probablemente, la inducción de ICAM-1 a lo largo de la superficie ventricular contribuye, de la misma manera que en la meninge, a mantener las células fagocitarias debidamente adheridas, favoreciendo de esta manera la migración hacia los focos de infección. Ha sido también sugerido que la expresión de ICAM-1 en el epitelio coroideo tiene una función co-estimuladora durante la presentación antigénica y de activación de las células epipléxicas (Steffen y col, 1996).

En resumen, en nuestro modelo, tras la infección por *Listeria monocytogenes*, la aparición de lesiones nerviosas coincide con un periodo de bacteriemia. Las lesiones iniciales consisten en una leptomeningitis purulenta asociada a la fuerte expresión endotelial de P-selectina e ICAM-1 en vénulas del espacio subaracnoideo, especialmente en aquellas situadas en la fisura del hipocampo. La afluencia masiva de PMNN al espacio subaracnoideo provoca la acumulación pasiva de células

inflamatorias y de listerias en los ventrículos provocando el desarrollo de coroiditis. La presencia de ventriculitis y coroiditis purulentas está acompañada de una fuerte expresión de ICAM1 en las células epiteliales del plexo coroideo y células endimarias, hecho que permite posiblemente a los leucocitos “rastrear” la superficie ventricular en busca de la bacteria. Adicionalmente, las células inflamatorias pueden acceder al ventrículo a partir de los vasos periventriculares, los cuales muestran también una fuerte expresión endotelial de ICAM-1.

Los PMNN son las principales células que acceden al SNC durante la listeriosis murina experimental (Prats y col, 1992; Berche, 1995; Altimira y col, 1999). En nuestro trabajo, adicionalmente a la identificación morfológica, la presencia de PMNN fue corroborada inmunohistoquímicamente mediante la utilización del anticuerpo F7/4 (Hirsch y col, 1983). Aunque la fuerte presencia de PMNN en el espacio subaracnoideo contribuye probablemente a la eliminación de *Listeria monocytogenes*, la secreción de mediadores inflamatorios y/o tóxicos por parte de los PMNN puede contribuir también al establecimiento de lesiones progresivas del parénquima cerebral.

Adicionalmente, aunque son los monocitos/macrófagos las células que han sido tradicionalmente consideradas como células potencialmente capaces de vehicular listerias en su interior y colaborar a la diseminación de la bacteria (Berche, 1995), el examen de frotis sanguíneos de los animales infectados en nuestro modelo muestra también la presencia de PMNN circulantes vehiculando listerias. Recientemente, Drevets ha mostrado que *Listeria* es capaz de circular en el torrente sanguíneo de forma libre y en el interior de macrófagos y de PMNN y que la capacidad invasora del SNC es mayor cuando las listerias son vehiculadas en el interior de fagocitos (Drevets , 1999).

En nuestro último trabajo, la depleción de la población de neutrófilos mediante la utilización del anticuerpo RB6-8C5 a 2.5 y 3.5 dpi estuvo correlacionada con un aumento de los recuentos sanguíneos de *Listeria monocytogenes* y con la presencia de una bacteriemia persistente. Este aumento de la carga bacteriana en la circulación sanguínea fue consecuencia de una mayor capacidad de replicación de la bacteria en los órganos diana de la infección especialmente el bazo y el hígado

como muestran los recuentos microbiológicos. En los órganos de los animales deplecionados de PMNN más precozmente, las lesiones consistieron en extensas áreas de parénquima con abundante multiplicación bacteriana sin la presencia evidente de reacción inflamatoria. Sin embargo algunos de los animales deplecionados en el día 3.5 pi mostraron una cierta capacidad de contención de la replicación bacteriana en estos órganos tal y como mostraron los recuentos bacterianos, así como la presencia de una reacción inflamatoria piogranulomatosa asociada a la presencia de listerias. El papel crítico de los PMNN en la disminución de la carga bacteriana en el hígado y bazo durante los tres primeros días postinfección ha sido ampliamente descrito por otros autores mediante la administración del anticuerpo RB6-8C5 previamente o rápidamente tras la infección (Rogers y Unanue, 1993; Appelberg y col, 1994; Conlan y North, 1994; Czuprynski y col, 1994; Rakhmievich, 1995; Czuprynski y col, 1996; Gregory y col, 1996; Conlan, 1997; ). En nuestro modelo, los PMNN son esenciales para limitar la multiplicación de *Listeria monocytogenes* en el hígado y bazo durante los 4 primeros días postinfección. Tras el 4º dpi, la resistencia adquirida es quizás suficiente aunque mucho menos efectiva que en los animales control. En consecuencia, la disminución de la carga bacteriana en el hígado y bazo durante los primeros 4 dpi es probablemente crucial para el desarrollo de una respuesta eficaz durante la listeriosis murina experimental.

Como ha sido mencionado con anterioridad, una bacteriemia persistente es necesaria para la invasión del SNC durante la listeriosis murina experimental (Berche, 1995). Coherentemente con la prolongada bacteriemia observada en los animales deplecionados de PMNN, las lesiones en el SNC fueron más frecuentes en estos animales que en los animales control. Sin embargo, en la mayoría de ellos las lesiones consistieron en la presencia de grandes cantidades de listerias alojadas en el velo del cuarto ventrículo sin reacción inflamatoria asociada. Únicamente unas pocas células de apariencia mononuclear ligeramente positivas al antígeno 7/4 se observaron en el espacio subaracnoideo de la fisura del hipocampo. El significado de la presencia de grandes cantidades de *Listeria* en esta localización particular en varios de los animales deplecionados de PMNN es incierto. Sin embargo, la presencia de una leve inflamación en el espacio subaracnoideo y no en el lugar donde la mayoría de listerias fueron localizadas sugiere que la vía de acceso de los

leucocitos al SNC es posiblemente independiente de la vía de entrada de *Listeria monocytogenes*. En este experimento la expresión de moléculas de adhesión endotelial P-selectina e ICAM-1 mantuvo el mismo patrón que en el estudio precedente. A diferencia de los animales control que presentaron una leptomeningitis purulenta principalmente en la fisura del hipocampo, en los animales deplecionados de PMNN se observó la presencia de células débilmente positivas al antígeno 7/4, probablemente células inmaduras de la serie mielomonocítica liberadas de la médula ósea.

Es de destacar la ausencia de macrófagos o linfocitos en el SNC de los animales deplecionados de PMNN. Este hecho sugiere que la migración inicial de PMNN al SNC durante la listeriosis murina experimental pudiera ser un pre-requisito para el posterior reclutamiento de los macrófagos. Este hecho ha sido previamente descrito en otros órganos durante la listeriosis murina experimental (Conlan y North, 1994; Rakhmilevich, 1995; Conlan, 1997).

En resumen, nuestras observaciones sugieren que los PMNN tienen una función esencial en la prevención del acceso y/o la multiplicación de *L. monocytogenes* en el SNC y que la migración inicial de PMNN puede ser necesaria para el reclutamiento posterior de macrófagos y linfocitos activados al SNC.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La expresión de E-selectina e ICAM-1 en tejidos de ratón fijados en formol e incluidos en parafina puede ser detectada mediante la utilización de los anticuerpos monoclonales 10E9.6 (E-selectina) y KAT-1 (ICAM-1), respectivamente. La distribución de la expresión de ambas moléculas en tejidos de ratón fijados en formol e incluidos en parafina es similar a la previamente descrita en tejidos congelados.
2. El anticuerpo policlonal contra P-selectina utilizado en este trabajo permite la detección de P-selectina en el interior de plaquetas, megacariocitos, y en la membrana plasmática de las células endoteliales, pero no cuando la molécula se encuentra en el interior de los corpúsculos de Weibel-Palade de la célula endotelial.
3. Rápidamente tras la infección con *Listeria monocytogenes* y previamente a la aparición de las lesiones, se produce una inducción y sobre-regulación generalizada de P-selectina e ICAM-1, respectivamente. Tras esta primera fase de activación endotelial inespecífica, la sobre-expresión de ambas moléculas está asociada a la presencia de lesiones inflamatorias en los órganos diana de la infección, especialmente hígado, órganos linfoides secundarios y SNC.
4. En el hígado, la aparición de las lesiones inflamatorias está correlacionada con la expresión de ICAM-1 en los sinusoides hepáticos y de P-selectina e ICAM-1 en las venas centrolobulillares y en los vasos situados en el espacio porta.
5. Tras la infección por *Listeria monocytogenes*, la aparición de lesiones nerviosas coincide con un periodo de bacteriemia. Las lesiones iniciales consisten en una leptomeningitis purulenta asociada a una fuerte expresión endotelial de P-selectina e ICAM-1 en vénulas del espacio subaracnoideo, especialmente en aquellas situadas en la fisura del hipocampo.
6. La aparición de ventriculitis y/o coroiditis purulentas en nuestro modelo es un fenómeno posterior a la presencia de meningitis y está asociado a una intensa

expresión de ICAM-1 las células epiteliales coroideas y en las células ventriculares, pero no en el endotelio fenestrado de los plexos coroideos. Sin embargo, numerosos vasos periventriculares muestran una fuerte expresión endotelial de ICAM-1 asociada a imágenes de diapedesis y extravasación de neutrófilos.

7. La depleción de neutrófilos inducida mediante la administración del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 facilita la multiplicación de *Listeria* en el bazo e hígado de los animales infectados y provoca una bacteriemia prolongada.
8. La depleción de neutrófilos mediante la administración del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 durante la listeriosis murina experimental facilita la multiplicación de *Listeria monocytogenes* en el SNC pero aparentemente no previene o interfiere su acceso al encéfalo.
9. La migración inicial de neutrófilos al SNC durante la listeriosis murina experimental parece ser independiente de la vía de acceso de *Listeria monocytogenes* al encéfalo.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

**Abassi O., Kishimoto T.K., McIntire L.V., Anderson D.C., Smith C.W.** 1993. E-selectin supports neutrophil rolling *in vitro* under conditions of flow. *J. Clin. Invest.* 92:2719-2730.

**Adams D.H., Shaw S.** 1994. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *The Lancet*, 343:831-836.

**Altimira J., Prats N., López S., Domingo M., Briones V., Domínguez L., Marco A.** 1999. Repeated oral dosing with *Listeria monocytogenes* in mice as a model of central nervous system listeriosis in man. *J. Comp. Path.* 121:117-125.

**Alvarez-Dominguez C., Carrasco-Marin E., Leyva-Cobian F.** 1993. Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect. Immun.* 61(9):3664-3672.

**Appelberg R.A., Castro A.J., Silva M.T.** 1994. Neutrophils as effector cells of T-cell mediated, acquired immunity in murine listeriosis. *Immunology* 83:302-307.

**Austrup F., Vestweber D., Borges E., Löhning M., Bräuer R., Herz U., Renz H., Hallmann R., Scheffold A., Radbruch A., Hamann A.** 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81-83.

**Bell M.D., Perry, V.H.** 1995. Adhesion molecule expression on murine cerebral endothelium following the injection of a proinflammagen or during acute neuronal degeneration. *J. Neurocytol.* 24: 695-710.

**Berche P.** 1995. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* 18: 323-336.

**Bevilacqua M.P., Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran R.S., Gimbrone M.A.** 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9238-9242.

**Bevilacqua M.P., Butcher, E., Furie B., Furie B., Gallatin M., Gimbrone M., Harlan J., Kishimoto K., Lasky L., McEver R., Paulson J., Rosen S., Seed B., Siegelman M., Springer T., Stoolman L., Tedder T., Varki A., Wagner D., Weissman I., Zimmerman G.** 1991. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67:233.

**Boury N.M., Czuprynski C.J.** 1995. *Listeria monocytogenes* infection increases neutrophil adhesion and damage to a murine hepatocyte cell line in vitro. *Immunol. Lett.* 46:111-116.

**Briones V., Blanco M., Marco A.J., Prats N., Fernandez-Garayzabal J.F., Suarez G., Domingo M., Dominguez L.** 1992. Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. *Am. J. Vet. Res.* 53:191-193.

**Bruijn J.A., Dinklo N.J.C.M.** 1993. Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease. *Lab. Invest.* 69(3):329-335.

**Bruijn J.A., De Heer E.** 1995. Adhesion molecules in renal disease. *Lab. Invest.* 72(4):387-394.

**Buchmeier N.A., Schreiber R.D.** 1985. Requirement of endogenous interferon- $\gamma$  production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7404-7408.

**Bullard D.C., Kunkel E.J., Kubo H., Hicks M.J., Lorenzo I., Doyle N.A., Doerschuck C.M., Ley K., Beaudet A.L.** 1996. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.* 183:2329-2336.

**Charlton K.M., García M.M.** 1977. Spontaneous listeric encephalitis and neuritis in sheep. Light microscopy studies. *Vet. Pathol.* 14: 297-313.

**Conlan J. W., North R.J.** 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174:741-744.

**Conlan J. W., North R.J.** 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* 60(12):5164-5171.

**Conlan J.W., North R.** 1993. Neutrophil-mediated lysis of infected hepatocytes. *ASM News.* 59: 563-567.

**Conlan J.W., North R.** 1994. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 179: 259-268.

**Conlan J.W.** 1996. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J. Med. Microbiol.* 44: 295-302.

**Conlan J.W.** 1997. Critical roles of neutrophils in host defence against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 65: 630-635.

**Cotran R.S., Pober J.S.** 1989. Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in vascular and immune injury. *Kidney Int.* 35:969-975.

**Coughlan A.F., Hau H., Dunlop L.C., Berndt M.C., Hancock W.W.** 1994. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. *J. Exp. Med.* 179:329-334.

**Croize J. Arvieux J., Berche P., Colomb M.G.** 1993. Activation of the human complement alternative pathway by *Listeria monocytogenes*: evidence for direct binding and proteolysis of the C3 component on bacteria. *Infect. Immun.* 61(12):5134-5139.

**Cronstein B.N., Weissmann G.** 1993. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 36(2):147-157.

**Czuprynski C.J., Henson P.M., Campbell P.A.** 1984. Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. *J. Leukoc. Biol.* 35:193-208.

**Czuprynski C.J., Brown J.F.** 1987. Dual regulation of anti-bacterial resistance and inflammatory neutrophil and macrophage accumulation by L3T4+ and Lyt 2+ *Listeria*-immune cells. *Immunology* 60:287-293.

**Czuprynski C.J., Brown J.F., Maroushek N., Wagner R.D., Steinberg H.** 1994. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 152:1836-1846.

**Czuprynski C.J., Theisen C., Brown J.F.** 1996. Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 64: 3946-3949.

**Czuprynski C.J., Haak-Frendscho M.** 1997. Non-specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection. *Immunol. Rev.* 158:47-56.

**Deckert-Schlüter M., Schlüter D., Hof H., Wiestler O.D., Lassmann H.** 1994. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC Class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53(5):457-468.

**Deckert-Schlüter M., Bluethmann H., Kaefer N., Rang A., Schlüter D.** 1999. Interferon- $\gamma$  receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signalling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Am. J. Pathol.* 154(5):1549-1561.

- Dianzani U., Malavasi F.** 1995. Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit. Rev. Immunol.* 15(2):167-200.
- Domingo M., Ramos J.A., Dominguez L., Ferrer L., Marco A.** 1986. Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. *J. Vet. Med.* 33: 537-542.
- Dopp J.M., Breneman S.M., Olschowka J.A.** 1994. Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 54:129-144.
- Drevets D.A., Campbell P.** 1991. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 59: 2645-2652.
- Drevets D.A., Leenen P.J.M., Campbell P.A.** 1993. Complement receptor type 3 (CD11/CD18) involvement is essential for killing of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophages. *J. Immunol.* 151(10):5431-5439.
- Drevets D.A., Sawyer R.T., Potter T.A., Campbell P.A.** 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63(11):4268-4276.
- Drevets D.A., Leenen P.J.M., Campbell P.A.** 1996. Complement receptor type 3 mediates phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by a TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$ -stimulated macrophage precursor hybrid. *Cell. Immunol.* 169:1-6.
- Drevets D.A.** 1997. *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J. Immunol.* 158(11):5305-5313.
- Drevets D.A.** 1998. *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect. Immun.* 66(1):232-238.

**Drevets D.A.** 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect. Immun.* 67(7):3512-3517.

**Drevets D.A.** 2001. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect. Immun.* 69(3):1344-1350.

**Dunn P.L., North R.J.** 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* 59(9):2892-2900.

**Dustin M.L., Rothlein R., Bhn A.K., Dinarello C.A., Springer T.A.** 1986. Induction by IL 1 and linterferon- $\gamma$ :tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137(1):245-254.

**Edelson B.T., Unanue E.R.** 2000. Immunity to *Listeria* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 12:425-431.

**Elangbam C.S., Qualls C.W., Dahlgren R.R.** 1997. Cell adhesion molecules – update. *Vet. Pathol.* 34:61-73.

**Emmerling P., Finger H., Hof H.** 1977. Cell-mediated resistance to infection with *Listeria monocytogenes* in nude mice. *Infect. Immun.* 15(2):382-385.

**Endo H., Sasaki K., Tonosaki A., Kayama T.** 1998. Three-dimensional and ultrastructural ICAM-1 distribution in the choroid plexus, arachnoid membrane and dural sinus of inflammatory rats induced by LPS injection in the lateral ventricles. *Brain Res.* 793:297-301.

**Engelhardt B., Conley F.K., Butcher E.C.** 1994. Cell adhesion molecules on vessels during inflammation in the mouse central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 51:199-208.

**Engelhardt B., Vestweber D., Hallmann R., Schulz,M.** 1997. E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 90(11).4459-4472.

**Essani N.A., Fisher M.A., Farhood A., Manning A. M., Smith C.W., Jaeschke H.** 1995. Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 21:1632-1639.

**Essani N.A., Fisher M.A., Simmons C.A., Hoover J.L., Farhood A., Jaeschke H.** 1998. Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J. Leukoc. Biol.* 63:288-296.

**Farber J.M., Peterkin P.I.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55: 476-511.

**Forlow S.B., White E.J., Barlow S.C., Feldman S.H., Lu H., Bagby G.J., Beaudet A.L., Bullard D.C., Ley K.** 2000. Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and E-selectin double-mutant mice. *J. Clin. Invest.* 106(12):1457-1466.

**Frei K., Nadal D., Pfister H-W. Fontana A.** 1993. *Listeria meningitis*: identification of a cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin 10. *J. Exp. Med.* 178:1255-1261.

**Frenette P.S., and Wagner D.D.** 1996. Adhesion Molecules – Part I. *New Eng. J. Med.* 334(23):1526-1529.

**Fries J.W.U., Williams A.J., Atkins R.C., Newman W., Lipscomb M.F., Collins T.** 1993. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation. *Am. J. Pathol.* 143:725-737.

**Fuhlbrigge R.C., Kieffer J.D., Armerding D., Kupper S.** 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing cells. *Nature* 389:978-981.

**Gellin B.G., Broome, C.V.** 1989. Listeriosis. *J.A.M.A.* 261:1313-1320.

- Girard J.P., Springer T.A.** 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* 16(9):449-457.
- Gopalan P.K., Smith C.W., Lu H., Berg E., McIntyre L.V., Simon S.I.** 1997. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J. Immunol.* 158:367-375.
- Gotsch U., Jäger U., Dominis M., Vestweber D.** 1994. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- $\alpha$  in vivo. *Cell Adhes. Commun.* 2:7-14.
- Gray M.L., Killinger A.H.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30: 309-371.
- Gregory S.H., Wing E.J.** 1993a. Macrophage colony-stimulating factor and the enhanced migration of monocytes are essential in primary but not secondary host defenses to *Listeria* organisms. *J. Infect. Dis.* 168:934-942.
- Gregory S.H., Wing E.J.** 1993b. IFN- $\gamma$  inhibits replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J. Immunol.* 151(3):1401-1409.
- Gregory S.H., Sagnimeni A.J., Wing E.J.** 1996. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J. Immunol.* 157:2514-2520.
- Gregory S.h. and Liu C.** 2000. CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol. Rev.* 174:112-122.
- Gregory S.H., Cousens L.P., van Rooijen N., Döpp E.A., Carlos T.M., Wing E.J.** 2002. Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J. Immunol.* 168:308-315.

**Gregory S.H. and Wing E.J.** 2002. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 72:239-248.

**Hahne M., Jäger U., Isenmann S., Hallmann R., Vestweber D.** 1999. Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J. Cell Biol.* 121:655-664.

**Haraldsen G., Kvale D., Lien B., Farstad I.N., Brandtzaeg P.** 1996. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human intestinal microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 156:2558-2565.

**Havell E.A.** 1987. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J. Immunol.* 139(12):4225-4231.

**Havell E.A.** 1989. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J. Immunol.* 143(9):2894-2899.

**Henseleit U., Steinbrink K., Goebeler M., Roth J., Vestweber D., Sorg C., Sunderkötter C.** 1996. E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice. *J. Pathol.* 180:317-325.

**Hirsch S., Gordon S.** 1983. Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 7/4. *Immunogenetics* 18:229-239.

**Huber A.R., Kunkel S.L., Todd R.F., Weiss S.J.** 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:99-102.

**Isaksson J., Lewén A., Hillered L., Olsson Y.** 1997. Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 in cerebral microvessels after cortical contusion trauma in a rat model. *Acta Neuropathol.* 94:16-20.

**Issekutz A.C., Rowter D., Springer T.A.** 1999. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* 65:117-126.

**Jones S.P., Trocha S.D., Strange M.B., Granger D.N., Kevil C.G., Bullard D.C., Lefer D.J.** 2000. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H2196-2201.

**Kang B.H., Manderschild B.D., Huang Y.C.T., Crapo J.D., Chang L.Y.** 1996. Contrasting response of lung parenchymal cells to instilled TNF alpha and IFN gamma: the inducibility of specific cell ICAM-1 *in vivo*. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 15:540-580.

**Kaufmann S.H.E., Hug E., Vöth U., Müller I.** 1985. Effective role *against Listeria monocytogenes* and delayed-type hypersensitivity to listerial antigens depend on cooperation between specific L3T4+ and Lyt 2+ T cells. *Infec. Immun.* 48(1):263-266.

**Kaufmann S.H.E.** 1987. Possible role of helper and cytolytic T lymphocytes in antibacterial defence: conclusions based on a murine model of listeriosis. *Rev. Infect. Dis.* 9 (supl.5): 650-659.

**Kaufmann S.H.E.** 1988. Immunity against intracellular bacteria: Biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 138:141-175.

**Konstantopoulos K. and McIntire L.V.** 1996. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J. Clin. Invest.* 98(12):2661-2665.

**Koopman G., Parmentier H.K., Schuurman H., Newman W., Meijer C.J.L.M., and Pals S.T.** 1991. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J. Exp. Med.* 173:1297-1304.

**Kratz S., Kurlander R.J.** Characterization of the pattern of inflammatory cell influx and cytokine production during the murine host response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 1988. 141: 598-606.

**Krull M, Nost R., Hippenstiel S., Domann E., Chakraborty T., Suttorp N.** 1997. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 159(4):1970-1976.

**Kuijpers T.W., Raleigh M., Kavanagh T., Janssen H., Calafat J., Roos D., Harlan J.M.** 1994. Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a Lysosomal compartment of vesiculotubular shape. *J. Immunol.* 152:5060-5069.

**Kunkel E.J., Jung U., Bullard D.C., Norman K.E., Wolitzky B.A., Vestweber D., Beaudet A.L., Ley K.** 1996. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and Intercellular adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 183:57-65.

**Kuzu I., Bicknell R., Fletcher C.D.M., Gatter K.C.** 1993. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab. Invest.* 69:322-328.

**Langermans J.A.M., van der Hulst M.E.B., Nibbering P.H., van Furth R.** 1992. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect. Immun.* 60(12):5107-5112.

**Lasky L.A.** 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258:964-968.

**Lepay D.A., Steinman R.M., Nathan C.F., Murray H.W., Cohn Z.A.** 1985. Liver macrophages in murine listeriosis. *J. Exp. Med.* 161:1503-1512.

- Lorber B.** 1997. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24: 1-11.
- McEver R.P., Beckstead J.H., Moore K.L., Marshall-Carlson L., Bainton D.F.** 1989. GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84:92-99.
- McEver R.P. and Cummings R.D.** 1997. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocytereruitment. *J. Clin. Invest.* 100(3):485-492.
- Mackaness G.B.** 1962. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116: 381-406.
- Mackaness G.B.** 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120:105-120.
- Mackaness G.B.** 1968. The influence of immunologically comitted lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.* 129:873-992.
- Mackay C.R., Imhof B.A.** 1993. Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today* 14(3):99-102.
- Marco A., Domingo M., Prats N., Briones V., Pumarola M., Domínguez L.** 1991. Pathogenesis of lymphoid lesions in murine experimental listeriosis. *J. Comp. Pathol.* 105:1-15.
- Marco A.J., Prats M., Ramos J.A., Briones V., Blanco M., Dominguez L., Domingo M.** 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 107:1-9.
- Marco A.J., Altimira J., Prats N., López S., Dominguez L., Domingo M., Briones V.** 1997. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb. Pathog.* 23: 255-263.

- Mielke M.E.A., Niedobitek G., Stein H., Hahn H.** 1989. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* is mediated by Lyt-2<sup>+</sup> T cells independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. *J. Exp. Med.* 170: 589-594.
- Mizgerd J.P., Bullard D.C., Hicks M.J., Beaudet A.L., Doerschuk C.M.** 1999. Chronic inflammatory disease alters adhesion molecule requirements for acute neutrophil emigration in mouse skin. *J. Immunol.* 162:5444-5448.
- Munoz F.M., Hawkins, E.P., Bullard D.C., Beaudet, A.L., Kaplan S.L.** 1997. Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 100(8):2099-2106.
- Munro J.M., Pober J.S., Cotran R.S.** 1989. Tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$  induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio Anubis*. *Am. J. Pathol.* 135(1):121-133.
- Munro J.M., Lo S.K., Corless C., Robertson M.J., Lee N.C., Barnhill R.L., Weinberg D.S., Bevilacqua M.P.** 1992. Expression of Sialyl-Lewis, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 141:1397-1408.
- Mylonakis E., Hohmann E.L., Calderwood S.B.** 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. *Medicine* 77:313-336.
- Nakamura S., Ohtani H., Watanabe Y., Fukushima K., Matsumoto T., Kitano A., Kobayashi K., Nagura H.** 1993. In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* 69(1):77-85.
- Nakane A., Minagawa T., Kato K.** 1988. Endogenous tumor necrosis factor (Cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 56(10):2563-2569.

- Nakane A., Numata A., Asano M., Kohanawa M., Chen Y., Minagawa T.** 1990. Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 58(7):2386-2388.
- Nakane A., Numata A., Chen Y., Minagawa T.** 1991. Endogenous gamma interferon-independent host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in CD4+ T cell and asialo GM1+ cell-depleted mice. *Infect. Immun.* 59(10):3439-3445.
- Nakane A., Numata A., Minagawa T.** 1992. Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect. Immun.* 60(2):523-528.
- Neumann B., Machleidt T., Lifka A., Pfeffer K., Vestweber D., Mak T.W., Holzmann B., Kronke M.** 1996. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J. Immunol.* 156:1587-1593.
- North R.J.** 1973. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. *Cell. Immunol.* 7:166-176.
- North R.J.** 1975. Nature of "memory" in T-cell mediated antibacterial immunity: anamnestic production of mediator T cells. *Infect. Immun.* 12(4):754-760.
- Poston R.M., Kurlander R.J.** 1992. Cytokine expression during murine listeriosis. Infection with live, virulent bacteria is required for monokine and lymphokine messenger RNA accumulation in the spleen. *J. Immuno.* 149(9):3040-3044.
- Prats N., Briones V., Blanco M.M., Altimira J., Ramos J.A., Domínguez L., Marco A.** 1992. Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:744-747.
- Rakhmievich A.L.** 1995. Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Leukoc. Biol.* 57:827-831.

**Rocourt J., Boerlin P., Grimont F., Jacquet C., Piffaretti J.C.** 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 171-174.

**Rogers H.W., Unanue E.R.** 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* 61(12):5090-5096.

**Rogers H.W., Callery M.P., Deck B., Unanue E.R.** 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* 156:679-684.

**Rosen H., Gordon S., North R.J.** 1989. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 170:27-37.

**Rudin W., Eugster H., Bordmann G., Bonato J., Müller M., Yamage M., Ryffel B.** 1997. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor- $\alpha/\beta$ -deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 upregulation and T helper type 1 response. *Am. J. Pathol.* 150(1):257-266.

**Sanders W.E., Wilson R.W., Ballantyne C.M., Beudet A.L.** 1992. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 80(3):795-800.

**Sasaki T., Mieno M., Uono H., Yamaguchi K., Usui T., Hra K., Shiku H., Nakayama E.** 1990. Roles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, and the effect of administration of recombinant murine interferon  $\gamma$  in listerial infection. *J. Exp. Med.* 171:1141-1154.

**Schlech W.F.** 1996. Pathogenesis and immunology of *Listeria monocytogenes*. *Path. Biol.* 44:775-782.

**Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 169-183.

**Schuchat A., Robinson K., Wenger J.D., Harrison L.H., Farley M., Reingold A.L., Lefkowitz L., Perkins B.A.** 1997. Bacterial meningitis in the United states in 1995. *N. Engl. J. Med.* 337:970-976.

**Seebach J., Bartholdi D., Frei K., Spanaus K-S., Ferrero E., Widmer U., Isenmann S., Strieter R.M., Schwab M., Pfister H-W., Fontana A.** 1995. Experimental *Listeria* meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and 2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J. Immunol.* 155:4367-4375.

**Seeliger H.P.R., Jones D.** 1986. *Listeria*: en Sneath *et al.* (eds): Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins. 2: 1235-1245.

**Silber A., Newman W., Reimann K.A., Hendricks E., Walsh D., Ringler D.J.** 1994. Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab. Invest.* 70:163-175.

**Sobel R.A., Mitchell M.E. Fondren G.** 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am. J. Pathol.* 136(6):1309-1316.

**Steffen B.J., Butcher E.C., Engelhardt B.** 1994. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am. J. Pathol.* 145(1):189-201.

**Steffen B.J., Breier G., Butcher E.C., Schulz M., Engelhardt B.** 1996. ICAM-1, VCAM-1, and MadCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. *Am. J. Pathol.* 148:1819-1838.

**Takeya K., Shimotori S., Taniguchi T., Nomoto K.** 1977. Cellular mechanisms in the protection against infection by *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Gen. Microbiol.* 100:373-379.

**Tang W.W., Feng L., Mathison J.C., Wilson C.B.** 1994. Cytokine expression, upregulation of Intercellular adhesion molecule-1, and leukocyte infiltration in experimental tubulointerstitial nephritis. *Lab. Invest.* 70(5):631-638.

**Tang T., Frenette P.S., Hynes R.O., Wagner D., Mayadas T.N.** 1996. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J. Clin. Invest.* 97:2485-2490.

**Tedder T.F., Steeber D.A., Pizcueta P.** 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.* 181:2259-2264.

**Tsai YH, Hirth RS, Leitner F.** 1980. A murine model for listerial meningitis and meningoencephalomyelitis: therapeutic evaluation of drugs in mice. *Chemotherapy* 26:196-206.

**Unanue E.R.** 1997. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* 9:35-43.

**Van Furth R., van Zwet Th. L., Buisman A.M., van Dissel J.T.** 1994. Anti-tumor necrosis factor antibodies inhibit the influx of granulocytes and monocytes into an inflammatory exudate and enhance the growth of *Listeria monocytogenes* in various organs. *J. Infect. Dis.* 170:234-237.

**Van Kessel K.P.M., Antonissen A.C.J.M., van Dijk H., Rademaker P.M., Willers J.M.N.** 1981. Interactions of killed *Listeria monocytogenes* with the mouse complement system. *Infect. Immun.* 34(1):16-19.

**Verdrengh M., Springer T.A., Gutierrez-Ramos J., Tarkowski A.** 1996. Role of intercellular adhesion molecule 1 in pathogenesis of Staphylococcal arthritis and in host defense against Staphylococcal bacteremia. *Infect. Immun.* 64(7):2804-2807.

**Walter U.M. and Issekutz A.C.** 1997. Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leucocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat. *Immunology* 92:290-299.

**Weber J.R., Angstwurm K., Bürger W., Einhäupl K.M., Dirnagl U.,** 1995. Anti-ICAM-1 monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J. Neuroimmunol* 63:63-68.

**Wegner C.D., Gundel R.H., reilly P., Haynes N., Letts L.G., Rothlein R.** 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247:456-459.

**Weller A., Isenmann S., Vestweber D.** 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 267 :15176-15183.

**Wherry J.C., Schreiber R.D., Unanue E.R.** 1991. Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in *scid* mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* 59(5):1709-1715.

**Wilson S.L., Drevets D.A.** 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 78:1658-1666.

**Williams A.E., Blakemore W.F.** 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* 162: 474-481.

**Wing E.J. and Gregory S.H.,** 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J. Infect: Dis.* 185(Suppl 1):S18-S24)

**Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Prescott S.M.** 1996. Adhesion and signalling in vascular cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.* 98(8):1699-1701.

## **7. Agradecimientos**

Alberto, gracias por ser el guía y alma de este trabajo y por las largas discusiones tanto científicas como vitales indispensables para sobrevivir o al menos intentar comprender el mundo en el que vivimos.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Barcelona, especialmente a mis ex-compañeros, ex-becarios y amigos con los que he compartido largos, interesantes e inolvidables momentos.

Gracias Blanca, Anabel, Pere e Ivan por vuestra ayuda inestimable en el laboratorio.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Barcelona, por su disponibilidad, colaboración y ayuda.

Thank you to Dr. Czuprynski (Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Madison, Wisconsin) for kindly welcoming me in his lab and for his highly appreciated contribution to this thesis.

Merci à Fernando, Tanguy, Karine et Azzeddine qui m'ont soutenu et encouragé pendant l'épisode français de cette thèse.