

11261
A
24'

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO.

CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES EN LOS MONOCITOS HUMANOS
INDUCIDOS POR EL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCION
PRODUCIDO POR LA ENTAMOEBA HISTOLYTICA (FILM).

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biomédicas
presenta:
JUAN ANTONIO GIMENEZ SCHERER

Director de la TESIS
Dr. ROBERTO KRETSCHMER SCHMID

División de Inmunología de la Unidad de Investigaciones Biomédicas
del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE .

UBICACION DEL PROYECTO.	I
OBJETIVOS.	II
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	III
INTRODUCCION.	
La amibiasis.	1
El factor inhibidor de la locomoción de monocitos.	3
Quimiotaxis y movilidad leucocitaria.	6
La fase aferente de la quimiotaxis.	7
El citoesqueleto.	11
Los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis.	13
La fase eferente de la quimiotaxis.	15
La inhibición de la quimiotaxis.	17
Métodos para evaluar la quimiotaxis	21
MATERIAL Y METODO.	22
Método de quimiotaxis frustrada - esquema.	22
Material.	26
Método: Ensayo quimiotáctico.	27
Microscopía electrónica.	29
Método de análisis de los rasgos morfológicos.	31
RESULTADOS	36
Síntesis de los datos - tablas y fotos.	36
Resultados por rasgos morfológicos.	45
Resultados por grupos experimentales	53
Recapitulación de resultados.	59
ANALISIS.	61
Análisis y validación de los rasgos morfológicos.	61
Análisis de los grupos testigo.	64
Análisis del factor inhibidor del sobrenadante.	
I. Análisis intraexperimental	68
II. Análisis "intrafínea"	71
III. Análisis global	73
CONCLUSIONES.	77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	78

UBICACION DEL PROYECTO

En sentido amplio, este proyecto se sitúa en el campo de estudio de las interacciones que ocurren en la amibiasis humana, entre el parásito, Entamoeba histolytica, y el sistema inmune del huésped, encargado eventualmente de su eliminación.

Explora en particular, un mecanismo que potencialmente contribuye a la protección de la amiba, al impedir o entorpecer, la aproximación de un tipo de glóbulos blancos, los monocitos o macrófagos, al lugar en que se localiza la amiba.

El proyecto es parte de una línea de investigación dirigida a evaluar el fenómeno siguiente:

E. histolytica produce y libera al medio, un factor (FILM) que inhibe los diversos tipos de movilidad de los monocitos, incluyendo a la quimiotaxis o movilidad orientada, que es el principal mecanismo utilizado por los leucocitos para arribar, en forma selectiva a un foco inflamatorio (23, 25, 48-50, 69-74, 76, 94).

La finalidad de este estudio es determinar los cambios morfológicos que ocurren en los monocitos humanos, inhibidos en su quimiotaxis por el FILM.

OBJETIVOS

- 1) CARACTERIZAR LOS CAMBIOS MORFOLOGICOS ULTRAESTRUC-TURALES QUE OCURREN EN LOS MONOCITOS HUMANOS CUYA QUIMIOTAXIS HA SIDO INHIBIDA (IN VITRO), POR EL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCION DE MONOCITOS (FILM) PRO-DUCIDO POR ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS.
- 2) COMPARAR LOS CAMBIOS QUE EN LOS RASGOS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA QUIMIOTAXIS PRODUCEN EL FILM Y OTROS INHIBIDORES*, CUYO NIVEL DE ACCION SUBCELULAR SE CONO-CE, PARA LOGRAR UNA MEJOR DEFINICION DEL SITIO DE AC-CION DEL FILM, A NIVEL SUBCELULAR.

Objetivo intermedio.

- 3) CARACTERIZAR LOS CAMBIOS MORFOLOGICOS QUE OCURREN EN LOS MONOCITOS CUYA QUIMIOTAXIS HA SIDO INHIBIDA POR HIDROCORTISONA**.

* Citocalasina B, colchicina, vimblastina e hidrocortisona.

** La hidrocortisona ha sido seleccionada como inhibidor testigo por poseer ciertas propiedades anti quimiotácticas, aparentemente seme-jantes a las del FILM (60).

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A) El FILM y sus sinónimos.

FILM	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos (1984→).
MLIF	Monocyte locomotion inhibitory factor (desig. en inglés).
FIQ	Factor inhibidor de la quimiotaxis (desig. hasta 1984).

B) Grupos experimentales.

GEY-A	Medio de Gey-albúmina-veronal-gelatina.
MAS	Medio axénico solo, en GEY-A, sin SAZ.
SNS	Sobrenadante de amiba solo, al 30% en GEY-A, sin SAZ.
SAZ	Suero activado con zimosán, al 20% en GEY-A.
ST	Suero testigo, inactivado por calor.
SAZ+MA	Grupo experimental con medio axénico y SAZ.
SAZ+SN	Grupo experimental con sobrenadante de amiba y SAZ.
SAZ+CIT	Grupo experimental con citocalasina B y SAZ.
SAZ+COL	Grupo experimental con colchicina y SAZ.
SAZ+VIM	Grupo experimental con vimblastina y SAZ.
SAZ+HC	Grupo experimental con hidrocortisona y SAZ.

C) Moléculas y estructuras.

AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico (46).
C5a	Factor quimiotáctico del complemento derivado de C5.
C5a-des-Arg	C5a sin la arginina terminal (39).
FC	Fosfatidil-colina (121).
FEA	Fosfatidil-etanol-amina (121).
FMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina, péptido quimiotáctico.
LDCF	Factor quimiotáctico derivado de los linfocitos (6).
LIF	Factor linfocítico inhibidor (33).
LTB4	Leucotrieno B4 o 5-12, di-HETE (114).
MAC	Microtúbulos asociados al centriolo.
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos (128).
MIF	Factor inhibidor de la migración (99).
MTOC	Centro organizador de microtúbulos (63).
NIF	Factor inmovilizador de neutrófilos (52).

D) Diversas.

AHA	Absceso hepático amibiano.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
PMN	Leucocitos polimorfonucleares.
UIB-CMN	Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D. F., México.

I N T R O D U C C I O N .

LA AMIBIASIS.

Poco necesita repetirse acerca de la importancia de la amibiasis, una parasitosis que infecta a 500 millones, enferma a 50 millones y mata a entre 40 y 100 mil seres humanos al año (130). Es de distribución mundial y de alta prevalencia en diversas zonas del mundo (130), y de México en particular (55), es capaz de matar al paciente por diversos mecanismos y puede atacar a personas de cualquier edad y sexo (105).

El desarrollo de medidas higiénicas preventivas, y de tratamientos eficaces, ha reducido su importancia (105), pero aún así, continúa siendo un serio problema médico epidemiológico (13, 19, 55, 64, 105, 107, 126, 130), y pese a numerosos estudios, diversos aspectos fundamentales de la patología de la amibiasis permanecen desconocidos (119, 126, 130).

Entre estos aspectos desconocidos destacan varias características "atípicas" de la amibiasis crónica extra intestinal, en particular del absceso hepático amibiano (A H A):

¿Qué determina que E. histolytica produzca abscesos sólo en ciertos casos, de los no pocos individuos invadidos (y enfermos), a nivel intestinal, y de los muchos individuos portadores sanos de E. histolytica ? (13, 19, 57, 96).

¿Por qué la amibiasis hepática presenta generalmente una reacción inflamatoria crónica extremadamente pobre, en contraste a lo que se observa, por una parte en la amibiasis intestinal aguda, y por otra en los abscesos hepáticos piógenos ? (13, 19, 28, 57, 64, 96, 107, 126).

¿Qué determina que en la curación del A H A , el balance de la restitución tisular se incline tan marcadamente hacia la regeneración y no a la cicatrización, (13, 19, 28, 96), nuevamente en contraste con lo que se observa en los abscesos piógenos (13, 126) en la hepatitis B (19) y en parasitosis hepáticas como la esquistosomiasis ? (19, 57).

Es posible que en estos fenómenos la interacción de la amiba con el sistema inmune constituya un eslabón fundamental, particularmente su interacción con los fagocitos mononucleares o monocitos, responsables de la inflamación crónica e importantes elementos de enlace con los procesos de cicatrización (31, 112).

LA INTERACCION ENTRE E. HISTOLYTICA Y EL SISTEMA INMUNE.

La interacción entre E. histolytica y el sistema inmune del huésped aún no totalmente caracterizada es compleja, múltiple y bidireccional (57, 66, 93, 119, 126, 127).

E. histolytica es antigénica, capaz de activar la inmunidad por más de una vía (126, 127) y también es blanco potencial de las diferentes subramas eferentes del sistema inmune, tanto de las humorales sérica (21, 133), secretoria (2) y por IgE (126, 133), como de las celulares, donde hay hipersensibilidad tardía (66, 126, 133) y lisis por contacto (97, 126). La E. histolytica es igualmente capaz de activar sistemas accesorios como el complemento hemolítico (126, 127), y los polimorfonucleares (PMN) (78, 89, 126).

Por otra parte, la amiba emplea varios mecanismos de evasión (126, 127, 133). Además de variaciones antigénicas entre cepas, es capaz de fagocitar o expulsar anticuerpos unidos a su superficie (126), y de destruir por contacto a diferentes leucocitos (97, 126), y hay evidencia de que, mediante secreciones, puede interferir a distancia con la red de comunicaciones del sistema inmune (69, 78, 89, 126).

Definir la importancia relativa de cada una de estas interacciones en las varias condiciones patológicas provocadas por E. histolytica es fundamental para mejorar la comprensión, diagnóstico y tratamiento de la amibiasis, y en este sentido destaca el fenómeno de la débil reacción inflamatoria que generalmente se observa en las formas crónicas de amibiasis.

EL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO Y SU EXIGUA INFLAMACION CRONICA

La pobreza de infiltrado inflamatorio crónico en el A H A ., aún en presencia de zonas de necrosis muy extensas (13, 19, 57, 126), es una característica generalizada (aunque no absoluta), de esta patología, y fué señalada ya desde 1891 por Councilman y Lafleur (28). Se han reportado algunas excepciones en condiciones clínicas y experimentales (64, 107, 126), pero en muchos casos clínicos se puede demostrar infección piógena sobreagregada (13, 126), y el infiltrado crónico en condiciones experimentales es generalmente efímero (64, 107). A pesar

de esas excepciones, la exiguidad de la inflamación crónica es tan característica del A H A que ha llevado a separar las lesiones amebianas de los abscesos "verdaderos" de otras etiologías (19, 164).

Dos hipótesis alternativas, aunque no necesariamente exclusivas, han sido propuestas para explicar este fenómeno: la "citotóxica" y la "antimigratoria". Según la primera hipótesis (126) la ameba destruiría a los glóbulos blancos que fueran llegando. Hay datos de observación y experimentación a favor de este mecanismo (64), pero la capacidad citotóxica de E. histolytica requiere contacto directo con la célula blanco (leucocitos u otras) (106, 107, 126), por lo que esta hipótesis no explica la ausencia de leucocitos mononucleares acercándose, pero aún sin entrar en contacto con la ameba, y deja de explicar la existencia de inflamación en la amebiasis intestinal aguda. La hipótesis "antimigratoria" sugiere que, independientemente de la citotoxicidad por contacto, E. histolytica podría producir y liberar factores capaces de evitar el arribo de los leucocitos al foco de la infección y fue sugerida por Pérez-Tamayo en 1971 (96). En relación con esta hipótesis, en 1980 se encontró en la División de Inmunología de la UIB - CMN - I M S S que E. histolytica produce y libera un factor capaz de inhibir la locomoción de los monocitos (69).

FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCION DE MONOCITOS.

Identificación

Originalmente identificado por inhibir la quimiotaxis de monocitos humanos, *in vitro* (69) y designado como FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCION DE LOS MONOCITOS (73), el FILM es producido y liberado al medio por E. histolytica cultivada axénicamente en condiciones estandarizadas (32). El FILM inhibe varios tipos de movilidad de los monocitos humanos y no sólo la quimiotaxis (72). La investigación del FILM se ha dividido en tres líneas principales:

- a) la caracterización y purificación del FILM.
- b) la evaluación "panorámica", a nivel cito-tisular, de los efectos y acciones del FILM.
- c) la evaluación "profunda", a nivel subcelular de sus efectos.

Los conocimientos obtenidos se resumen a continuación:

Caracterización del FILM.

El FILM no ha sido totalmente purificado. Los datos obtenidos indican que se trata de una molécula dializable (71, 94), de peso molecular entre 500 y 1000 Daltons, posiblemente de tipo peptídico (94), sin carbohidratos (23) y posiblemente sin grupos lipídicos que se une a un receptor específico que contiene D-manosa (74).

El FILM semipurificado (en la fracción del sobrenadante de PM < 10000) es termoestable (72), lo que rectifica la observación previa de que el FILM (en el sobrenadante completo) es termolábil (69, 71). La discrepancia entre estos resultados sugiere que el calentamiento del sobrenadante completo a 56° C., modifica algún otro componente que por unión o adsorción secuestra o modifica al FILM, pero que éste, intrínsecamente no se modifica por el calentamiento.

El FILM es producido no sólo por la E. histolytica de la cepa patógena HM-1 sino también por cepas menos virulentas y aún por amibas no patógenas (72).

El espectro de acción del FILM.

Se han estudiado diversas facetas del espectro de acción del FILM, como son el tipo de movilidad y la estirpe de leucocitos que altera. En relación con el tipo de movimiento afectado, el efecto del FILM abarca no sólo la movilidad quimiotáctica o direccional, sino también la movilidad aleatoria y la quimiocinética (incrementada pero no direccional) de los monocitos humanos, estudiadas in vitro en cámaras de Boyden (72, 73).

El efecto anti-quimiotáctico del FILM sobre los monocitos humanos también ha sido documentado in vivo empleando el modelo de la cámara de Rebuck, en que se aplica el sobrenadante o sus controles, sobre una escoriación de la piel y se tapa con cubreobjetos de microscopía, que se retiran en tiempos preestablecidos (76).

En relación con las estirpes celulares, el efecto del FILM no se extiende a las diversas formas de movilidad de los PMN humanos (73, 94). El efecto del FILM sobre la quimiotaxis de los linfocitos no ha sido ensayado debido a la muy lenta movilidad de estas células (34), pero es poco probable ya que los linfocitos no parecen tener receptores para el FILM (72). Los resultados de Aguirre et al (3), en que la exposición a sobrenadantes de E. histolytica (cepa HK-9) no reduce la quimiotaxis de los monocitos de Hamster, sugieren que el efecto del FILM pudiera ser también especie específico.

Aspectos que deben ser estudiados.

En relación con el órgano blanco del FILM, éste tendría a priori tres vías potenciales para ejercer su efecto, una "vía corta", actuando sobre el mensajero bioquímico (el atractante), una "vía media" con el monocito como célula blanco y una "vía larga" en que el FILM estimulase al linfocito a producir un inhibidor que actuase sobre el monocito.

Hay evidencia en contra de la vía corta, ya que el FILM cancela la respuesta quimiotáctica a por lo menos tres atractantes químicamente diferentes y por ende con receptores distintos, que son C5a, formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) y el factor quimiotáctico para monocitos producido por linfocitos (LDCF) (72).

Son evidencia contra la vía larga, la no absorción del FILM, por los linfocitos (72, 74), y la persistencia del efecto inhibitorio, en experimentos con poblaciones de monocitos purificadas por adherencia, en columnas de lana de Nylon (74).

En cambio, la pérdida del efecto inhibitorio del sobrenadante, al ser preincubado con monocitos (72), y al inhibir la síntesis proteica del monocito (25, 70), así como la demostración de un receptor con manosa, selectivo al FILM (74), son evidencias que sugieren que el FILM ejerza su efecto directamente sobre el monocito, lo que lleva a plantear una nueva pregunta:

¿A qué nivel se ejerce el efecto inhibitorio?

La pregunta es de importancia real, y no sólo curiosidad académica, pues si a nivel celular, los fenómenos de movilidad y quimiotaxis son relativamente sencillos, considerados a nivel subcelular son extraordinariamente complejos, y ésto determina diferencias en la capacidad y movilidad residual del leucocito que dependen del nivel en que se produce la inhibición. Paralelamente se originan alteraciones en la morfología del leucocito que reflejan el nivel en que ocurre la inhibición.

Este estudio está dirigido a determinar el patrón de cambios morfológicos que el FILM origina en los monocitos humanos, por lo que es necesario señalar las principales etapas que integran la movilidad y la quimiotaxis leucocitaria a nivel subcelular (87, 116, 121).

QUIMIOTAXIS Y MOVILIDAD LEUCOCITARIA.

La distribución de los leucocitos más allá del torrente sanguíneo se produce por la movilidad activa de estas células, frecuentemente designada como "Motilidad" para distinguirla de la movilidad pasiva (5). La movilidad leucocitaria se divide en los tres tipos que se definen a continuación (67, 69, 136):

Movilidad aleatoria: es la movilidad activa, esporádica, espontánea y no direccional.

Quimiocinesis: es la movilidad aumentada pero no vectorial, inducida por la presencia de excitantes químicos y requiere de receptores celulares.

Quimiotaxis: es la movilidad aumentada y vectorial a lo largo de gradientes de concentración de una sustancia química o quimiotaxina. Requiere de un sistema de receptores y un mecanismo de orientación acoplado al de movilidad.

Un leucocito es capaz de efectuar los tres tipos de movimiento, pero el acceso a un foco inflamatorio depende fundamentalmente de la respuesta quimiotáctica. La capacidad de responder quimiotácticamente es una propiedad casi universal de los seres vivos, presente desde las bacterias a los mamíferos. Los leucocitos humanos emplean la quimiotaxis con orientación "espacial" de los eucariotes, que implica detectar la diferencia de concentración del atrayente entre dos zonas de la célula (116, 121, 136, 141). El avance se efectúa mediante pseudópodos, en un movimiento "ameboide" semejante, pero no homólogo al de las amibas (91).

En la respuesta quimiotáctica de los leucocitos pueden distinguirse tres grandes etapas, que corresponden al inicio, mantenimiento y conclusión. La fase inicial de la respuesta ha sido dividida en una serie de eventos premigratorios que incluyen; la unión atrayente-receptor, los cambios iónicos en el potencial, y en la morfología de la membrana, los cambios en los nucleótidos cíclicos, en la vía de los fosfatos de hexosa, y finalmente, los cambios en el citoesqueleto. Estos eventos son seguidos por los cambios propiamente migratorios (87).

LA FASE AFERENTE DE LA QUIMIOTAXIS.

LOS QUIMIOATRACTANTES

Las sustancias quimioattractantes o "quimiotaxinas" (14), forman un grupo extraordinariamente heterogéneo de moléculas, con diferente origen, distintos receptores, y células blanco. Su composición química varía desde el oxígeno molecular (16), a proteínas de gran tamaño, e incluyen nucleótidos, como el AMPc (46), péptidos como los formil-metionil-péptidos (120), carbohidratos, como la fructosa (16), sustancias lipídicas, como el leucotrieno LTB₄ (114), y péptidos, como el C5a (39, 81). Las propiedades comunes a todos los quimioattractantes son, la capacidad de solubilizarse en el medio, formando un gradiente de concentración, y la presencia en la célula, u organismo blanco, de un sistema de recepción que detecte el gradiente, y se acople al sistema locomotor de la célula u organismo (16, 46, 68, 102, 121, 141). Los leucocitos además de responder a atractantes externos, han desarrollado un repertorio de quimioattractantes propios, que incluye entre otros (39, 68, 114, 121, 131), al LDGF (6), y sobretudo a las quimiotaxinas de la cascada del complemento, utilizadas en este estudio).

C5a y C5a-des-Arg como quimioattractantes.

Los principales quimioattractantes endógenos que se forman en el suero son C5a y C5a-des-Arg (37-39, 81, 116, 131). El C5a se origina durante la activación del complemento, es un péptido de 73 aminoácidos, con una arginina en su extremo carboxilo (38). Esta arginina es cercenada en segundos por el inactivador de la anafilotoxina, que es la carboxipeptidasa B sérica (15, 38, 45, 86, 104), con lo que se genera C5a-des-Arg que persiste por más tiempo (39). La pérdida de la arginina altera diferencialmente las capacidades anafilotóxica y quimiotáctica de C5a, la actividad anafilotóxica se reduce mil veces (37, 38), mientras que la actividad quimiotáctica persiste en el C5a-des-Arg (39, 81). C5a y C5a-des-Arg son quimiotácticas para linfocitos, PMN y monocitos, aunque con algunas diferencias. La respuesta de los linfocitos es más lenta y tardía (34). En los PMN el C5a-des-Arg tiene un décimo de la potencia, alcanza la mitad del efecto y requiere de una coquimiotaxina (37, 81). En los monocitos el efecto de ambas moléculas es equivalente y no se requiere de la coquimiotaxina (36, 81). C5a y C5a-des-Arg aportan más del 90% de la capacidad quimiotáctica del suero (39). Compuestos como el C567 y el fibrinopéptido B producen una actividad quimiotáctica marginal (39, 131). El C3a carece de actividad quimiotáctica (37, 38, 45).

El zimosán.

En condiciones experimentales, una forma usual para generar la actividad quimiotáctica del suero es mediante la incorporación de zimosán (4mg/ml), que es un extracto de la levadura Saccaromyces cervisiae. Activa al complemento por la vía alterna y a través del complemento induce varios efectos secundarios, como son activación plaquetaria vía C567 (82), o la liberación de una aminopeptidasa por monocitos y PMN (122), estos efectos requieren cofactores y un cierto tiempo de latencia. La generación de C5a con sus propiedades anafilotóxica y quimiotáctica es un efecto primario y rápido (34, 38, 48, 69, 82).

LOS RECEPTORES QUIMIOTACTICOS.

El atractante es captado por los leucocitos mediante receptores especializados. Existen varios tipos de receptores, especializados cada uno en captar una familia de atractantes, como son los receptores para los formil-metionil-péptidos (91, 121), C5a (81, 116), y otros (102, 121). Para efectuar la orientación celular no basta detectar al atractante, sino que es necesario determinar los cambios en su concentración entre los extremos de la célula, lo que requiere de un número mínimo de receptores distribuidos por toda la membrana (102, 121). La capacidad de los leucocitos para reorientarse continuamente depende de la renovación de receptores libres, almacenados en vesículas, y del desplazamiento al polo caudal de la célula, de los receptores ocupados (121, 141). Por este motivo para una quimiotaxis óptima es necesario que la célula mantenga una adecuada capacidad de movilidad de los receptores membranales (88, 116, 121).

EVENTOS ELECTROIONICOS ASOCIADOS A LA QUIMIOTAXIS.

La unión del atractante al receptor hace que éste desencadene una compleja cascada de eventos iónicos y eléctricos en los leucocitos, que incluye flujos de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ y otros, así como cambios sucesivos en el potencial de membrana (75, 87, 116, 141). La secuencia principal, aparentemente está constituida por tres etapas (90):

- a) una entrada intensa y rápida de sodio.
- b) una salida de potasio, de menor intensidad y velocidad.
- c) un aumento en el calcio citoplásmico.

El aumento de calcio se origina, principalmente, por la movilización de los depósitos en la membrana, y secundariamente por el ingreso de Ca^{++} extracelular (90, 121, 141). Los cambios en el Ca^{++} parecen ser un factor fundamental para la ramificación de la señal quimiotáctica, ya que activan proteínas en la membrana, en el citoplasma, y enlazan la señal con cambios en los nucleótidos cíclicos y en el citoesqueleto (141). Otros iones como son Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} y Co^{++} , también participan en la quimiotaxis (42). A pesar de esto, la célula responde quimiotácticamente aún en condiciones iónicas extracelulares extremas (141). Los cambios iónicos originan variaciones en los potenciales eléctricos de los monocitos y PMN. Se generan potenciales de acción de 55 a 90 mseg. de duración, y frecuencia de hasta 50/seg. (85), y se produce una despolarización inicial seguida de una hiperpolarización prolongada (116, 121). Estos eventos electroiónicos ocurren en milisegundos, mientras que los fenómenos quimiotácticos subsiguientes, especialmente los morfológicos, ocurren en minutos (42, 75).

Hay que señalar que ésta es un área de la quimiotaxis aún insuficientemente documentada, tanto en las bombas iónicas (en Paramecium se han demostrado 6 (75)), como en la universalidad de los fenómenos entre los leucocitos (141).

LIPIDOS DE MEMBRANA Y SUS CAMBIOS EN QUIMIOTAXIS.

Los eventos electroiónicos, y en particular el aumento de calcio desencadenan una serie de reacciones en los fosfolípidos de la membrana celular, que son indispensables para la quimiotaxis (116, 121). Las evidencias sugieren como secuencia principal, la transformación de fosfatidil-etanol-amina (FEA), en fosfatidil-colina (FC), y luego en ácido araquidónico. Este puede tomar dos vías metabólicas: la ciclooxigenación hacia prostaglandinas, o la lipooxigenación hacia leucotrienos (59, 114, 116, 121, 129). Los leucotrienos y las prostaglandinas son familias químicas complejas, con numerosos compuestos, producto de varios pasos, por varias vías metabólicas. Como hay vías paralelas y compuestos parcialmente equivalentes (114, 129), las reacciones individuales a este nivel no son tan críticas como las reacciones troncales iniciales, que controlan toda la vía metabólica, y en consecuencia la quimiotaxis (22, 92, 114, 116). En las bacterias, la quimiotaxis depende fundamentalmente de las reacciones de transmetilación que forman FC, por acción del Ado-Met (S-adenosilmetionina) (59, 100-102, 116, 129). En los leucocitos humanos, la reacción más crítica parece ser la transformación de FC en ácido araquidónico, catalizada por la fosfolipasa A2 (59-61, 116, 121), activada por el calcio y por los quimioattractantes (59, 116), y regulada por proteínas frenadoras, inducidas por los inhibidores de la quimiotaxis (61, 116).

Han sido demostradas relaciones dosis-efecto en estimulación e inhibición, entre atractante, unión a receptor, actividad de fosfolipasa A2, formación de ácido araquidónico, y el desarrollo de la morfología y de la quimiotaxis (59, 121). Sin embargo, hay reacciones asociadas, aún incompletamente conocidas, como la actividad de la fosfolipasa C (121), y hay algunas diferencias metabólicas entre los leucocitos de diferentes especies y entre los monocitos y los PMN humanos, lo que genera diferencias en la respuesta de ambas estirpes bajo ciertas condiciones (22, 100, 102, 121).

NUCLEOTIDOS CICLICOS RELACIONADOS CON LA QUIMIOTAXIS.

Los nucleótidos, cíclicos y no cíclicos, de adenosina y guanosina son importantes moduladores de la quimiotaxis, pero a diferencia del efecto clásico atractante del AMPc en Dictyostelium discoideum (46), en los leucocitos humanos y en términos generales, el aumento de GMPc favorece la quimiotaxis, mientras que el aumento de AMPc la inhibe. Este concepto es una sobresimplificación ya que los nucleótidos actúan en varios procesos y sus efectos cambian en función de tiempo, dosis y equilibrio. Además, se regulan mutuamente y son regulados por otros componentes celulares, determinando acciones muy complejas (43, 61, 87, 116, 121, 129, 141, 142).

Aunque GMPc no es leucotáctico (116, 141), las elevaciones moderadas del GMPc favorecen la quimiotaxis (121). El GMPc se une a receptores en la tubulina (137), e incrementa el ensamble de microtúbulos (43, 99, 141, 142) con lo que favorece la orientación y quimiotaxis de los leucocitos (116, 129, 141). Sin embargo, un aumento de más de 5 veces, del nivel basal de GMPc (43) cancela la respuesta quimiotáctica. Las elevaciones de AMPc en general disminuyen la quimiotaxis (46, 116, 129, 141), posiblemente por más de una vía, ya que se han demostrado efectos del AMPc sobre la metilación de los fosfolípidos (46, 61, 116), los microfilamentos (54, 116), los microtúbulos (142) y sobre las proteínas asociadas a microtúbulos (54). Los nucleótidos no cíclicos (ATP, GTP, etc.) parecen tener un papel más indirecto pero igualmente complejo (54, 103, 115, 116).

EL CITOESQUELETO.

El complejo de fenómenos membranales y submembranales inducidos por el atractante, genera señales, que activan al citoesqueleto. La naturaleza de estas señales aún no está definida (116), los cambios en las concentraciones de iones (46, 54, 100, 140), y en los nucleótidos cíclicos (43, 46, 54, 141), se enlazan directamente con el citoesqueleto, pero los patrones de cambios producidos por inhibidores que actúan en distintos niveles (43, 110), muestran que el fenómeno de activación es más complejo. Independientemente de su naturaleza, la señal quimiotáctica se bifurca (46), por una parte se activa la movilidad y por otra la orientación. Aunque ambos procesos están acoplados en la quimiotaxis, son esencialmente independientes, y existen condiciones de movilidad sin orientación, como es la quimiocinesis (69, 121), y de orientación sin movilidad, como en la inhibición por citocalasina B (80, 121). Ambos procesos son efectuados por el citoesqueleto en conjunto, la movilidad depende fundamentalmente de los microfilamentos, mientras que la orientación, la determinan fundamentalmente los microtúbulos (80, 117, 136), al grado que en los monocitos, las curvas dosis-respuesta para la quimiotaxis y para la orientación son idénticas (81). La división de funciones no es absoluta, pero el concepto del binomio movilidad-microfilamentos y orientación-microtúbulos, es básico para el análisis de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis.

El citoesqueleto regula la forma y movilidad de la célula, dirige la división celular, determina la viscosidad, los flujos de citoplasma y membrana, y también la posición y movilidad de organelos y proteínas de membrana (115, 121, 138). En quimiotaxis es el principal ejecutor de la fase efectora, dirigiendo el movimiento celular, la orientación, e incluso la distribución de los receptores de membrana (80, 121, 131). El citoesqueleto es, en esencia, una red constituida por los siguientes elementos:

Centro organizador de microtúbulos (MTOC).

El punto focal del citoesqueleto es la región designada como "microtubule organizing center" MTOC (58, 63). Existen varios tipos de MTOC, como cinetocoros y fragmoplastos (63). En los leucocitos el MTOC está constituido por uno o dos centriolos y el área osmiofílica pericentriolar (58, 63, 80, 138). Esta región actúa como punto de referencia desde donde el citoesqueleto determina la forma de la célula, es aquí donde se ensamblan los microtúbulos (56, 58, 63, 117). Aunque la morfología del MTOC se conoce a fondo, su funcionamiento bioquímico es poco conocido (63).

Los microtúbulos.

Los microtúbulos, análogos celulares del hueso, dan el sostén y rigidez necesarios para la forma y movimiento celulares. Son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro y longitud variable, elásticos (80, 117, 137, 138), rectos por sí solos, pero que se angulan en puntos de enlace con otros filamentos (117), irradian de la región pericentriolar, hacia, pero no hasta, el borde de la célula (10, 12). Los microtúbulos están formados en un 80% por tubulina, esta proteína cuyo dímero es la unidad básica de los microtúbulos, contiene dos receptores para GTP, el que se incorpora durante el ensamble, y se libera como GDP durante el desensamble microtubular (56, 63, 137). Sólo el 15% de la tubulina se encuentra en los microtúbulos, el 85% restante permanece como dímero soluble, estableciendo un equilibrio dinámico de ensamble-desensamble (108, 128, 137). Casi todo el 20% restante de las proteínas tubulares está constituido por dineína, una ATPasa específica del microtúbulo (47, 56).

Los microfilamentos.

Los microfilamentos, análogos del músculo, son considerados el motor celular (80, 103, 138). Efectúan los movimientos generales de la célula (116, 121, 138), así como los movimientos parciales en citoplasma, organelos y membrana (5, 121). Son fibras contráctiles, constituidas por actina polimerizada, de 5 nm de diámetro y longitud variable (115, 117, 138). Están presentes en todo el citoplasma pero son más abundantes en la zona submembranal y en el interior de los pseudópodos recientes (80, 121, 138). El movimiento dependiente de la viscosidad citoplásmica, que es fundamental para la movilidad de las amebas (5, 56, 103), es secundario en los leucocitos. En éstos, los microfilamentos regulan la movilidad por nuevos mecanismos (5, 79, 91, 116). Los microfilamentos también desempeñan una función estructural al enlazar los microtúbulos y la membrana, y sirven para anclar diversos receptores de membrana (88, 103).

Filamentos intermedios.

Constituyen un tercer tipo de filamentos, y son designados así porque su grosor es intermedio entre el de los microtúbulos y el de los microfilamentos (5, 80, 115, 117), su función y composición son poco conocidas (5, 80) y su participación en la movilidad es controvertida (5). Hay filamentos intermedios de diferentes grosores (2-3, 6-8 y 9-11 nm.), por lo que posiblemente existan varios tipos (117). Estos filamentos fueron identificados inicialmente en las amebas (5).

Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs).

El citoesqueleto y particularmente los microtúbulos están auxiliados por más de un centenar de proteínas (117), designadas en conjunto como MAPs (microtubule-associated proteins) (54, 56, 115, 117, 128). Las MAPs constituyen varias familias (128). Las MAPs "de alto peso molecular" aumentan la longitud y velocidad de la polimerización de los microtúbulos (56, 128) y parecen ser indispensables para el ensamblaje microtubular (128). Las "tau-MAPs" estabilizan los microtúbulos (128). Ciertas MAPs posiblemente enlacen los microtúbulos con otros tipos de filamentos (117), y las MAPs-2 enlazan entre sí a los filamentos de actina (115). La adición de MAPs a mezclas de microtúbulos y microfilamentos eleva mil veces la viscosidad citoplásmica (54).

Con microscopía electrónica, las MAPs pueden visualizarse como engrosamientos periódicos, o en los sitios de enlace de los microtúbulos (56, 117). Sin embargo debido a su gran número, la función y composición de muchas MAPs permanecen desconocidas (117).

La evolución del citoesqueleto.

Un aspecto colateral, pero importante, es que las estructuras citoesqueléticas han sido muy conservadas durante la evolución. La actina, que constituye los microfilamentos, se encuentra en prácticamente todos los eucariotes (115), las moléculas de actina del humano y de Entamoeba histolytica pueden copolimerizar (103), y la proteína ligadora de actina de una especie puede actuar sobre la actina de la otra especie (103). La evolución de los microtúbulos y de la tubulina ha sido también muy conservadora (47, 137) aunque una célula puede tener más de un tipo de microtúbulos (47, 56, 63, 137). La estructura básica de la tubulina, y su organización en no más de media docena de tipos de microtúbulos, con diferencias menores entre sí, es la misma desde los flagelados y los ciliados hasta los vertebrados (47, 137), pero en el caso de E. histolytica, aún se discute la presencia de microtúbulos (54, 106, 113).

RASGOS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA QUIMIOTAXIS.

Al inicio de la respuesta quimiotáctica, los leucocitos efectúan una reorganización característica, y compleja, de su estructura celular, que persiste durante toda la quimiotaxis. Esta reorganización se manifiesta

por la adquisición de una morfología típica, cuyo estudio, desarrollado principalmente por Gallin y perfeccionado con el uso del método de quimiotaxis frustrada, ha llevado a la descripción de un grupo de "rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis" (descritos en detalle en la sección de metodología), (43, 80, 116, 121, 138). El estudio con microscopía electrónica en este modelo, muestra que los monocitos y los PMN en quimiotaxis, se aplanan contra el filtro (138), emiten pseudópodos en la dirección del gradiente, que penetran parcialmente en el filtro (80, 121, 138). El centriolo adopta una posición centroanterior, mientras que el núcleo se desplaza a la región caudal (43, 80, 121, 138). Los organelos, como mitocondrias y lisosomas, se acumulan en la porción frontal de la célula entre los pseudópodos y el núcleo (80, 138). En una etapa tardía algunas vesículas fagocíticas se acumulan en la zona caudal de la célula (121), donde, sobretudo en los PMN, puede observarse al urópodo. Esta es una proyección celular cuya naturaleza y función son diferentes a la de los pseudópodos frontales (121, 141).

El citoesqueleto se modifica y hay un aumento en el número de microtúbulos visibles, especialmente en el área pericentriolar (43, 80, 116, 138, 141). La red submembranal de microfilamentos pierde continuidad, y en el frente de avance pasa, de una retícula homogénea, a un patrón moteado, con concentraciones más densas en donde el pseudópodo se pone en contacto con el filtro (80, 121). Los filamentos intermedios también aumentan y son más frecuentes en la zona del urópodo (121, 138). Hay un flujo moderado de vesículas lisosomales hacia la región frontal (12, 116, 121). En la membrana aparece una serie de proyecciones puntiformes, filiformes y laminares, distintas de los pseudópodos y del urópodo, que se encuentran en las zonas laterales del leucocito (43, 91, 121).

Todos estos rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis pueden ser agrupados en función de varios criterios. Ciertos rasgos se asocian primariamente con movilidad, tal es el caso del aplanamiento y la emisión de pseudópodos. Otros rasgos se asocian primariamente a orientación, como el eje de polaridad pseudópodo-centriolo-núcleo y la distribución de los organelos. Por otra parte, ciertos rasgos son indicadores directos de la actividad quimiotáctica, como son los cambios en microtúbulos y microfilamentos, que señalan la funcionalidad de los procesos de orientación y movilidad celular. Otros rasgos, como la distribución de organelos, son solamente indicadores indirectos ya que son consecuencia y no parte intrínseca del proceso (12). Existen ligeras diferencias entre monocitos y PMN. Por ejemplo, el desplazamiento caudal del núcleo en los monocitos es mucho menos intenso que el mismo en los PMN (138).

LA FASE EFERENTE DE LA QUIMIOTAXIS.

INICIO DE LA FASE EFECTORA DE LA QUIMIOTAXIS.

La señal quimiotáctica bifurcada activa simultáneamente la movilidad y la orientación, y la fase efectora se inicia con los cambios citoesqueléticos que dirigirán estas acciones. Por una parte, los microfilamentos estimulados por el aumento de calcio (42, 90), la actividad de ATPasas (79, 103), y otros factores (69, 116, 121), aumentan la polimerización, los enlaces y adoptan una distribución menos homogénea, en preparación para el movimiento celular (80). Por otra parte, el centriolo cambia su posición, en lo que constituye el primer cambio morfológico observable (80). La estrella de microtúbulos, inducida por el incremento de Ca^{++} , la actividad de ATPasas específicas (47, 56), y otros factores, produce un aumento en los microtúbulos (80, 138). Los cambios en los microfilamentos y los microtúbulos inducen una serie de modificaciones características en la organización celular que constituyen los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis. La movilidad y la orientación, son dos capacidades básicas, y autónomas entre sí, de los leucocitos y otras células (5, 116), pero para la quimiotaxis deben ser acopladas. Los mecanismos por los que la orientación asume la dirección jerárquica y controla la movilidad, permanecen prácticamente desconocidos (138).

EL MANTENIMIENTO DE LA RESPUESTA

Los monocitos y los PMN responden rápidamente a los gradientes quimiotácticos, hay cambios iónicos en milisegundos (42, 75, 80, 138), cambios morfológicos al minuto (10, 80, 102, 121) y la respuesta ya es completa a los diez minutos (80, 121, 139). Sin embargo, los leucocitos pueden mantener la respuesta quimiotáctica por horas, e incluso por días. Durante todo este período la célula mantiene unas características extraordinariamente estables en la continuidad de su avance, su morfología, e incluso en su equilibrio bioquímico, pero esta aparente estabilidad enmascara un equilibrio dinámico, extremadamente intenso y complejo (140, 141).

Forman parte de este equilibrio dinámico procesos continuos, procesos de alternancia cíclica y procesos con restricción topográfica (46, 117, 140). Por ejemplo, el núcleo se mantiene continuamente en posición caudal (80, 138, 141). Los pseudópodos, se emiten, absorben y vuelven a emitir (30, 138). Por otra parte, los receptores al atrayente, simultáneamente se renuevan al frente, se deslizan por los lados, y se concentran al fondo de la célula donde son reabsorbidos o expulsados (121). Una característica, aparentemente sencilla, como es el número de microtúbulos, representa el equilibrio entre la polime-

rización en el MTOC, la despolimerización periférica, que difiere entre los polos frontal y caudal (10), el desplazamiento de las subunidades microtubulares entre sí (47), y las interacciones con otros filamentos (80, 117).

La estabilidad aparente de la reorganización celular para la quimiotaxis es la que permite el estudio morfológico, pero los estados observables son valores de equilibrio, debidos a la dinámica subyacente al proceso y morfología quimiotácticos.

LA CONCLUSION FISIOLÓGICA DE LA RESPUESTA.

La respuesta quimiotáctica concluye generalmente en alguna de las tres situaciones siguientes: a) extinción del gradiente, b) arribo al foco del gradiente y c) frenado por moduladores inmunológicos.

La extinción, natural o experimental, del gradiente, puede originarse por la desaparición del atráctante o por que éste alcance una concentración homogénea. En el primer caso la célula retorna al estado de reposo y en el segundo pasa a una movilidad quimiocinética, aumentada pero ya no direccional.

El arribo al foco, o el encuentro con el organismo o estructura blanco, originan el relevo de funciones en la secuencia fagocítica, y en consecuencia, la morfología quimiotáctica es sustituida por la morfología fagocítica (58, 116, 121, 141).

La conclusión de la quimiotaxis también puede resultar de la modulación por señales bioquímicas, señales que pueden originarse en el propio leucocito (p. ej.: enzimas y prostaglandinas) (44, 52, 121). En otros leucocitos, como es el caso del factor linfocítico inhibidor LIF (33), del factor inhibidor de la migración, MIF (93, 99, 125), y del factor inmovilizador de neutrófilos, NIF (52). O en otros reguladores endógenos como algunos glucocorticoides (60, 110), y la carboxipeptidasa B sérica (15, 39).

Los fenómenos asociados a la conclusión de la quimiotaxis están aún insuficientemente sistematizados por lo que todavía es difícil separar objetivamente conclusión e inhibición, aunque las evidencias disponibles, sugieren que se trata de procesos distintos, y que inhibidores como colchicina (80, 137) o citocalasina B (79, 80) no producen una conclusión prematura, sino una verdadera inhibición.

LA INHIBICION DE LA QUIMIOTAXIS.

Las condiciones que llevan a la inhibición o atenuación de la quimiotaxis de los leucocitos pueden agruparse en tres categorías: fisiológicas, congénitas y externas (medicamentos e inhibidores biológicos).

La inhibición fisiológica, que muchas veces corresponde a la conclusión de la respuesta, puede producirse por la desaparición del gradiente, la llegada al punto de máxima concentración del attractante, el contacto con el organismo o estructura blanco y/o la modulación por señales bioquímicas.

La inhibición por defectos genéticos incluye ciertas deficiencias en PMN y/o mononucleares, que pueden ser parte de alteraciones muy amplias, como son los defectos quimiotácticos observados en los síndromes de Down (8, 9) y Turner (129), o más restringidas, como en los síndromes de Chediak-Higashi, de disfunción de la actina, y otros (8, 33, 43, 68, 121, 129).

Entre los inhibidores externos, hay sustancias que actúan sobre los mecanismos reguladores, tal como ciertos corticoides o que cortan algún paso de la respuesta, como son la colchicina, la podofilotoxina (137) y varias citocalasinas. También existen organismos que generan factores capaces de cortar o desregular la respuesta quimiotáctica de los leucocitos y que van desde los virus asociados a la deshidrogenasa láctica (124) y de la leucemia murina (24), hasta el hongo Stachybotrys complementi (62). Brucella abortus produce un factor soluble en metanol que es anti quimiotáctico (14). Bordetella pertusis inhibe la quimiotaxis transfiriendo una adenil ciclasa que eleva, en forma incontrolable, la cantidad de AMPc intraleucocitario (27).

La complejidad que a nivel subcelular presenta el fenómeno quimiotáctico, y los diferentes sitios de acción de los distintos inhibidores, generan diversos patrones de alteración de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis. La comparación de estos patrones permite delimitar, hasta cierto punto, los niveles de acción de otros inhibidores. A continuación se resumen las características de la inhibición producida por los inhibidores seleccionados, como testigos, para este estudio.

CITOCALASINA B.

La citocalasina B inhibe la quimiotaxis, y la movilidad en general, de los leucocitos al impedir el ensamble de los microfilamentos de actina (10, 29, 44, 80, 110, 116), lo que se traduce a nivel celular

como la pérdida del movimiento y de los rasgos de movilidad, en tanto se conservan la orientación y los rasgos asociados a ésta (80, 116, 121). Existe una buena correlación entre las dosis para inhibir quimiotaxis y el desarreglo de los microfilamentos (80, 121).

A nivel molecular, la citocalasina B ejerce su acción directa al unirse al extremo "barbado" de la actina (79), donde se genera el crecimiento rápido de los microfilamentos (117). Esta unión origina un doble efecto primario: Por una parte desacelera enormemente la etapa más temprana de la polimerización de la actina, al impedir la adición de monómeros a los oligómeros (79). La polimerización continúa en forma mucho más lenta, en el otro extremo del oligómero, conocido como cabeza de flecha (79, 117). Además la unión de la citocalasina B con el extremo barbado de la actina, también limita profundamente la unión de ésta con sus proteínas asociadas, y con las proteínas de enlace con los microtúbulos (54, 117), lo que reduce mil veces la capacidad del citoesqueleto de regular la viscosidad citoplásmica (54).

Este doble efecto de la citocalasina B se ramifica en diversos efectos secundarios, como cambios de viscosidad (54, 79), alargamiento de microtúbulos (117), liberación de hidrolasas ácidas (106) etc. La citocalasina B también "modula" los efectos de otras sustancias, por ejemplo, sinergiza la inhibición quimiotáctica de la colchicina (29). Paradójicamente, a baja concentración amplifica la respuesta quimiotáctica a atractantes tales como el FMLP (44), quizá a través de su efecto facilitador del flujo de iones (Na^+ y Ca^{++}) en la membrana (42, 141).

COLCHICINA

La colchicina inhibe la quimiotaxis de los monocitos al impedir el ensamble de los microtúbulos, y afecta tanto la movilidad, como la orientación del leucocito (4, 7, 11, 29, 80, 116, 138). Hay correlación entre las dosis inhibitorias de microtúbulos y de orientación, en tanto que la formación de pseudópodos se afecta en una forma más indirecta (80, 121, 138).

A nivel molecular la colchicina se une uno a uno con los dímeros de tubulina en solución, a través de un receptor de alta afinidad. La unión es no covalente y reversible. Evita el ensamble de microtúbulos, pero no afecta a los microtúbulos previamente formados (108, 137). Este receptor es compartido con la podofilotoxina, que también inhibe microtúbulos (108, 137).

La unión con la tubulina no es el único efecto directo de la colchicina (135, 137), pero es innegablemente el principal responsable de la inhibición de la mitosis y de la quimiotaxis (137). Otros efectos indirectos,

o paralelos incluyen redondeamiento (29, 138), pérdida de adhesividad (29), salida de calcio (42), transporte de membrana (141), secreción (137) y la S-adenosil-L-metilación de la membrana (101).

VIMBLASTINA.

La vimblastina inhibe la quimiotaxis al impedir el ensamble de los microtúbulos (11, 113, 137, 138, 141), hay correlación entre las dosis inhibitorias de microtúbulos y orientación (106, 138) y esta dosis está por debajo de las dosis tóxicas (106).

A nivel molecular la vimblastina se une dos a uno con los dímeros de tubulina en solución, a través de receptores de alta afinidad (137), diferentes a los que utiliza la colchicina (106, 137), disponibles en la tubulina soluble, pero no en la ya ensamblada en microtúbulos, sobre los que no ejerce efecto (137).

Pese a que la colchicina y la vimblastina actúan sobre la misma molécula y en la misma fase inicial del ensamble microtubular (113, 137), sus efectos sólo son parcialmente semejantes. La vimblastina al igual que la colchicina, inhibe mitosis, quimiotaxis, particularmente orientación (11, 137), S-adenosil-L-metilación (101) y otros (141), pero induce la aparición de prominencias en la membrana celular (11), y a partir de ciertas dosis, el depósito de cristaloides de complejos vimblastina-tubulina (137, 138).

HIDROCORTISONA.

La hidrocortisona inhibe la quimiotaxis de los monocitos humanos al bloquear el metabolismo de los lípidos de membrana, mediante una proteína frenadora que corta la respuesta en una etapa post-receptor muy temprana (20, 59-61, 92, 110, 116, 125, 134, 135).

La acción fundamental, aunque indirecta, de la hidrocortisona a nivel molecular, es la inducción de la síntesis de una proteína frenadora denominada lipomodulina, descrita por Hirata en PMN de conejo (22, 60, 61, 116), o la macrocortina presente en los macrófagos peritoneales de ratón (22). La proteína frenadora inhibe a la fosfolipasa A2, e interrumpe la transformación de fosfatidilcolina en ácido araquidónico, lo que corta las vías generadoras de leucotrienos y prostaglandinas (60, 116). Las consecuencias de esta acción abarcan tanto la disminución de la quimiotaxis, donde existe una buena correlación dosis-efecto entre la unión glucocorticoide-receptor, la actividad de la fosfolipasa, y la respuesta quimiotáctica (59, 115). Como decrementos en la movilidad aleatoria (110), la liberación de enzimas lisosomales (20, 60), y

la fagocitosis (60, 84), así como la alteración en el número y función de diversos receptores (40, 134).

Cabe señalar que la hidrocortisona requiere penetrar a la célula y unirse a un receptor citoplásmico para ejercer su acción, ya que el fosfato de hidrocortisona, que sólo se une a los receptores de superficie, carece de este efecto (110). También requiere de la activación del sistema de síntesis protéica (134), ya que su efecto puede ser cancelado por actinomicina D y cicloheximida (60). La aparición relativamente temprana de su efecto en los monocitos (84, 110) sugiere la activación simultánea de la síntesis protéica por la vía corta ribosomal y por la vía larga intranuclear que requiere más de 5 horas para manifestarse (22, 115).

ESPECTRO DE ACCION DE LOS INHIBIDORES.

La citocalasina B, la colchicina y la vimblastina pueden considerarse como inhibidores "universales" de la quimiotaxis, pues ejercen su efecto sobre prácticamente la totalidad de las células eucarióticas. El espectro de acción de las 3 drogas incluye, específicamente, a E. histolytica (106, 123), y a los leucocitos humanos: PMN, monocitos y linfocitos (80, 88, 99, 137, 141).

En contraste, los efectos de la hidrocortisona varían extraordinariamente según la especie y estirpe de la célula blanco. A diferencia de los linfocitos humanos (110), o de los macrófagos de ratón (134), los monocitos humanos son glucocorticoresistentes (134, 135), no siguen los ritmos circadianos, determinados por el cortisol en los linfocitos (1, 65), y sobreviven sin señales de toxicidad concentraciones de hasta 10 000 nM de glucocorticoides, que son líticas para los linfocitos (135). El efecto inhibitorio de la quimiotaxis aparece a concentraciones mucho menores a las que inducen los efectos tóxicos (110), y es reversible (20, 135). Finalmente, algunos estudios muestran un efecto inhibitorio de la quimiotaxis de monocitos que no se presenta en PMN en condiciones equivalentes (110).

MÉTODOS PARA EVALUAR LA QUIMIOTAXIS.

La quimiotaxis puede ser evaluada por distintos métodos, cada uno con ventajas y desventajas particulares. Los resultados que proporcionan son generalmente concordantes, aunque existen diferencias en función de las facetas de la quimiotaxis en las que se sustentan. Estos métodos incluyen la quimiotaxis en capilar, en laminilla, en agarosa y las múltiples variantes de la quimiotaxis en sistemas de cámaras.

Los métodos en capilar (111, 118), y agarosa (91), comparan las distancias recorridas por una población celular en quimiotaxis y por una población testigo.

La observación cinematográfica de quimiotaxis en laminillas analiza células individuales en forma dinámica (12, 139, 141).

Los métodos de quimiotaxis en cámaras, que incluyen los sistemas de cámaras ciegas (36), cámaras de Boyden y multicámara (17, 68, 141), son los que ofrecen mayor precisión y flexibilidad experimental. Estos métodos consisten esencialmente, en dos cámaras, la superior contiene a las células, y la inferior al attractante. Ambas cámaras están separadas por uno o dos filtros con poros de tamaño variable, pero definido (17, 36, 68, 69, 141).

Entre las variantes de la quimiotaxis en cámaras están:

Los métodos de marcaje radioactivo, con cromo 51 y tecnecio 99, que miden la cantidad de radiación, y consecuentemente de células que han pasado a la cámara inferior (41, 95).

El método del frente de avance, que mide las distancias máximas que las células han penetrado en el filtro (109, 141).

El método de doble filtro, que evalúa el número de células, que después de atravesar un primer filtro, han quedado atrapadas en un segundo filtro, al que ya no pueden penetrar. Este método ha sido el empleado en la mayor parte de los estudios de esta línea de investigación (8, 23, 25, 69, 70, 74, 94, 129).

Como variante de estos métodos, Malech et al., introdujo el método de quimiotaxis frustrada, seleccionado para este estudio (y que se describe en la metodología). Este método permite una observación muy precisa de los fenómenos morfológicos que ocurren, en función de la reorganización celular que acompaña a la respuesta quimiotáctica, y que se manifiestan como la aparición de una serie de rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis (80, 138).

M A T E R I A L Y M E T O D O .

METODO DE QUIMIOTAXIS FRUSTRADA (esquema).

Los materiales y métodos empleados se describen a continuación, y son esquematizados en las figuras 1 a 3. En esencia, el método empleado fue el de quimiotaxis "frustrada" en cámaras de Boyden, descrito por Malech et al. en 1977 (80).

La característica fundamental de este modelo es que las cámaras superior e inferior son separadas con un filtro Millipore de poros subcelulares ($0.45 \mu\text{m}$), que permite la difusión de las sustancias, atrayentes e inhibidoras, y la activación de los leucocitos en la cámara superior, pero no su progreso hacia la fuente del estímulo. Las células inician la respuesta, alcanzan el borde superior del filtro, pero no pueden llegar más allá y en estas condiciones son fijadas, procesadas y analizadas.

El método consta de tres etapas que son: El ensayo quimiotáctico (fig. 1), el procesamiento para microscopía electrónica (fig. 2), y la evaluación morfológica (fig. 3).

Para cada condición experimental se efectuaron no menos de seis experimentos, por duplicado. La viabilidad de las células se verificó antes y después del ensayo quimiotáctico en las células aún en suspensión. La cuantificación de los rasgos se efectuó en forma ciega, por duplicado y por un solo observador.

Con la finalidad de aproximarse más al modelo experimental ya probado para el FILM se introdujeron dos variantes al método de Malech. El número de células en la cámara superior se redujo para evitar la aglomeración de los monocitos, y los inhibidores de referencia no se preincubaron, sino que se coincubaron, con el atrayente, esto para reproducir las condiciones de utilización del sobrenadante de E. histolytica.

Figura 1. QUIMIOTAXIS FRUSTRADA - ensayo experimental.

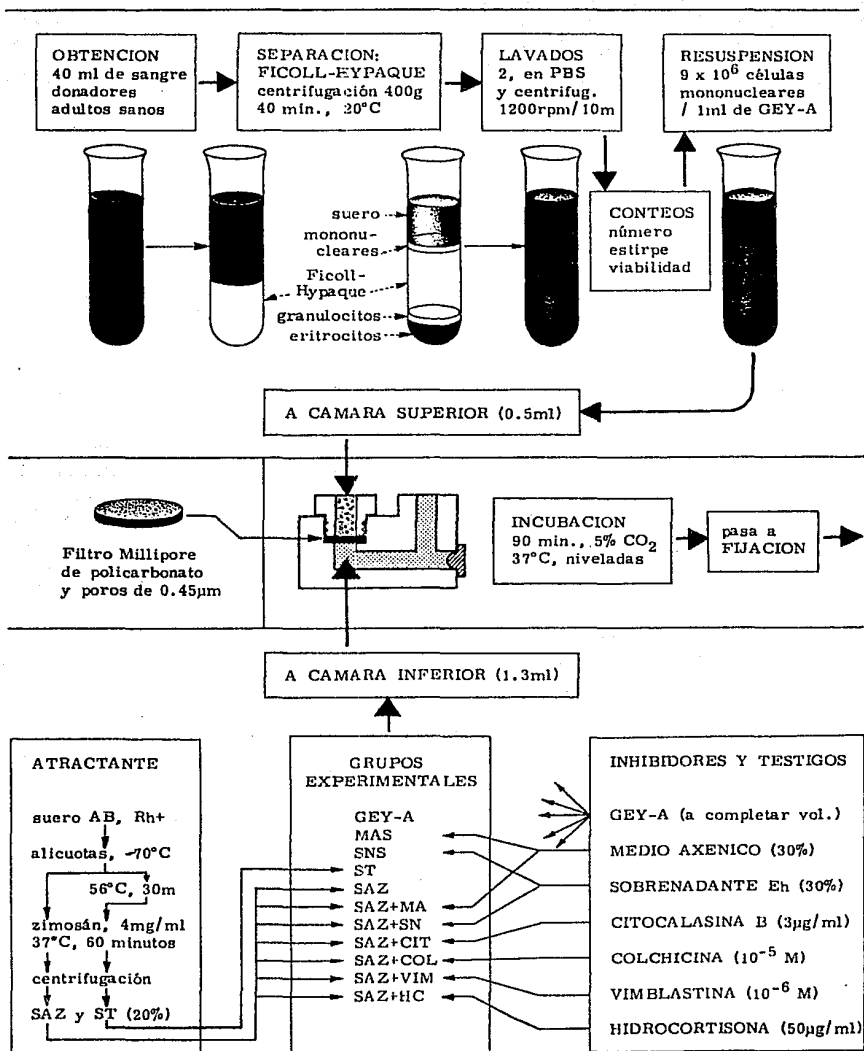


Figura 2. QUIMIOTAXIS FRUSTRADA - procesamiento para microscopía electrónica.

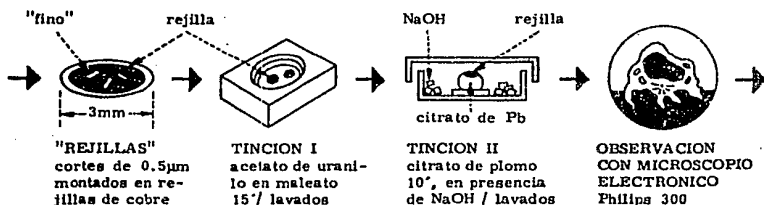
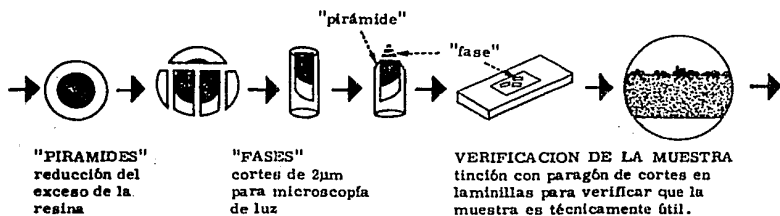
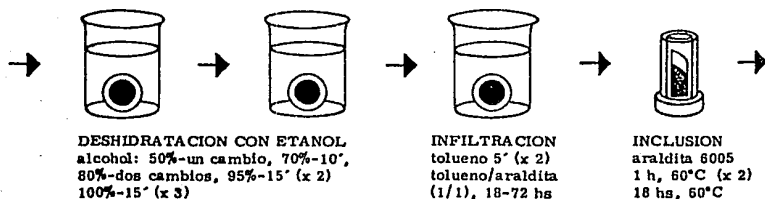
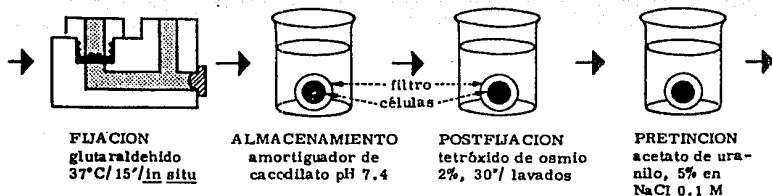
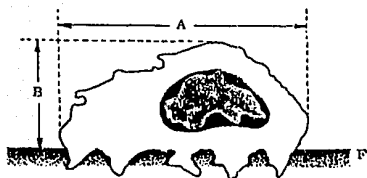
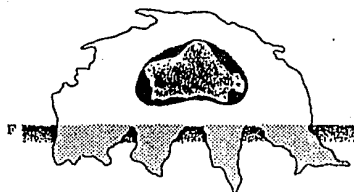


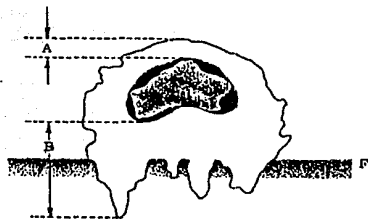
Figura 3. Métodos de evaluación de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis seleccionados para el análisis.



Índice de aplanamiento (A/B)



Número de pseudópodos / célula



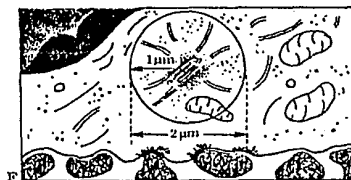
Índice nuclear (B/(A+B))



Alineación centrior



Índice de organelos (A/T)
(organelos en la mitad inferior /
organelos totales en la célula)



Microtúbulos asociados al centriolo
(número) y microfilamentos (zonas
densas en sitios de adhesión)

MATERIAL.

CELULAS

Células mononucleares de sangre venosa periférica, de donadores adultos sanos (40 ml).

ATRACTANTE E INHIBIDORES

Suero humano AB, Rh+: Banco Central de Sangre, C.M.N., I.M.S.S., México.
Zymosan A: Sigma Chemical Co. St. Louis, MO., E.U.

Sobrenadante de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica (y medio axénico):

Centro de Estudios sobre Amibiasis, C.M.N., I.M.S.S., México.

Citocalasina B (obtenida de Helminthosporium dematioides): Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., E.U.

Colchicina: E. Merck S.A., México D.F., México.

Vimblastina (sulfato): Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., E.U.

Hidrocortisona (succinato): Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., E.U.

REACTIVOS DIVERSOS

Acetato de uranilo: E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Albumina humana: Ind. biológicas mexicanas, Netzahualcoyotl, Méx., México.

Araldita 6005: Ciba, México D.F., México.

Azul tripano: Grand Island Biol. Co., Gran Island, N.Y., E.U.

Cacodilato de sodio: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., E.U.

Citrato de plomo: K & K Laboratories Ing., N.Y., E.U.

DDSA (anhídrido dodecilsuccínico): E. Merck, Darmstadt, Alemania.

DMP 30 (2,4,6-tris (dimetilaminometil) fenol): E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Estreptomycin (sulfato): Farmacéuticos Lakeside, México D.F., México.

Ficoll: Pharmacia, Uppsala, Suecia.

Gey (medio de): Grand Island Biol. Co., Grand Island, N.Y., E.U.

Glutaraldehído: Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., E.U.

Heparina: Lab. Reforma, México D.F., México.

Hypaque: Winthrop Laboratories, New York, N.Y., E.U.

Penicilina G: Farmacéuticos Lakeside, México D.F., México.

Tetróxido de osmio: E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Tolueno: Lab. Quím. Monterrey, Monterrey, N.L., México.

MATERIALES ESPECIALIZADOS

Cámaras de Boyden: Neuroprobe Corp., Bethesda MD., E.U.

Filtros Millipore de policarbonato y poros de 0.45 µm de diámetro:

Millipore Corp., Bedford, Mass., E.U.

Tubos de poliestireno de 17 x 100 mm: Falcon, Oxnard, CA., E.U.

Ultramicrotomo manual Porter Blum MT-1: Casa Sorval, México D.F., México.

METODO: ENSAYO QUIMIOTACTICO.

Preparación de las células.

Las células mononucleares se aislaron y concentraron en un gradiente de Ficoll-Hypaque siguiendo el método de Boyum (18). Las células se obtuvieron a partir de muestras de 40 ml de sangre venosa de donadores adultos sanos, heparinizadas inmediatamente, con 10 unidades de heparina sódica por mililitro de sangre, ésta se diluyó inicialmente uno a uno en un amortiguador salino de fosfatos (PBS) a pH = 7.4. Alícuotas de 10 ml se depositaron sobre alícuotas de 5 ml de una mezcla de: 24 partes de Ficoll al 9% y 10 partes de Hypaque al 33%, en tubos de poliestireno de 17 x 100 ml. Se centrifugó a 400 g por 40 minutos, a 20° C, se recogió la interfase, se lavó dos veces y las células se resuspendieron a una concentración de 9.0×10^6 cel./ml en medio de Gey con 2% de albúmina humana, 100 unidades de penicilina y 100 µg de estreptomocina por mililitro (GEY-A).

Los conteos diferenciales con tinción de Wright y confirmación con peroxidasa y naftol-ASD estearasa de cloroacetato (30, 35), revelaron que $30 \pm 5\%$ de las células mononucleares obtenidas eran monocitos y el resto linfocitos, con $2 \pm 1\%$ de PMN, principalmente basófilos (concordando con Boyum (18)). La viabilidad celular medida por exclusión de azul tripano fue mayor del 95% en todos los casos. Esta concentración de 3×10^6 monocitos /ml fue menor que la utilizada por otros autores (80, 138) lo que evitó la aglomeración de células en la superficie del filtro.

Generación del quimioattractante.

El quimioattractante utilizado fue el suero activado por zimosán (SAZ). Este induce la formación de cierta cantidad de C5a, poderoso atractante para los monocitos (131). Ciertas peptidasas del propio suero atacan al C5a y al C5a-des-Arg y eliminan su actividad quimiotáctica (45, 86), lo que obligó a la utilización inmediata del suero una vez que éste había sido activado.

El SAZ se preparó con suero humano fresco de donadores adultos sanos con sangre tipo AB, Rh+, que se guardó en alícuotas de 2 ml congeladas a -70° C. hasta su uso. El día del experimento se descongelaron dos alícuotas y se incubaron 30 min. a 37° C. con 4 mg de zimosán por mililitro de suero. El zimosán se eliminó posteriormente por centrifugación, de acuerdo con el método de Ward (131). Un suero testigo se preparó calentando una de las alícuotas a 56° C por 30 minutos, antes de agregarle el zimosán.

Inhibidores de la quimiotaxis.

El factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) se encuentra en el líquido sobrenadante de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica, (proporcionados amablemente por la Q.F.B. Margarita de la Torre, del Centro de Estudios sobre Amibiasis del C.M.N. del I.M.S.S. de México, D.F.). Los sobrenadantes provinieron de cultivos de 72 horas, (lo que correspondió a la fase logarítmica media), a 37°C y contienen 2.0 - 2.5 x 10⁵ amibas/ml de la cepa HM-1. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 200 g por 5 minutos, y filtración por filtros Millipore con poros de 0.45 µm de diámetro. Posteriormente se conservaron congelados a -70°C, en alícuotas de dos mililitros hasta su utilización, en un período no mayor de 3 meses.

Como testigo se utilizó medio axénico incubado a 37°C por 72 horas, en ausencia de amibas, y procesado y almacenado en la misma forma que el sobrenadante. Los inhibidores testigo fueron: citocalasina B, colchicina, vimblastina e hidrocortisona, cuyas características ya se señalaron.

Ensayo quimiotáctico.

Para el ensayo se colocaron en el compartimiento superior 1.5 x 10⁶ monocitos suspendidos en 0.5 ml de medio de GEY-A (= 4.5 x 10⁶ mononucleares por cámara). En la cámara inferior se colocaron, según el caso, 0.4 ml del atractante (SAZ), o su control (ST), disuelto en 1.3 ml de medio de GEY-A. La movilidad aleatoria se ensayó en cámaras de Boyden que contenían únicamente 1.8 ml de GEY-A. El efecto del sobrenadante sobre células no estimuladas se evaluó agregando 0.5 ml de sobrenadante (o de medio axénico), en sustitución de un volumen equivalente de medio de GEY-A.

En los estudios de inhibición, se colocaron el SAZ y 0.5 ml del sobrenadante (o su testigo, el medio axénico), en reemplazo del mismo volumen de GEY-A. Estudios previos mostraron que este esquema produce un efecto inhibitorio (53 ± 2%) del sobrenadante sobre la quimiotaxis de los monocitos, significativo y reproducible (69, 72, 73).

Los inhibidores testigo fueron incorporados a la cámara inferior a lo largo de todo el ensayo. La colchicina y la vimblastina se utilizaron a 10⁻⁵ M y 10⁻⁶ M respectivamente (138), la citocalasina B se utilizó a concentración de 3.0 µm/ml (80), y la hidrocortisona a 50 µm/ml (60). Estas dosis fueron seleccionadas porque inhiben la quimiotaxis cerca del 50%, magnitud equivalente a la producida por el FILM en las condiciones experimentales empleadas. Las cámaras de Boyden fueron niveladas para evitar corrientes hidrodinámicas a nivel del filtro, e incubadas a 37°C, por 90 minutos, con 5% de CO₂.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Fijación y conservación.

Inmediatamente finalizado el ensayo quimiotáctico, las células adheridas al filtro fueron fijadas in situ, al reemplazar cuidadosamente el contenido de las cámaras, por una solución de glutaraldehído al 2%, en cacodilato de sodio 0.1 M, a 37°C por 15 min. Posteriormente los filtros fueron retirados de las cámaras de Boyden y almacenados en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M y pH 7.4, hasta su inclusión.

Tinción e inclusión.

Los filtros y las células adheridas a ellos, fueron incluidos de acuerdo a la secuencia que aparece en la figura 2. Los filtros fueron postfijados con tetróxido de osmio 30 min., a temperatura ambiente y en campana de extracción. Fueron lavados dos veces con amortiguador de cacodilato de sodio, después fueron teñidos con acetato de uranilo y magnesio (al 5% en NaCl 0.1 M) por 60 min. y fueron deshidratados en concentraciones progresivas de etanol.

La infiltración se inició con tolueno, en este paso el filtro se volvió transparente y más flexible, pero su forma y su relación con las células no se afectaron. A continuación el filtro fue depositado en una solución al 50% de tolueno y resina araldita, esta resina se preparó al mezclar 5 ml de araldita 6005, con 3.5 ml de anhídrido dodecenil succínico (DDSA), y 0.12 ml de tri-dimetil-amino-metil-fenol (DMP 30). La infiltración terminó con dos pasos de 60 min. a 60°C en araldita al 100%.

Una vez infiltrados, los filtros fueron cortados, se eliminó la porción acelular y se colocaron en cápsulas de manera que el filtro quedase perpendicular al futuro plano de corte. Las cápsulas se llenaron con araldita y se incubaron a 60°C por 18 horas, periodo en el que la resina polimerizó y endureció.

Obtención de las rejillas.

Los filtros fueron cortados con un ultramicrotomo (Porter Blum MT-1, manual), obteniendo secciones de 2 μ m de grosor. Estas secciones se tiñeron con paragón y se observaron con microscopio óptico, para verificar que fuesen útiles.

Se obtuvieron las secciones definitivas, de 0.5 μm de grosor, que se montaron en rejillas de cobre, y se tiñeron con acetato de uranilo y magnesio al 1% en una solución uno a uno de metanol y agua, por 15 min.. Después de múltiples lavados en metanol al 100%, al 50% y en agua, las rejillas se tiñeron con citrato de plomo, al 0.25% en una solución 0.1 N de NaOH, durante 10 min., se volvieron a lavar y se dejaron secar sobre papel filtro.

Para evitar contar la misma célula más de una vez, se observaron sistemáticamente secciones seriadas separadas un mínimo de 20 μm una de la otra.

Obtención de fotografías.

Las secciones fueron examinadas con un microscopio electrónico Philips 300, y se fotografiaron de acuerdo a normas establecidas en un experimento piloto. Las células se fotografiaron al máximo aumento en que apareciesen completas (7000 - 10000x). El análisis de los microtúbulos y microfilamentos se efectuó en fotografías con un aumento fijo de 74 000 x.

Se incluyeron únicamente los monocitos adheridos al filtro y se fotografiaron cuatro a 16 células por cámara, las primeras por orden de aparición en el microscopio, por lo que se analizó un mínimo de 48 monocitos por grupo experimental, para cada rasgo estructural.

Se excluyeron las células sin contacto con el filtro y las técnicamente inadecuadas (rotas, con precipitados, etc.)

En las condiciones experimentales de este estudio, más del 93% de las células que intentaron penetrar al filtro fueron inequívocamente monocitos, por tinciones especiales (peroxidasa) (30, 35) y morfología ultraestructural (núcleo grande, lobulado, con cromatina periférica y citoplasma abundante con lisosomas, fagosomas y fagolisosomas, etc.) (80, 138).

METODO DE ANALISIS DE LOS RASGOS MORFOLOGICOS.

Los rasgos morfológicos analizados aparecen en la figura 3. Los rasgos ultraestructurales se seleccionaron, entre otros, por permitir una cuantificación objetiva, y se evaluaron utilizando una combinación de Malech (80), Zakhireh (138) y criterios derivados de nuestra propia experiencia (48-50, 67). Los primeros dos rasgos (aplanamiento de las células y emisión de pseudópodos), están primariamente relacionados con el movimiento celular, mientras que los tres siguientes (localización relativa del núcleo, alineación centriolar y distribución de los organelos) son rasgos sobresalientes de la orientación celular (80, 138). Los microfilamentos son proteínas contráctiles responsables de la locomoción, mientras que los microtúbulos son esenciales para la forma de la célula (116). Esta categorización aparentemente simplista es conveniente para los propósitos de la discusión, pero se debe estar consciente de la sobresimplificación de un problema biológico tan complejo como es la quimiotaxis (141).

Aplanamiento celular - (índice de aplanamiento).

Los monocitos en quimiotaxis y en contacto con el filtro, se aplanan contra éste, mientras que las células no estimuladas y las inhibidas mantienen una forma mucho más redondeada (80, 138).

El aplanamiento se cuantificó mediante el índice A/B (gráfica 3), donde A representa el ancho máximo de la célula y B la distancia perpendicular que va de la superficie del filtro al punto más alto de la célula. Se excluyeron las largas y delgadas proyecciones de los lamelípodos que eventualmente se observaron.

Emisión de pseudópodos - (# pseudópodos / célula).

Los monocitos en quimiotaxis emiten numerosos pseudópodos, a lo largo de la zona de contacto con el filtro, y casi ninguno en otras direcciones, esto distingue la respuesta quimiotáctica de la quimiocinética, donde hay pseudópodos en todas direcciones. Las células no estimuladas tienen pocos pseudópodos y éstos también se originan en cualquier punto de la circunferencia celular.

Los pseudópodos de las células quimiotácticas, tienen una base ancha, numerosas vesículas, haces de microfilamentos, microtúbulos, mitocondrias y otros organelos. El núcleo nunca penetra en los pseudópodos. En las células en quimiotaxis inhibida los pseudópodos son más delgados, de base estrecha, pero pueden penetrar más profundamente

en el filtro. Su citoplasma contiene microfilamentos y vesículas, pero los demás organelos están habitualmente ausentes con la notable excepción del núcleo, que ahora penetra profundamente en algún pseudópodo (80, 138).

Aunque todos estos rasgos estuvieron presentes, sólo se analizó estadísticamente el número de pseudópodos por célula. Los pseudópodos se definieron como cualquier proyección celular diferenciada y visiblemente continua que penetrase más de 0.5 μ m en el filtro. Los pseudópodos sin continuidad visible con la célula (por tener su origen fuera del plano de corte), fueron excluidos para no contar inadvertidamente pseudópodos de células vecinas.

Posición relativa del núcleo - (índice nuclear).

En la quimiotaxis se establece una asimetría en la célula, que sigue un eje paralelo al eje del gradiente quimiotáctico (y por consecuencia perpendicular al plano del filtro). Una manifestación de esta asimetría es la posición vertical del núcleo respecto a la altura celular ya que durante la quimiotaxis el núcleo toma una posición caudal, lejos de la fuente del estímulo. En la movilidad aleatoria o en la quimiotaxis inhibida, el núcleo tiene una posición medio celular, o aún frontal, e incluso, en el caso de la inhibición, puede penetrar en algún pseudópodo (80, 138).

Se calculó el índice $B/B+A$, donde A representó la distancia (en el eje perpendicular a la superficie del filtro), entre la parte más alta de la célula y la punta del lóbulo nuclear más alto, y B representó la distancia entre las porciones más inferiores del núcleo y de la célula. Esta distancia expresa la posición vertical del núcleo dentro de la célula. Los valores cercanos a 0 indican una posición cefálica o frontal y los valores cercanos a 1 indican una posición caudal o distal del núcleo respecto al filtro y la fuente del estímulo.

Alineación centriolar.

El centriolo, o en realidad, los dos centriolos, tienen una orientación variable en las células en reposo. En la quimiotaxis los centriolos toman una posición característica, juntos y frente al núcleo, ayudando a conformar el eje de polaridad de la célula, que incluye de adelante hacia atrás: los pseudópodos, los organelos, el centriolo, el núcleo y el urópodo. El aparato de Golgi se sitúa cerca del centriolo, y tiende a reflejar, aunque menos rigurosamente, la polaridad celular. Al inhibir la quimiotaxis estos organelos vuelven a tomar una posición aleatoria (80, 138).

Ya que ambos organelos están normalmente juntos y que en los cortes de microscopía electrónica es mucho más usual localizar al aparato de Golgi que al centriolo, se analizó la alineación del conjunto Golgi-centriolo para poder analizar un mayor número de células, y se evaluó el porcentaje de monocitos en que el conjunto Golgi-centriolar se encontró en la porción cefálica o céfalolateral del monocito.

Distribución relativa de los organelos - (índice de organelos).

Los leucocitos en quimiotaxis presentan una acumulación característica de organelos en el frente de la célula. En la quimiotaxis inhibida (y en la movilidad aleatoria), los organelos aparecen dispersos o agrupados en grado variable y en cualquier dirección respecto al filtro (80, 138).

La cuantificación se efectuó mediante un índice de organelos (A/T) contando el número de organelos que se encontraban en la mitad frontal de la célula (A), dividido entre el total de organelos visibles en toda la célula (T). Para mayor precisión se contaron los organelos grandes y moderadamente abundantes (mitocondrias, lisosomas y fagosomas).

Microtúbulos asociados al centriolo - (# MAC).

Alrededor del centriolo puede observarse un cierto número de microtúbulos. Durante la quimiotaxis ocurre un claro aumento en el número de MAC. Las drogas antitubulares como la colchicina y la vimblastina reducen su número. Se considera que las drogas antimicrofibrilares los dejan inafectados o pueden producir un incremento indirecto (80, 138). El efecto de la hidrocortisona sobre este rasgo se desconoce.

El centriolo fue localizado examinando secciones semi-seriadas de células adyacentes, el centriolo fue visible normalmente, sólo en una de cada 10 a 20 células así procesadas. Se cuantificaron los MAC en aquellas células en que el centriolo era visible en el corte y se contaron los microtúbulos presentes en un área circular de una micra de radio, con centro en el centriolo. Los microtúbulos se definieron como estructuras rectas de doble pared, de 25 nm de ancho y por lo menos 100 nm de largo, los microtúbulos cortados transversalmente no fueron contados para evitar confusiones con otras estructuras.

Microfilamentos.

Los microfilamentos se encuentran en todo el citoplasma, usualmente forman una fina red submembranosa, con concentraciones más densas donde la membrana se aproxima o toca el filtro (sitios de adhesión). Las drogas que impiden el ensamble de microfilamentos (como la cito-calasina B) disminuyen importantemente su número, mientras que las drogas antitubulínicas como la colchicina y la vimblastina causan un efecto mucho más débil e indirecto, sobre la distribución de los microfilamentos.

Los microfilamentos submembranosos se evaluaron contando el número de zonas hiperdensas de contacto en los sitios de adhesión presentes en una longitud de dos micras, en la zona de unión entre la célula y el filtro, y se calificaron en cruces (1 zona = 1+, 2-3 zonas = 2+, 4-5 zonas = 3+ y 6 ó más zonas = 4+).

Rasgos complementarios.

Además de la evaluación de los siete rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis previamente descritos, se analizaron otros dos rasgos; la penetración del núcleo al filtro y los filamentos intermedios. La penetración del núcleo en el pseudópodo, por debajo del nivel del filtro, ha sido señalada como un rasgo presente en la inhibición quimiotáctica (80, 138). Este rasgo se evaluó como el porcentaje de células en las que el núcleo llegó más abajo del borde superior del filtro, subdivididas en penetración marginal o profunda, según que el borde inferior del núcleo penetrase más o menos de 0.5 μ m bajo el filtro. Los filamentos intermedios se evaluaron en forma semicuantitativa en tres aspectos: Número (ausente, escaso, moderado y abundante), localización (central, marginal o difusa) y la forma de agrupamiento (filamentos solitarios, haces pequeños (menos de 8 filamentos) o racimos con numerosos y largos filamentos). La evaluación estadística de este rasgo se descartó por las mismas razones que en el caso de los microfilamentos (vide infra).

Análisis estadístico.

La evaluación estadística de los datos se efectuó mediante la prueba t de Student (26), método aplicable a los cinco rasgos cuyos resultados se expresaron en forma de variables continuas. (Índice de aplanamiento, número de pseudópodos, índice nuclear, índice de organelos y microtúbulos asociados al centriolo). En el caso de la alineación centriolar, cuyos resultados se expresaron como una variable discontinua (alineado o no alineado) se empleó la prueba de Xi cuadrada.

El análisis estadístico de los microfilamentos se descartó por el inevitable "ruido" introducido por las variaciones de tinción y grosor, de hasta 100 nm, causadas por el uso de un ultramicrotomo manual (132). Estas variaciones, que son menores al 1% en los demás rasgos, alcanzan una magnitud cercana al 15% en el caso de los microfilamentos, cuyo diámetro es de 5 nm. En cada rasgo se comparó sistemáticamente cada grupo experimental con todos los demás, pero no siempre las comparaciones entre grupos, pueden considerarse directamente como comparaciones entre variables experimentales (p. ej.: los grupos SAZ+SN y SAZ+MA difieren únicamente en los factores aportados por la amiba, en cambio la comparación entre los grupos SAZ+CIT y ST acumula el efecto de dos variables, la acción de la citocalasina B y la falta de actividad quimiotáctica del suero testigo).

Presentación de resultados.

Los resultados obtenidos para cada rasgo y grupo experimental se presentan en forma numérica (tabla 1), gráfica (gráficas 1 - 8) y como perfil (gráficas 9 - 11). La representación numérica permite conservar la precisión de las cantidades obtenidas, mientras que la gráfica permite apreciar la magnitud de las variaciones, en ambos casos los resultados se expresaron en una escala absoluta, especial para cada rasgo y son los datos utilizados para el análisis estadístico. Sin embargo tienen la desventaja de que no permiten agrupar y visualizar los resultados por grupos experimentales, ya que cada rasgo tiene su propia escala.

Esta limitación fue compensada con la presentación de los resultados, como un perfil porcentual de inhibición, o más propiamente como un "perfil de persistencia de la estimulación" para cada rasgo y grupo. Este perfil se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{persistencia} = \frac{\text{índice del inhibidor} - \text{índice de GEY-A}}{\text{índice del SAZ} - \text{índice de GEY-A}} \times 100$$

De esta forma en todos los rasgos, el valor del GEY-A corresponde a 0% y el del SAZ al 100%. Este método de representación permite expresar los resultados de todos los rasgos en una escala unificada, y permite visualizar los patrones de comportamiento de las células de cada grupo.

RESULTADOS.

SINTESES DE LOS DATOS.

Se presenta primero una síntesis de los datos globales producidos por el estudio, y después se describen en forma detallada, los resultados obtenidos para cada rasgo morfológico y los perfiles de cada grupo experimental, para terminar con una recapitulación de los resultados.

La tabla 1 contiene los valores de los índices (media + error estándar), obtenidos para cada uno de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis, en cada grupo experimental.

Las tablas 2 a 4 presentan las significancias de las comparaciones estadísticas entre los grupos, para cada rasgo particular. Hay que recordar que algunas comparaciones entre grupos no son directamente válidas como comparaciones entre variables (p. ej.: SAZ+HC vs MAS).

Las fotografías de microscopía electrónica (figuras 4 a 7), muestran ejemplos de los cambios morfológicos más importantes, especialmente de los cambios en los microtúbulos asociados al centriolo.

Tabla 1

HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES EN MONOCITOS EN QUIMIOTAXIS NORMAL O INHIBIDA

	GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC
Indice de aplanamiento	1.57* (0.09)	1.56 (0.07)	1.24 (0.06)	2.31 (0.28)	2.96 (0.22)	4.72 (0.54)	2.35 (0.28)	1.35 (0.16)	2.11 (0.19)	2.01 (0.13)	2.44 (0.25)
# pseudópodos/célula	1.05* (0.19)	2.43 (0.19)	1.91 (0.16)	1.66 (0.20)	2.65 (0.19)	3.08 (0.28)	1.55 (0.20)	1.59 (0.14)	1.76 (0.27)	2.22 (0.18)	1.89 (0.22)
Indice nuclear	0.63* (0.02)	0.60 (0.02)	0.54 (0.02)	0.63 (0.03)	0.69 (0.03)	0.75 (0.02)	0.63 (0.03)	0.73 (0.03)	0.60 (0.03)	0.67 (0.02)	0.70 (0.03)
Alineación centriolar	48.7%	47.1%	48.9%	54.3%	84.8%	78.1%	54.5%	75.0%	52.0%	53.7%	64.3%
Indice de organelos	0.63* (0.03)	0.60 (0.02)	0.59 (0.02)	0.63 (0.03)	0.73 (0.03)	0.70 (0.04)	0.62 (0.03)	0.72 (0.02)	0.60 (0.04)	0.62 (0.02)	0.62 (0.03)
Microtúbulos asociados al centriolo	11.76* (0.73)	14.98 (0.54)	20.92 (1.53)	11.23 (0.96)	15.00 (0.85)	15.15 (0.90)	22.59 (1.11)	20.91 (1.65)	8.09 (0.68)	10.77 (0.77)	12.50 (0.86)
Microfilamentos	++	+++	++	++	++++	+++	++	+	+++	++	++

* = media (+/- error estandar)
 GEY-A = medio de Gey-albúmina-veronal
 MAS = medio axénico sólo (sin SAZ)
 SNS = sobrenadante de E. histolytica (sin SAZ)
 ST = suero testigo (inactivado por calor)
 SAZ = suero activado por zimosán

SAZ+MA = SAZ y medio axénico
 SAZ+SN = SAZ y sobrenadante de cultivos de E. histolytica
 SAZ+CIT = SAZ y citocalasina B
 SAZ+COL = SAZ y colchicina
 SAZ+VIM = SAZ y vimblastina
 SAZ+HC = SAZ y succinato de hidrocortisona

Tabla 2. COMPARACIONES ESTADISTICAS INTERGRUPALES POR RASGOS.
 SAZ+SN vs SAZ+MA en el recuadro, NS = no significativo ($p < 0.05$)
 2a. Índice de aplanamiento.
 2b. Número de pseudopodos por célula.

INDICE DE APLANAMIENTO (t de Student)											
GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC	
	NS	<0.005	<0.01	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.005	<0.01	<0.001	GEY-A
GEY-A		<0.005	<0.005	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.005	<0.005	<0.001	MAS
MAS	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	SNS
SNS	<0.001	<0.025		<0.05	<0.001	NS	<0.001	NS	NS	NS	ST
ST	<0.025	<0.005	NS		<0.005	<0.05	<0.001	<0.005	<0.001	NS	SAZ
SAZ	<0.001	NS	<0.005	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	SAZ+MA
SAZ+MA	<0.001	<0.025	<0.001	<0.001	NS		<0.001	NS	NS	NS	SAZ+SN
SAZ+SN	<0.05	<0.005	NS	NS	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	SAZ+CIT
SAZ+CIT	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.001	<0.001	NS		NS	NS	SAZ+COL
SAZ+COL	<0.025	<0.025	NS	NS	<0.005	<0.001	NS	NS		NS	SAZ+VIM
SAZ+VIM	<0.001	NS	NS	<0.025	NS	<0.01	<0.01	<0.005	NS		SAZ+HC
SAZ+HC	<0.001	<0.05	NS	NS	<0.01	<0.001	NS	<0.01	NS	NS	
	GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC
NUMERO DE PSEUDOPODOS POR CELULA (t de Student)											

Tabla 3. COMPARACIONES ESTADISTICAS INTERGRUPALES POR RASGOS.

3a. Índice nuclear.

3b. Alineación centriolar.

INDICE NUCLEAR (t de Student)												
GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC		
		NS	<0.005	NS	<0.05	<0.001	NS	<0.001	NS	NS	<0.05	GEY-A
GEY-A		<0.05	NS	<0.005	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.01	<0.01		MAS
MAS	NS		<0.01	<0.001	<0.001	<0.025	<0.001	<0.05	<0.005	<0.001		SNS
SNS	NS	NS		<0.05	<0.005	NS	<0.025	NS	NS	NS		ST
ST	NS	NS	NS		NS	NS	NS	<0.025	NS	NS		SAZ
SAZ	<0.001	<0.001	<0.001	<0.005		<0.005	NS	<0.001	<0.005	NS		SAZ+MA
SAZ+MA	<0.025	<0.01	<0.01	<0.05	NS		<0.025	NS	NS	NS		SAZ+SN
SAZ+SN	NS	NS	NS	NS	<0.005	<0.05		<0.005	<0.05	NS		SAZ+CIT
SAZ+CIT	<0.05	<0.025	<0.05	NS	NS	NS	NS		<0.05	<0.025		SAZ+COL
SAZ+COL	NS	NS	NS	NS	<0.005	<0.05	NS	NS		NS		SAZ+VIM
SAZ+VIM	NS	NS	NS	NS	<0.005	<0.05	NS	NS	NS			SAZ+HC
SAZ+HC	NS	NS	NS	NS	<0.05	NS	NS	NS	NS	NS		
	GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC	
ALINEACION CENTRIOLAR (X ² cuadrada)												

Tabla 4. COMPARACIONES ESTADISTICAS INTERGRUPALES POR RASGOS.

4a. Indice de organelos.

4b. Microtubulos asociados al centriolo.

INDICE DE ORGANELOS (t de Student)											
GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC	
	NS	NS	NS	<0.025	NS	NS	<0.025	NS	NS	NS	GEY-A
GEY-A		NS	NS	<0.001	<0.01	NS	<0.001	NS	NS	NS	MAS
MAS	<0.001		NS	<0.001	<0.005	NS	<0.001	NS	NS	NS	SNS
SNS	<0.001	<0.001		<0.001	NS	NS	<0.025	NS	NS	NS	ST
ST	NS	<0.001	<0.001		NS	<0.01	NS	<0.01	<0.005	<0.01	SAZ
SAZ	<0.005	NS	<0.001	<0.005		<0.05	NS	<0.05	<0.05	<0.05	SAZ+MA
SAZ+MA	<0.005	NS	<0.005	<0.005	NS		<0.01	NS	NS	NS	SAZ+SN
SAZ+SN	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001		<0.01	<0.005	<0.01	SAZ+CIT
SAZ+CIT	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	NS		NS	NS	SAZ+COL
SAZ+COL	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		NS	SAZ+VIM
SAZ+VIM	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.025		SAZ+HC
SAZ+HC	NS	<0.01	<0.001	NS	<0.025	<0.025	<0.001	<0.001	<0.001	NS	
	GEY-A	MAS	SNS	ST	SAZ	SAZ+MA	SAZ+SN	SAZ+CIT	SAZ+COL	SAZ+VIM	SAZ+HC
MICROTUBULOS ASOCIADOS AL CENTRIOLO (t de Student)											

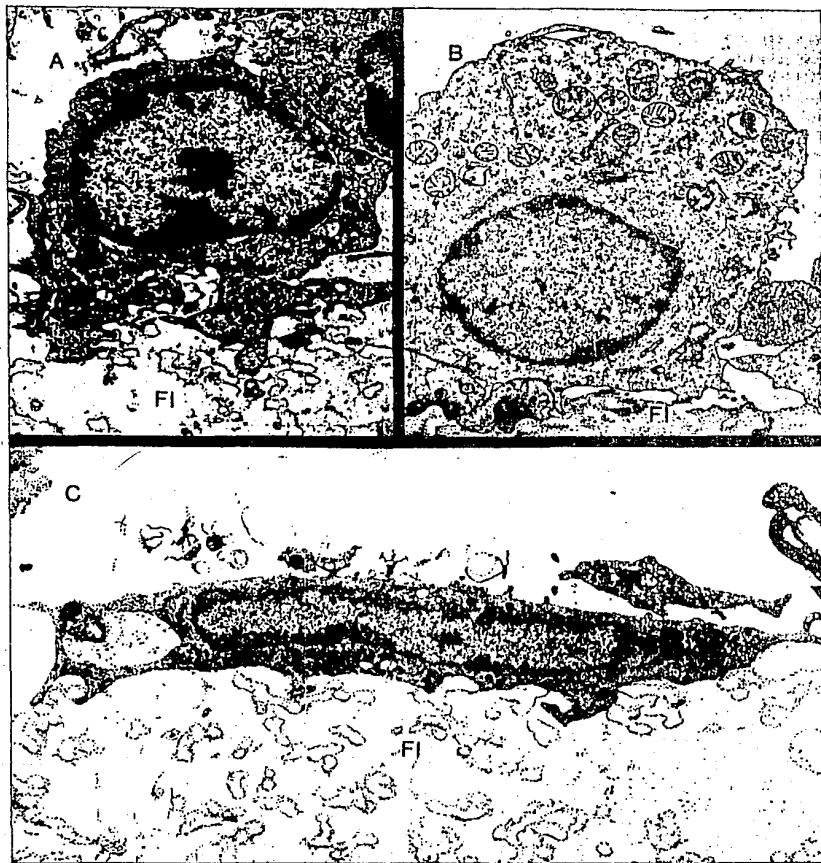


Fig. 4: Monocitos sobre la superficie de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ (FI), a $10\ 000\times$. A: SAZ, monocito en quimiotaxis y con los rasgos morfológicos característicos. B: SAZ+SN, monocito inhibido y que ha perdido la morfología asociada a la quimiotaxis. C: SAZ+MA, en este grupo el aplanamiento celular es máximo.

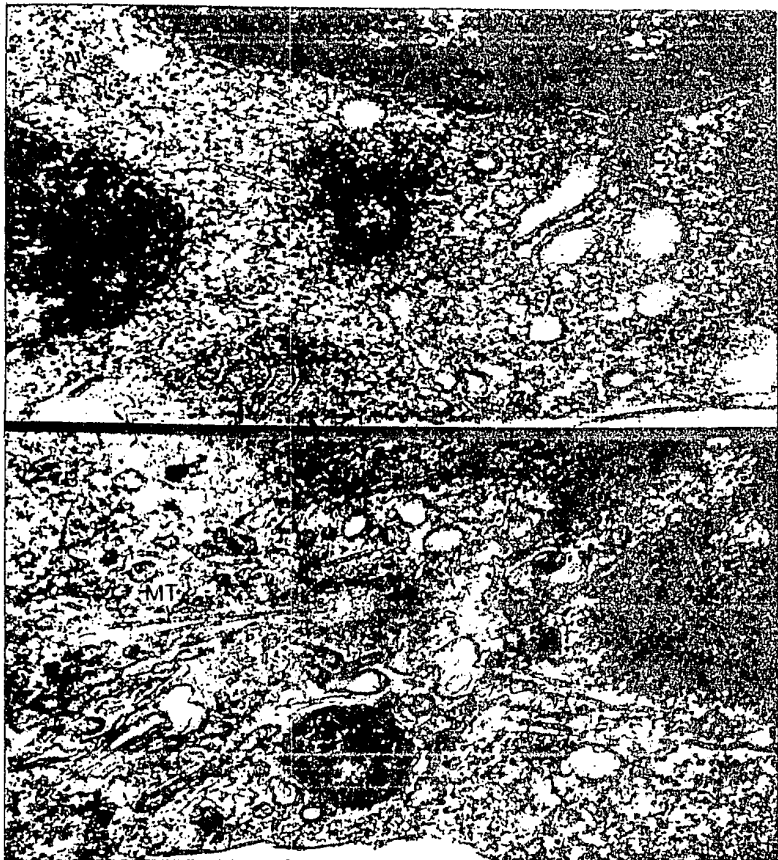


Fig. 5: Centriolo y área pericentriolar a 74 000x. A=GEY-A, B=SAZ. En monocitos no estimulados quimiotácticamente, los microtúbulos pericentriolares (MT), son poco numerosos (4 en A y $\bar{x}=11.76$), pero aumentan bajo el estímulo quimiotáctico (16 en B y $\bar{x}=15.0$).

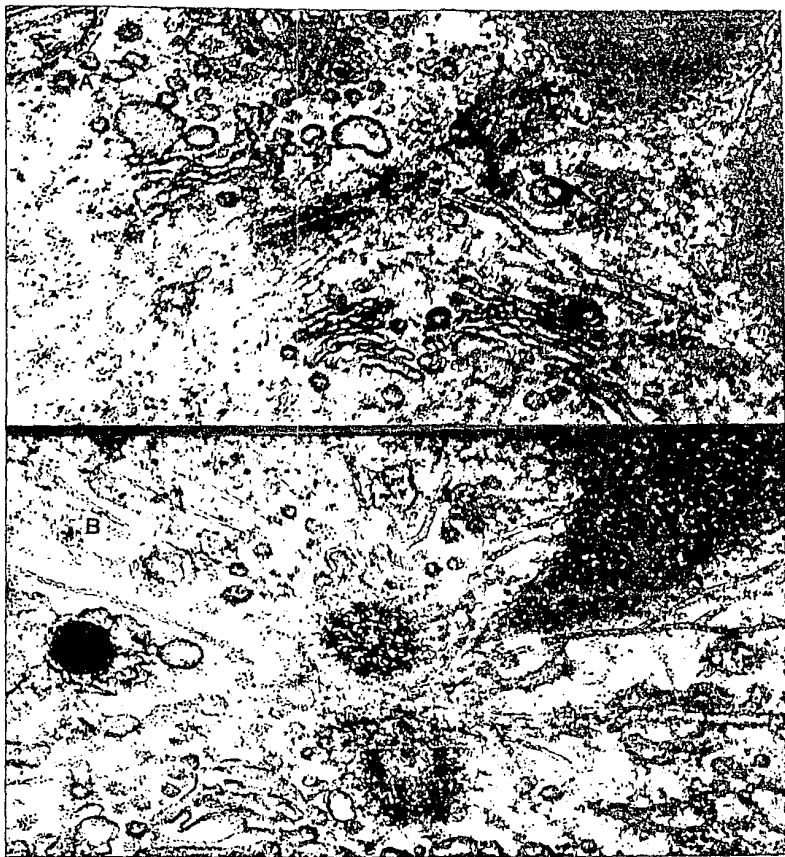


Fig. 6: Centriolo y área pericentriolar a 74 000x. A=MAS, B=SNS. El medio axénico induce un aumento microtubular semejante al del SAZ, (\bar{x} =14.98), pero el sobrenadante induce un aumento aún mayor (\bar{x} =20.92 y 19 en B).

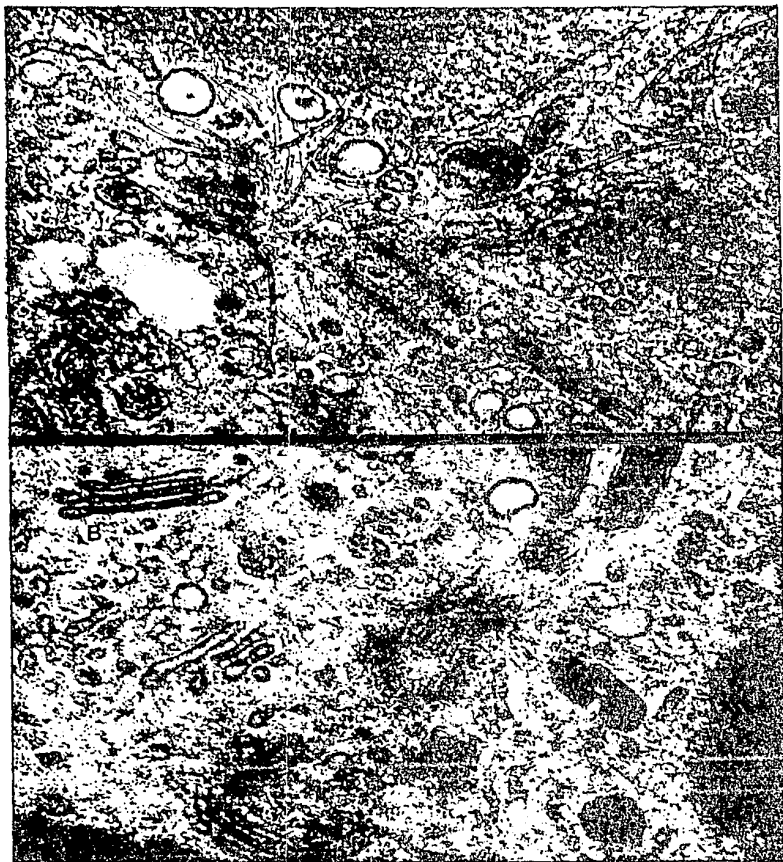


Fig. 7: Centriolo y área pericentriolar a 74 000x. A=SAZ+SN, B=SAZ+VIM. Al coincubar los monocitos con SAZ y sobrenadante de amiba, el efecto de éste domina y el índice microtubular se mantiene muy alto ($x=22.59$ y 22 en A). Este efecto es contrario al de vimblastina (B) y colchicina que reducen los microtúbulos.

RESULTADOS POR RASGOS ULTRAESTRUCTURALES.

INDICE DE APLANAMIENTO.

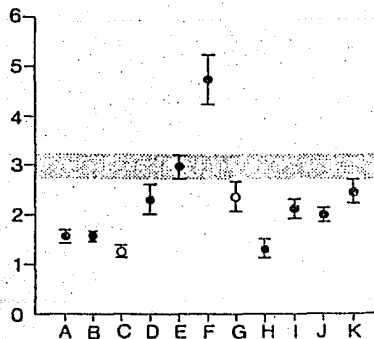
Este es un rasgo indicador de la movilidad celular y los resultados aparecen en las tablas 1 y 2a, y en la gráfica 1. En reposo (GEY-A), las células adosadas al filtro fueron ligeramente más anchas que altas (índice de aplanamiento = 1.57). La adición de medio axénico (MAS), no alteró este rasgo (índice = 1.56), mientras que el sobrenadante solo (SNS) lo redujo significativamente (índice de 1.24 y $p < 0.005$) al compararlo con los grupos previos. La adición de suero activado con zimosán (SAZ) hizo que las células se aplanaran (índice = 2.96) significativamente ($p < 0.001$ vs GEY-A). El suero testigo (ST) indujo un aplanamiento de intensidad intermedia. La adición de medio axénico al SAZ (grupo SAZ+MA) produjo un efecto sinérgico (fig. 4C), el índice ascendió a 4.7 y superó significativamente a todos los demás grupos ($p < 0.005$).

La adición de sobrenadante al SAZ (grupo SAZ+SN) produjo una disminución en el aplanamiento, moderada, aunque significativa ($p < 0.05$ vs SAZ), más marcada al compararla con su control adecuado, que es el grupo SAZ+MA ($p < 0.001$).

La citocalasina B (SAZ+CIT) provocó una pérdida del aplanamiento, e incluso una tendencia a la redondez. La colchicina (SAZ+COL) y la vimblastina (SAZ+VIM) produjeron una disminución moderada y significativa ($p < 0.005$ vs SAZ). La hidrocortisona (SAZ+HC) causó una reducción (37%) que no fué significativa.

Gráfica 1.
APLANAMIENTO CELULAR
Índice = ancho / alto
Valores: Media \pm error estándar.

Grupos experimentales:
A = GEY-A G = SAZ+SN
B = MAS H = SAZ+CIT
C = SNS I = SAZ+COL
D = ST J = SAZ+VIM
E = SAZ K = SAZ+HC
F = SAZ+MA



NUMERO DE PSEUDOPODOS POR CELULA.

Los resultados aparecen en la gráfica 2 y las tablas 1 y 2b. En condiciones de reposo (GEY-A) algunas de las células adosadas al filtro emitieron esporádicamente algún pseudópodo hacia el interior del filtro. El medio axénico (MAS) indujo un incremento significativo de este rasgo, mientras que el sobrenadante (SNS) indujo un incremento mucho más débil y significativamente inferior al del MAS ($p < 0.025$).

La adición de SAZ produjo un incremento significativo en la emisión de pseudópodos ($p < 0.001$ vs GEY-A, y media de 2.7) mientras que el ST produjo un incremento inferior al 50% y que difirió significativamente de el del SAZ ($p < 0.001$ vs SAZ).

La adición del medio axénico al SAZ también potenció sus efectos sobre este rasgo, y elevó el índice a 3.1.

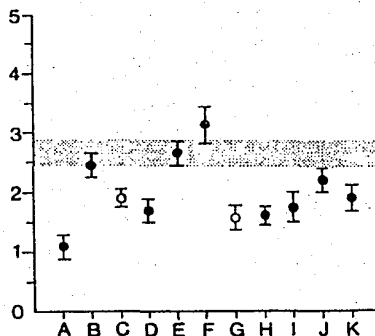
El SAZ+SN redujo significativamente la emisión de pseudópodos ($p < 0.001$ vs SAZ+MA y vs SAZ).

La citocalasina B, la colchicina y la hidrocortisona produjeron también reducciones significativas en la emisión de pseudópodos, mientras que la vimblastina provocó una reducción débil (25%) que no alcanzó a ser significativa.

INDICE NUCLEAR.

Este, y los dos siguientes rasgos, indican primariamente la capacidad de orientación de las células en quimiotaxis (gráfica 3 y tablas 1 y 3a). En el grupo GEY-A, el núcleo se encontró central o ligeramente caudal (media = 0.63). La posición nuclear no se alteró al agregar medio axénico ($\bar{x} = 0.60$ para MAS), pero ocurrió una disminución significativa en presencia del sobrenadante ($\bar{x} = 0.54$ y $p < 0.05$ entre SNS y MAS).

Gráfica 2.
EMISION DE PSEUDOPODOS
Número de pseudópodos que
penetran más de 0.5 μ m en
el filtro.



La adición de SAZ (fig. 4A), elevó el índice significativamente ($p < 0.005$ vs GEY-A), lo que no ocurrió al agregar el suero testigo. La asociación de SAZ y medio axénico, de nuevo produjo un incremento respecto al SAZ, del que sin embargo, no difirió en forma significativa.

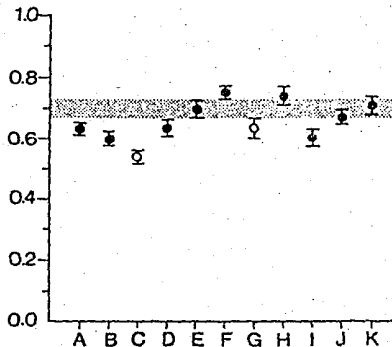
La adición del sobrenadante al SAZ redujo significativamente el desplazamiento caudal del núcleo ($p < 0.005$ vs SAZ+MA) (fig. 4B). Los demás inhibidores ejercieron un efecto variable sobre este rasgo. La citocalasina B, que no inhibe la capacidad de orientación del monocito, permitió que el índice nuclear conservara valores equivalentes a los del grupo con SAZ. La colchicina y la vimblastina indujeron una tendencia a la reducción de este rasgo, que fué significativa sólo en el grupo con colchicina. La hidrocortisona no inhibió este rasgo ($\bar{x} = 0.70$ vs 0.69 del SAZ).

ALINEACION CENTRIOLAR.

Los resultados de este rasgo, aparecen en la gráfica 4 y en las tablas 1 y 3b. En el grupo de GEY-A, la mitad de las células (48.6%) presentaron al centriolo y/o al aparato de Golgi en posición cefálica o cefalolateral, situados entre el núcleo y el filtro. La adición de medio axénico o sobrenadante solos, no afectó este rasgo (MAS = 47.0%, SNS 48.9%).

En cambio, la adición del SAZ hizo que el centriolo quedara alineado cefálicamente en el 84.8% de las células, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$ con Xi cuadrada). El ST no indujo este cambio (54.2%).

Gráfica 3.
INDICE NUCLEAR
Desplazamiento del núcleo
sobre el eje del gradiente.



La alineación centriolar fué algo menor en el grupo SAZ+MA (78.1%) que en el de SAZ (84.8%), pero aún así estuvo significativamente elevada ($p < 0.025$ vs GEY-A).

Con el SAZ+SN, este rasgo quedó significativamente inhibido ($p < 0.005$ vs SAZ).

La citocalasina B, no lo inhibió, pues aunque el porcentaje (75%) fué menor que el del SAZ (84.8%), ambos grupos no alcanzaron a diferir estadísticamente. En contraste, los otros tres inhibidores, la colchicina, la vimblastina y la hidrocortisona, lo inhibieron significativamente, si bien la hidrocortisona lo hizo en forma bastante más débil ($p < 0.005$, $p < 0.005$ y $p < 0.05$ respectivamente).

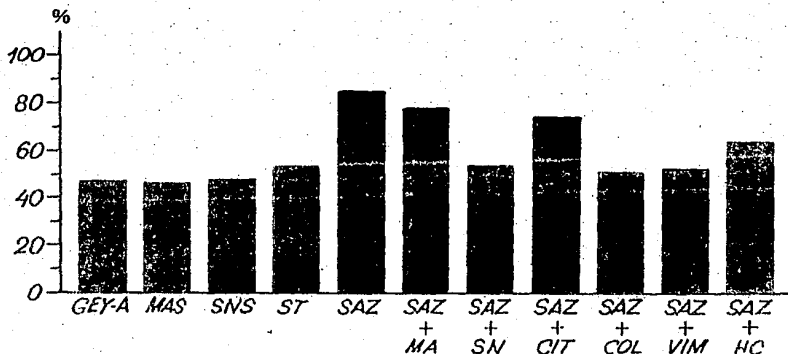
INDICE DE ORGANELOS.

Los resultados aparecen en la gráfica 5 y en las tablas 1 y 4a. En los monocitos no estimulados del grupo GEY-A los organelos se encontraron dispersos y con un ligero predominio en la mitad frontal de la célula, (índ. = 0.63). Esta distribución permaneció inalterada en presencia de medio axénico o de sobrenadante solos (MAS = 0.60 y SNS = 0.59).

El SAZ (fig. 4A) produjo una concentración significativa de los organelos en la porción frontal de la célula (índ. = 0.73 y $p < 0.025$ vs GEY-A).

El ST no causó este efecto, y su índice es igual al del GEY-A.

La combinación de SAZ y medio axénico no difirió estadísticamente del SAZ.



Gráfica 4. ALINEACION CENTRIOLAR.

Porcentaje de células en las que el centriolo y/o el aparato de Golgi se localizan en las regiones cefálica o cefalo-lateral de la célula.

La adición de sobrenadante al SAZ (fig. 4B) redujo significativamente este rasgo hasta niveles equivalentes a los que se encontraron con GEY-A ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ vs SAZ+MA y SAZ respectivamente). En concordancia con lo observado con los otros rasgos de orientación, este índice no fue afectado por la citocalasina B, mientras que sí fue significativamente inhibido por la colchicina, la vimblastina y la hidrocortisona.

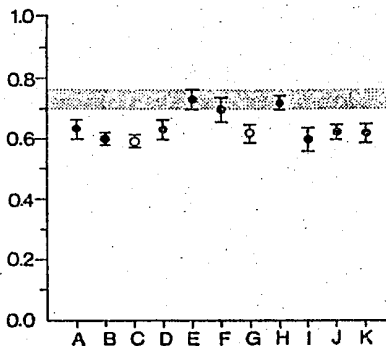
MICROTUBULOS ASOCIADOS AL CENTRIOLO.

Los microtúbulos son elementos del citoesqueleto que desempeñan varias funciones, entre ellas el mantenimiento de la forma y la polaridad de las células en quimiotaxis (138).

La evaluación de este rasgo dió un promedio basal de 11.8 microtúbulos pericentriolares por célula en el grupo de GEY-A (gráfica 6, tablas 1, 4b y fig. 5A). La adición de SAZ (fig. 5B), elevó significativamente el promedio a 15.15 ($p < 0.005$ vs GEY-A), mientras que el ST no aumentó el número de MAC (11.2). La adición de medio axénico solo (MAS) (fig. 6A) o con SAZ (grupo SAZ+MA) produjo un incremento en los MAC al nivel del SAZ ($\bar{x} = 15.0$ y 15.2 respectivamente) sin diferir estadísticamente del SAZ y elevado respecto al GEY-A ($p < 0.001$ y $p < 0.005$ respectivamente).

La adición del sobrenadante en ausencia (SNS) (fig. 6B) o presencia de SAZ (SAZ+SN) (fig. 7A) provocó un notable incremento en los MAC ($\bar{x} = 20.9$ y 22.6 respectivamente) que difirió significativamente de los valores obtenidos para los grupos testigo respectivos ($p < 0.001$ para SNS vs MAS y para SAZ+SN vs SAZ+MA) y que exceden significativamente a los valores del SAZ.

Gráfica 5.
INDICE DE ORGANELOS
Concentración de los organelos
en la porción frontal de la célula.



La citocalasina B, a semejanza del sobrenadante, elevó significativamente el número de MAC (\bar{x} = 20.9 y $p < 0.001$ vs SAZ). La colchicina y la vimblastina (fig. 7B) produjeron la "clásica" disminución en los MAC (\bar{x} = 8.1 y 10.8, $p < 0.001$ vs SAZ en ambos casos). La hidrocortisona también produjo un descenso significativo en los MAC, aunque de menor intensidad (\bar{x} = 12.55 y $p < 0.025$ vs SAZ).

MICROFILAMENTOS.

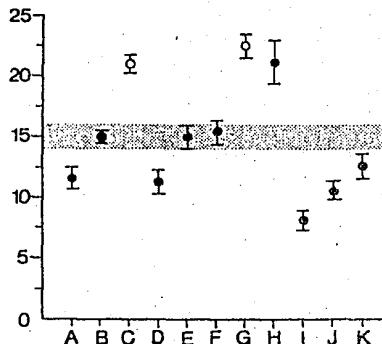
Los microfilamentos son los componentes del citoesqueleto que más directamente se relacionan con la movilidad integral y citoplásmica de las células. Aunque los datos obtenidos para este rasgo eran susceptibles a un análisis estadístico, desde el punto de vista matemático, por las razones indicadas en la metodología se consideró más prudente expresarlos sólo en forma semicuantitativa (tabla 1).

Las células con GEY-A presentaron típicamente dos o tres acúmulos densos de microfibrillas a lo largo de 2 micras de la superficie de contacto célula-filtro por lo que se calificaron como 2+. La adición de medio axénico aumentó las zonas de contacto a 4-5 (3+), mientras que con el sobrenadante los acúmulos de microfibrillas se redujeron a 2+. El SAZ produjo un marcado aumento en el número de zonas densas a 4+ mientras que con el ST se mantuvieron en 2+. En el grupo SAZ+MA hubo un aumento a 3+.

Con el SAZ+SN hubo un descenso moderado (2+).

La citocalasina B produjo una reducción muy intensa en este rasgo (1+ vs 4+ del SAZ y 2+ del GEY-A), en contraste, la colchicina produjo una alteración leve (3+ vs 4+ del SAZ). La vimblastina y la hidrocortisona causaron reducciones moderadas (2+).

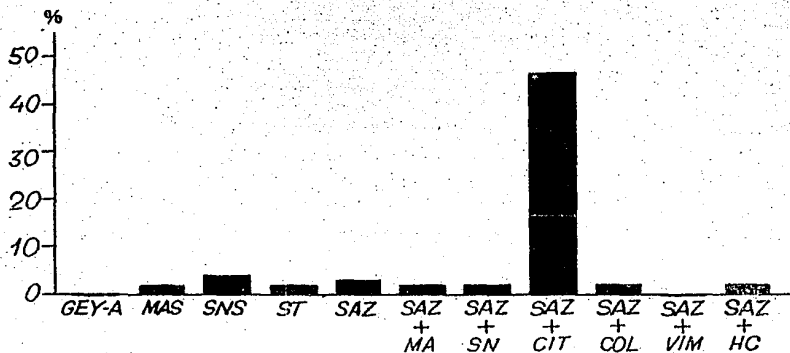
Gráfica 6.
MICROTUBÚLOS ASOCIADOS AL
CENTRIOLO
Número de microtúbulos en un
área de 1 μ m de radio alrededor
del centriolo.



RASGOS COMPLEMENTARIOS.

Penetración del núcleo al filtro.

Los resultados de este estudio (gráfica 7), señalan que la penetración del núcleo al filtro fue un fenómeno esporádico, presente en menos del 4% de las células de cada grupo y en esos casos, la penetración fue marginal. La adición de citocalasina B produjo un cambio radicalmente distinto en este rasgo, pues 34 de las 72 células estudiadas (47.2%) presentaron penetración nuclear, y en 28 de las 34 (38.9% del total), la penetración fue profunda. Estos datos sugieren que la penetración del núcleo al filtro sea un rasgo de la inhibición de la quimiotaxis por citocalasina B, y no un rasgo "universal" de la inhibición quimiotáctica.



Gráfica 7. PENETRACION DEL NUCLEO AL FILTRO,
Porcentaje de células cuyo núcleo penetra parcialmente por debajo
del nivel del borde superior del filtro.

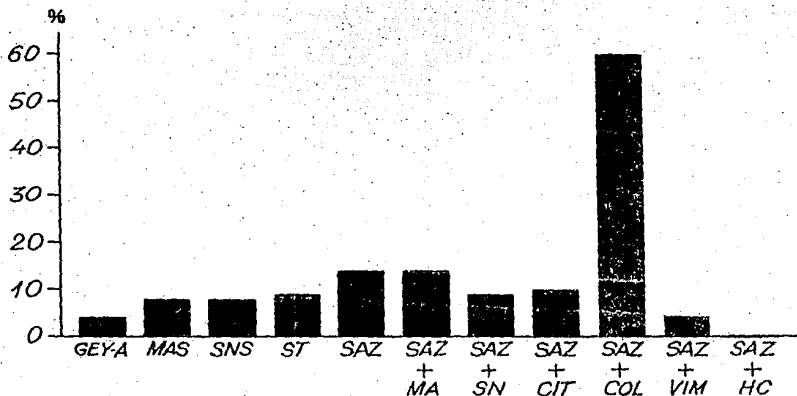
Filamentos intermedios.

Los filamentos intermedios aparentemente varían en forma paralela a la de los microtúbulos (80, 117).

En este estudio se observó que los filamentos intermedios de las células en reposo del grupo GEY-A, tuvieron una distribución predominantemente centro-celular y al agregar SAZ aumentaron de número, y predominaron en el margen del monocito. El ST provocó los mismos cambios que el SAZ, lo que indica que el cambio se originó por algún factor del suero no relacionado con la quimiotaxis.

Todos los inhibidores estudiados, excepto la hidrocortisona, indujeron una distribución difusa de los filamentos intermedios.

Sin embargo, el grupo con SAZ+COL, se separó de los demás grupos, ya que en él apareció un gran porcentaje de células (60%) con filamentos agrupados en grandes racimos, mientras que en los demás grupos los filamentos fueron predominantemente solitarios (gráfica 8).



Gráfica 8. FILAMENTOS INTERMEDIOS.

Porcentaje de células con grandes haces de filamentos intermedios.

RESUMEN DE RESULTADOS POR GRUPO EXPERIMENTAL.

MEDIO DE GEY-ALBUMINA (grupo GEY-A).

Los monocitos adheridos al filtro, en este grupo, estuvieron ligeramente aplanados, tuvieron ocasionalmente algún pseudópodo. El núcleo estuvo cercano al centro de la célula, el centriolo tomó una posición variable y los organelos estuvieron dispersos, o agrupados en cualquier dirección. Los microtúbulos y los microfilamentos se encontraron en una condición "basal".

MEDIO AXENICO (grupo MAS).

Los resultados de este grupo experimental mostraron que el medio axénico incrementó algunos de los rasgos, especialmente el número de pseudópodos por célula, y el número de microtúbulos asociados al centriolo ($p < 0.001$ vs GEY-A en ambos casos) (fig. 6A). Los otros rasgos permanecieron en valores no superiores a los del GEY-A.

SOBRENADANTE DE E. HISTOLYTICA (grupo SNS).

El sobrenadante produjo una disminución en el número de pseudópodos al compararlo con su grupo testigo (MAS), que alcanzó significación estadística ($p < 0.025$). Los índices de aplanamiento y nuclear se redujeron significativamente, en relación, tanto con MAS, como con GEY-a. En contrapartida el sobrenadante produjo un notable incremento en el número de microtúbulos asociados al centriolo (fig. 6B), con un promedio de 20.9/cél., significativamente superior en relación al MAS ($p < 0.001$), al GEY-A, e incluso al SAZ (tablas 1 a 4).

SUERO ACTIVADO POR ZIMOSAN (grupo SAZ).

En este grupo se produjo un incremento en todos los rasgos observados, las células se aplanaron contra el filtro hasta que su ancho fue casi tres veces mayor que su alto, el número de pseudópodos pasó de 1.1 a 2.7, el núcleo se desplazó hacia la porción caudal de la célula, el centriolo se alineó en la región cefálica del monocito y el resto de los organelos tendieron a concentrarse hacia el polo frontal, detrás de los pseudópodos. Todos estos rasgos se incrementaron significativamente respecto al GEY-A, ($p < 0.05$ o menor (tablas 1 a 4)). El número de microtúbulos asociados al centriolo también aumentó significativamente ($p < 0.005$) (fig. 5B), y los microfilamentos pasaron de 2+ a 4+.

SUERO TESTIGO (grupo ST).

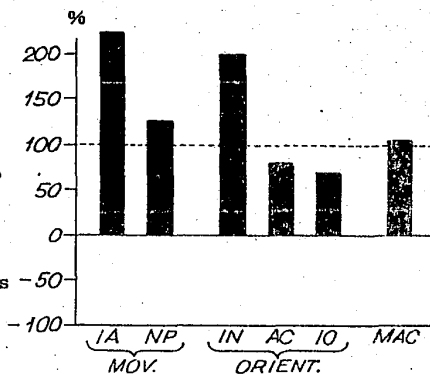
En este grupo se encontró un aumento en los rasgos indicadores de la movilidad (aplanamiento y pseudópodos). Los aumentos fueron de una magnitud intermedia entre el GEY-A y el SAZ (gráfica 11A), y difirieron estadísticamente de ambos grupos ($p < 0.05$, tablas 1 y 2). Los demás rasgos permanecieron inalterados, a nivel del GEY-A, y significativamente por debajo de los valores del SAZ ($p < 0.05$, tablas 1, 3 y 4).

MEDIO AXENICO CON SAZ (grupo SAZ+MA).

Como se observa en la gráfica 9 y en las tablas 1 a 4, en este grupo ocurrió un aumento en todos los rasgos analizados. Los microfilamentos aumentaron de 2+ a 3+. Los demás indicadores se elevaron significativamente respecto al GEY-A ($p < 0.025$), excepto el índice de organelos. Al comparar SAZ+MA con SAZ se observa que la adición del medio axénico al SAZ produjo un efecto aditivo, manifiesto especialmente en los índices de aplanamiento y nuclear, cuyos valores son mayores con SAZ+MA, que con SAZ o con medio axénico por separado. Hubo casos extremos en que algún monocito fue casi diez veces más ancho que alto. (La célula de la figura 4C tiene un índice de aplanamiento de 7.25).

Gráfica 9. MEDIO AXENICO
Perfil de acción del SAZ+MA
(GEY-A = 0%, SAZ = 100%)

- IA = Índice de aplanamiento
- NP = Núm. de pseudópodos
- IN = Índice nuclear
- AC = Alineación centriolar
- IO = Índice de organelos
- MAC = Microtúbulos asociados al centriolo

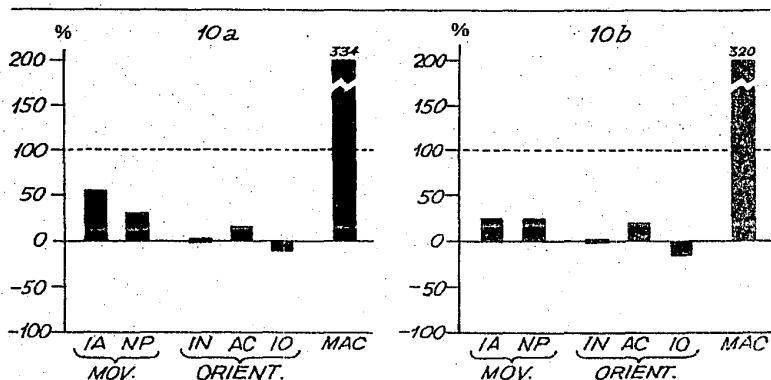


SOBRENADANTE DE AMIBA CON SAZ (grupo SAZ+SN).

Este es el grupo experimental principal del estudio y en él ocurrió una disminución significativa de todos los rasgos estudiados (fig. 4B), excepto en el número de microtúbulos asociados al centriolo (fig. 7A) donde apareció una importante elevación, como se ve en la gráfica 10. En los parámetros indicadores de movilidad la adición del sobrenadante al SAZ provocó reducciones significativas del aplanamiento y de la emisión de pseudópodos ($p < 0.001$ vs SAZ+MA).

El sobrenadante también inhibió los rasgos indicadores de orientación, ya que los índices nuclear, de alineación centriolar y de organelos se redujeron a valores significativamente inferiores a los del SAZ+MA ($p < 0.05$ o menor).

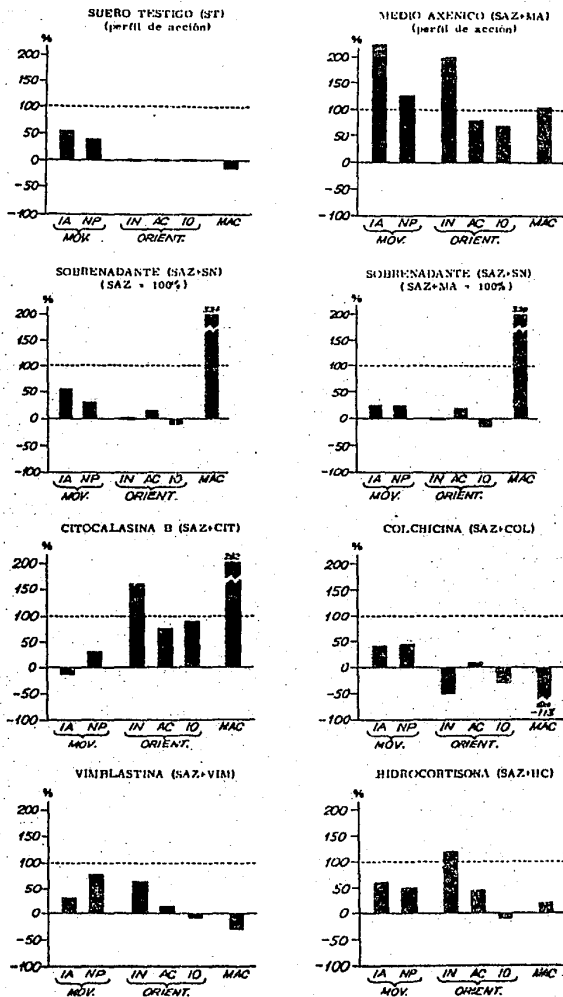
El hallazgo más llamativo fue que con el SAZ+SN ocurrió, un notable incremento en el número de MAC. El promedio ascendió desde los 15 del SAZ y SAZ+MA hasta 22.6 y difirió significativamente de esos grupos, y de los demás, excepto el de citocalasina B (SAZ+CIT), y el del sobrenadante solo (SNS), donde ya se encontró presente el aumento en los MAC. Los microfilamentos, presentaron sólo una ligera reducción al compararlos con su testigo (SAZ+MA) (2+ vs 3+), aunque la inhibición sería más intensa si los comparásemos con el SAZ (4+).



Gráfica 10. SOBRENADANTE DE Entamoeba histolytica.

Perfil inhibitorio del SAZ+SN, expresado como porcentaje de persistencia de cada rasgo, al comparar con SAZ = 100% (gráf. 10a) o con SAZ+MA = 100% (gráf. 10b), GEY-A = 0% en ambos casos.

Gráfica 11. PERFILES DE INHIBICIÓN DE LA MORFOLOGIA QUIMIOTACTICA
 Valores porcentuales en escala relativa común
 (GEY-A = 0% y SAZ = 100% para cada rasgo morfológico).



CITOCALASINA B (grupo SAZ+CIT).

Como se puede apreciar en la gráfica 11 y en las tablas 1 a 4, la citocalasina B produjo una inhibición prácticamente total de los rasgos relacionados con la movilidad. El aplanamiento revirtió en un redondeamiento y la emisión de pseudópodos también se redujo significativamente ($p < 0.001$ vs SAZ en ambos casos).

En cambio los rasgos de orientación (índice nuclear, alineación centriolar e índice de organelos) continuaron presentes, y no difirieron estadísticamente del SAZ.

Respecto a los indicadores del citoesqueleto, la citocalasina B produjo un incremento en el número de MAC ($\bar{x} = 20.9$) significativamente por encima del causado por el SAZ ($p < 0.001$).

Por otra parte, la citocalasina B causó una profunda alteración en los microfilamentos, disminuyó las zonas densas en la unión filtro-célula de 4+ del SAZ a 1+, pero además, su efecto se manifestó también como ruptura del halo submembranal de microfilamentos, y como pérdida de la homogeneidad citoplásmica de los pseudópodos. Ninguno de los otros inhibidores produjo alteraciones del sistema microfibrilar de tal magnitud.

Más aún, en aproximadamente la mitad de las células inhibidas por la citocalasina B, el núcleo se deslizó parcial, pero profundamente, dentro de algún pseudópodo. Este fenómeno, no se observó con ninguno de los demás inhibidores estudiados.

COLCHICINA (grupo SAZ+COL).

Este es el grupo con la inhibición más característica, como se ve en el perfil de la gráfica 11 y en las tablas 1 a 4, pues inhibió todos los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis analizados.

Inhibió moderada (50%), pero significativamente ($p < 0.005$) los dos rasgos de movilidad. Inhibió profunda y significativamente los rasgos indicadores de orientación ($p < 0.025$ para el índice nuclear, $p < 0.001$ la alineación centriolar y $p < 0.01$ el índice de organelos) al compararlos con SAZ.

También el número de microtúbulos se redujo intensa y significativamente ($\bar{x} = 8.1$ y $p < 0.001$ vs SAZ), mientras que los microfilamentos se redujeron en forma relativamente débil (3+ vs 4+ del SAZ).

Cabe señalar que en las células inhibidas por colchicina los filamentos intermedios aparecieron con cierta frecuencia organizados en grandes racimos, largos y con muchos filamentos. Este hallazgo no apareció en ninguno de los demás grupos.

VIMBLASTINA (grupo SAZ+VIM).

Como se observa en el perfil de la gráfica 11 y las tablas 1 a 4, la vimblastina redujo los rasgos de la movilidad, el aplanamiento moderado y significativamente ($p < 0.001$ vs SAZ) y el número de pseudópodos débilmente y sin alcanzar significación estadística.

Respecto a los indicadores de orientación ocurrió una respuesta divergente, mientras el índice nuclear se redujo débilmente (~33%), sin diferir significativamente del SAZ, la alineación centriolar y el índice de organelos se inhibieron intensa y significativamente ($p < 0.005$ vs SAZ). Los indicadores del citoesqueleto también se redujeron, los microtúbulos se inhibieron intensa y significativamente ($p < 0.001$) (foto 4B) y los microfilamentos se redujeron de 4+ a 2+.

No se encontraron los grandes racimos de filamentos intermedios vistos con colchicina, y aunque se buscaron, no se encontraron los cristaloideos de polímeros de tubulina y vimblastina que habían sido observados en presencia de altas concentraciones de esta droga (137, 138).

HIDROCORTISONA (grupo SAZ+HC).

Hasta donde sabemos, la morfología ultraestructural de los monocitos humanos en quimiotaxis inhibida por hidrocortisona, no ha sido previamente caracterizada, pero debido a que actúa cortando la respuesta quimiotáctica en una etapa membranal muy temprana, era de esperarse que inhibiera toda la respuesta, tanto los componentes de movilidad como los de orientación.

Los resultados que aparecen en el perfil de la gráfica 11, además de en las tablas 1 a 4, muestran que, con una sola excepción, la hidrocortisona redujo los rasgos morfológicos estudiados.

Redujo a cerca del 50% los rasgos indicadores de la movilidad, aunque sólo la disminución en el número de pseudópodos alcanzó significación estadística ($p < 0.01$ vs SAZ).

En este grupo también apareció una divergencia entre los indicadores de orientación, el índice nuclear retuvo su orientación caudal quimiotáctica (índice de 0.70 vs 0.69 del SAZ), y en cambio, la alineación centriolar y el índice de organelos se redujeron significativamente ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ vs SAZ).

Los dos rasgos indicadores del citoesqueleto también se atenuaron, los microtúbulos asociados al centriolo disminuyeron a un promedio de 12.5/cél. ($p < 0.025$ vs SAZ) y los microfilamentos descendieron de 4+ a 2+.

RECAPITULACION DE RESULTADOS.

- 1) Los siete rasgos morfológicos seleccionados, estuvieron específicamente asociados a la quimiotaxis de los monocitos, en el modelo experimental, y confirmaron la aparición de una morfología característica de la quimiotaxis.
- 2) Los cambios estudiados en los filamentos intermedios, no estuvieron específicamente relacionados con la quimiotaxis, pues también ocurrieron en los monocitos con el suero testigo inactivo.
- 3) El gradiente de SAZ indujo la aparición de una morfología asociada a la quimiotaxis, que incluyó, el aplanamiento de la célula contra el filtro, la emisión de pseudópodos en el frente de avance, el desplazamiento caudal del núcleo, la alineación centriolar y la acumulación de los organelos en el polo frontal de la célula, así como un aumento de los microtúbulos pericentriolares y de los acúmulos de microfilamentos.
- 4) La citocalasina B inhibió los rasgos asociados a la movilidad, respetó los de orientación, redujo los microfilamentos por debajo del GEY-A y aumentó los microtúbulos por encima del SAZ, y fue el único inhibidor que provocó la penetración del núcleo en el pseudópodo, por debajo del borde del filtro.
- 5) La colchicina produjo un perfil de inhibición completo, disminuyó los rasgos de la movilidad y de la orientación, así como los microfilamentos y especialmente los microtúbulos, y fue el único inhibidor que indujo la formación de grandes racimos de filamentos intermedios.
- 6) La vimblastina inhibió los rasgos de la movilidad y del citoesqueleto, pero presentó un efecto divergente en los rasgos de orientación, con el índice nuclear poco reducido y los otros dos (alineación y organelos) muy inhibidos.
- 7) La hidrocortisona redujo los rasgos de la movilidad y de la función citoesquelética, y también ejerció un efecto divergente en los indicadores de la orientación, con el índice nuclear inafectado, y los otros dos inhibidos.

- 8) El medio axénico tuvo un perfil de estimulación incompleto, aumentó los pseudópodos y los microtúbulos, pero no los demás rasgos, y actuó como un cofactor facilitador para el SAZ.
- 9) El sobrenadante de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica, produjo una inhibición, tanto en los rasgos de la orientación como en los de la movilidad y redujo los microfilamentos, pero provocó un aumento en los microtúbulos pericentriolares superior al inducido por el SAZ.
- 10) El perfil inhibitorio del sobrenadante fue distinto al de los demás inhibidores estudiados. Semejó sobretodo al perfil de la colchicina, del que difirió radicalmente por aumentar los microtúbulos, propiedad que sólo compartió con la citocalasina B, de la que difirió porque el FILM afectó la orientación, y su efecto aparente sobre los microfilamentos fue mucho más débil.
- 11) Algunos de los efectos del sobrenadante fueron evidentes aún en ausencia de SAZ, especialmente, el aumento en el número de microtúbulos pericentriolares, y la disminución en los índices de aplanamiento y nuclear (lo que sugiere la pérdida de la movilidad aleatoria en esos monocitos).

A N A L I S I S .

Un análisis metódico, requiere anteponer, a la discusión del FILM de los sobrenadantes de amiba, una breve discusión de los rasgos morfológicos, para verificar su validez y sus posibles limitaciones, así como un análisis de los grupos testigo, que permita establecer el marco de referencia para juzgar los efectos del FILM.

ANALISIS Y VALIDACION DE LOS RASGOS MORFOLOGICOS.

La aparición de una morfología característica, asociada a la quimiotaxis, es un hecho bien establecido (7, 43, 44, 80, 87, 91, 116, 121, 138, 141). Pero respecto al valor de cada rasgo morfológico particular, hay variaciones y discrepancias (91, 121 y 7 vs 80). La emisión de pseudópodos es demostrable en muchos modelos experimentales (80, 91, 139), el aplanamiento celular depende del modelo empleado (80, 91, 139), y en torno a la posición del centriolo hay resultados discrepantes (7 vs 43 y 80).

Existen dos condiciones esenciales que deben cumplirse para establecer como válida la asociación de algún rasgo morfológico con la quimiotaxis, en cualquier modelo experimental.

- 1) El rasgo debe aparecer o incrementarse significativamente cuando la célula pasa del reposo a la quimiotaxis.
- 2) El rasgo debe estar ausente o incrementarse en forma significativamente menor en presencia de sustancias testigo quimiotácticamente inactivas.

Estas condiciones se cumplen en siete de los rasgos estudiados (Tabla 1). Por este motivo los índices de aplanamiento, de emisión de pseudópodos, nuclear, de alineación centriolar, y de organelos, así como los aumentos en los microtúbulos y los microfilamentos, pueden ser validados como rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis, y como indicadores de la función quimiotáctica de los monocitos humanos, en este modelo experimental. Esto confirma y amplía las evaluaciones previas efectuadas por Malech et al. (80) y Zakhireh et al. (138).

La penetración del núcleo por debajo del nivel del filtro fué descrita como un rasgo asociado a inhibición (80). Se encontró en el grupo SAZ+CIT, pero está virtualmente ausente (<4%) en todos los demás grupos, por lo que no es un rasgo morfológico asociado a la quimiotaxis.

El aumento en los filamentos intermedios, que ha sido descrito como asociado a la quimiotaxis (138) debe ser descartado, no obstante que también fue identificado en el presente estudio, pues no cumple la segunda condición, ya que el ST produjo los mismos cambios que el SAZ, lo que indica que el cambio se originó en algún mecanismo no específicamente relacionado con la quimiotaxis.

Salvo mención en contrario, el resto del análisis se refiere a los 7 rasgos demostrados como efectivamente asociados a la quimiotaxis en este modelo experimental.

Los valores de los índices de GEY-A y SAZ proporcionan los valores de referencia para determinar los efectos del FILM y otros inhibidores sobre cada rasgo morfológico.

El sobrenadante de amibas redujo a la mitad la quimiotaxis de los monocitos humanos (69, 73) y las dosis de los inhibidores testigo se eligieron para producir una inhibición de la misma magnitud, por lo que los valores predictibles de los índices para cada rasgo e inhibidor, deberían ubicarse en dos zonas:

- a) Valores semejantes al SAZ para los rasgos no inhibidos.
- b) Valores intermedios entre SAZ y GEY-A para los rasgos inhibidos.

El valor de los índices de los rasgos no inhibidos, como son los de orientación en el grupo SAZ+CIT, quedaron, como se esperaba, en la primera zona. Los valores de la mayoría de los demás índices, que sí están inhibidos, quedaron en la segunda zona. Sin embargo, los valores de ciertos índices por rasgo e inhibidor se apartaron notablemente de estas zonas y quedaron, ya sea por debajo del GEY-A o por encima de los valores del SAZ.

La existencia de índices por rasgo/inhibidor con valores "fuera de rango" refleja un fenómeno biológico y no un artificio de laboratorio y son importantes en dos sentidos: Reducen las hipótesis compatibles con los resultados y señalan mecanismos específicos en la inhibición quimiotáctica por un inhibidor particular.

Debe excluirse que estos índices con valores "fuera de rango" sean producto de un error o artificio de laboratorio, pues fueron un fenómeno característico y restringido a ciertos grupos experimentales, fueron constantes intra e interexperimentalmente y los demás índices obtenidos al medir las mismas células produjeron valores "ortodoxos".

Los índices con valores fuera de rango reducen las hipótesis compatibles con los resultados, pues reflejan desviaciones morfológicas específicas, explicables únicamente por la hipótesis de la aparición de una "parálisis celular", inducida por el inhibidor, pero incompatibles con hipótesis como la pérdida de la estimulación o la conclusión prematura de la quimiotaxis. También ayudan a focalizar los mecanismos de acción. Los descensos por debajo de los niveles del GEY-A, que se presentan en los microtúbulos con la colchicina y en los microfilamentos con la citocalasina B, se correlacionan bien con los sitios de acción primaria de estos dos inhibidores.

En los grupos experimentales con sobrenadante (SNS y SAZ+SN), el incremento en el número de MAC, significativamente por encima de los valores encontrados con SAZ y SAZ+MA, constituyó un índice con valores "fuera de rango", que obliga a excluir las hipótesis de pérdida de estimulación (por ejemplo que el sobrenadante destruyese al atraccante), y en cambio, focaliza el posible nivel de acción del FILM sobre los microtúbulos, con un efecto directo, o indirecto pero cercano, semejante al de la citocalasina B, que actúa sobre los microfilamentos y secundariamente induce un aumento en los microtúbulos.

Algunos rasgos requieren consideraciones adicionales: El índice de aplanamiento está condicionado por el modelo experimental y la simetría del aplanamiento.

El aplanamiento se produce cuando los leucocitos encuentran un filtro perpendicular al gradiente quimiotáctico, como ocurre en los modelos en cámaras de Boyden (80, 91, 138), pero cuando encuentran una superficie paralela al gradiente, los leucocitos se alargan (91, 121, 139, 141).

Para establecer que la medida del ancho celular es representativa, hay que determinar si los monocitos sobre el filtro se alargan sobre un solo eje, o se aplanan simétricamente formando un disco. La mitad de los filtros de un experimento se procesaron para microscopía electrónica de barrido y se encontró que los monocitos formaron un ovoide con diferencias poco marcadas entre los anchos máximo y mínimo, lo que coincide con observaciones previas (85, 91).

El aumento en el número de microtúbulos asociados al centriolo se refiere, estrictamente, a un conteo e imagen morfológicos estandarizados. Antes de extrapolarlo debe tenerse en cuenta que esta "imagen morfológica", puede reflejar un aumento real en el número de microtúbulos, o un aumento aparente originado en que los microtúbulos sean más visibles, ya sea por disminución de flexiones o aumento en la longitud (7, 137).

ANÁLISIS DE LOS GRUPOS TESTIGO.

Los grupos testigo. pueden ser agrupados en tres categorías: Testigos de actividad (GEY-A, SAZ y ST), testigos de inhibición (SAZ+CIT, SAZ+COL, SAZ+VIM, y SAZ+HC) y testigos del medio de cultivo (MAS y SAZ+MA).

TESTIGOS DE REPOSO-ACTIVIDAD.

Estos grupos sirven como referencia de la aparición de la morfología quimiotáctica. En esencia, el grupo GEY-A presentó la morfología de los monocitos no estimulados, el grupo con SAZ presentó la morfología quimiotáctica completa y el grupo ST mostró la no aparición de los rasgos quimiotácticos, verificando que éstos estuviesen asociados específicamente a la quimiotaxis.

Grupo en medio de GEY-A.

En este grupo el atrayente estaba ausente, y los componentes del medio de GEY-A se encontraban en la misma concentración en ambas cámaras, lo que canceló cualquier gradiente alterno. En estas condiciones las células no estaban en quimiotaxis. Sin embargo, hay que señalar que los monocitos no estaban en reposo "absoluto", ya que cierta cantidad de células estarían en condiciones de movilidad espontánea, y aunque el filtro es quimiotácticamente inerte, los monocitos lo detectan como un objeto físico por un mecanismo de tigmotaxia (98). Esta situación se reflejó en una cierta separación entre los índices observados y los teóricos, por ejemplo el índice nuclear fue de 0.63 en relación al teórico de 0.50. Este "ruido de fondo" fue inevitable, pero afectó por igual a todos los grupos.

Grupo con SAZ.

Este grupo fue diseñado como el testigo activo, con el atrayente presente y formando un gradiente de la cámara inferior a la superior. Los monocitos en este grupo sufrieron una reorganización celular que puso de manifiesto cambios morfológicos entre este grupo y el de GEY-A.

Los cambios fueron objetivos, cuantificables y coincidentes con las descripciones previas de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis (43, 80, 121, 138).

No todos los rasgos estuvieron necesariamente presentes o fueron de la misma intensidad en una misma célula. Esto se explica, en parte, porque las células se encontraban en diferentes etapas de la migración (p. ej. pseudópodos jóvenes, maduros o en retracción). Pero también se debió a que los rasgos son indicadores de distintas funciones semiautónomas (movilidad y orientación).

El trabajo se referirá a los monocitos en su totalidad, pero si llegasen a confirmarse los resultados de Falk (36) y Marder (81) de que sólo una subpoblación de monocitos es quimiotácticamente migrante, los resultados del estudio deberían restringirse a esa subpoblación.

Grupo con suero testigo.

En este grupo el suero, inactivado por calor, se coloca sólo en la cámara inferior, por lo que hay gradientes, pero estos fueron incapaces de inducir quimiotaxis. Los monocitos en este grupo retuvieron, en términos generales, la morfología de reposo. El aplanamiento celular y la emisión de pseudópodos, ambos rasgos indicadores de la movilidad, se elevaron, aunque permanecieron significativamente por debajo del SAZ. Esta moderada estimulación de los rasgos de movilidad sin afectar la orientación sugiere (aunque no debe interpretarse directamente como), una estimulación quimiocinética moderada.

TESTIGOS DE INHIBICION

Los inhibidores testigo pueden separarse en tres categorías:

La hidrocortisona (SAZ+HC) es un inhibidor "temprano" que actúa en los cambios de membrana posteriores al receptor pero anteriores a la estimulación del citoesqueleto. La colchicina y la vimblastina (SAZ+COL, SAZ+VIM) son inhibidores de la etapa "media" de la quimiotaxis, e impiden la orientación a través de la inhibición del ensamble microtubular. La citocalasina B (SAZ+CIT) es un inhibidor "tardío" que frena el ensamble de microfilamentos, y permite la estimulación y la orientación pero no la movilidad.

Este es el esquema básico, pero la inhibición es más compleja y no puede explicarse mediante un mecanismo de "golpe único".

Para facilitar el análisis conviene postergar la hidrocortisona cuya morfología no ha sido previamente caracterizada.

Citocalasina B.

Los cambios observados al inhibir con citocalasina B concuerdan con los datos morfológicos (80, 121) y bioquímicos (79) previos.

La alteración morfológica más drástica observada fue la disrupción del sistema microfibrilar, manifiesta de varias formas, y de mayor intensidad que en los demás grupos. Las funciones controladas por los microfilamentos; la movilidad celular y los rasgos asociados a ella, se vieron directamente afectados.

Cambios semejantes ocurrieron en las funciones derivadas de la fluidez del citoplasma, como la composición anormal de los pseudópodos, también observada, aunque no cuantificada. La unión actina-citocalasina B reduce las uniones entre microfilamentos y microtúbulos, por lo que éstos presentan menos cambios de dirección y se alargan (80, 117), este factor pudo originar el aumento de los microtúbulos, encontrado en este grupo.

Colchicina y vimblastina.

La evaluación morfológica de los monocitos inhibidos con ambas sustancias confirmó, en términos generales, las observaciones de estudios previos (80, 138). Ambas moléculas fueron inhibidores "completos" de quimiotaxis; hicieron disminuir la quimiotaxis y los rasgos morfológicos asociados a ella, tanto de la orientación como de la movilidad.

La existencia de diferencias (orientación nuclear y filamentos intermedios), sólo amplió el cuadro de efectos discrepantes identificados entre ambas moléculas (106, 113).

Llama la atención la divergencia que ocurrió en el grado de inhibición de los rasgos de orientación en el caso de la vimblastina, lo que sugiere una mayor complejidad en el proceso de orientación.

Hidrocortisona.

La hidrocortisona produjo un perfil de inhibición "completo", pues con excepción del índice nuclear, inhibió todos los demás rasgos, tanto de la orientación como de la movilidad. Los microfilamentos y los microtúbulos disminuyeron, aunque en grado menor que en el caso de la citocalasina B, y de las antitubulinas respectivamente, todo lo cual es consistente con un inhibidor quimiotáctico temprano.

Resalta la discrepancia en el grado de inhibición de los rasgos de la orientación, donde los índices de organelos, alineación centriolar y nuclear están respectivamente, mucho, medio y nada, inhibidos. Este fenómeno es más llamativo porque es semejante al encontrado en vimblast

Aún más, el perfil inhibitorio de ambas sustancias fue muy semejante, y no se pudieron demostrar diferencias estadísticas entre ellas para ningún rasgo (51). Hay que recordar que en estadística, "fallar en demostrar diferencia" no implica necesariamente "demostrar igualdad". La hidrocortisona y la vimblastina son moléculas diferentes, que actúan en sustratos diferentes y en etapas distintas de la inhibición quimiotáctica, pero la semejanza en los perfiles inhibitorios de ambas, podría indicar que utilizasen una vía final común, o que alguna de ellas tenga un mecanismo de acción adicional a los conocidos.

TESTIGOS DEL MEDIO DE CULTIVO (grupos MAS y SAZ+MA).

La tercera categoría de grupos testigo correspondió a los grupos en que se agregó el medio axénico para el cultivo de la amiba, procesado en ausencia de ésta. Y fueron los grupos con medio axénico solo (MAS) o donde éste se adicionó al SAZ (SAZ+MA).

Estudios previos mostraron que el medio axénico no es quimiotácticamente inerte, ya que al evaluar el número de células por campo, se encontró que ejercía un débil efecto estimulante (67, 69, 73).

En este modelo se observó que los efectos del medio axénico se extendieron a la morfología asociada a la quimiotaxis, ya que el medio axénico produjo por sí solo (MAS) un efecto estimulante, relativamente débil e irregular, que afectó unos rasgos sí y otros no.

Aumentó significativamente el número de pseudópodos, pero no indujo el aplanamiento, y no afectó los tres rasgos de orientación. Aumentó el número de los microtúbulos pericentriolares hasta valores equivalentes a los del SAZ, y en forma moderada aumentó los microfilamentos. El medio axénico adicionado al SAZ tuvo un efecto complejo, pero potente, pues sinergizó los efectos del SAZ en los rasgos de movilidad. Los índices de orientación y los microtúbulos alcanzaron valores comparables a los del SAZ, y sólo el aumento en los microfilamentos fue menor con SAZ+MA que con SAZ, aunque comparable al del MAS.

Determinar cual o cuantos de los numerosos componentes del medio axénico fueron los que produjeron estos efectos estimulantes, está fuera del alcance de este trabajo. La acción del medio axénico parece corresponder más a un cofactor facilitador que a un atrayente per se, ya que los efectos máximos se alcanzaron al combinar medio axénico con el SAZ.

EL FILM DEL SOBRENADANTE. I. ANALISIS INTRAEXPERIMENTAL.

EFFECTOS DEL SOBRENADANTE SOLO (grupo SNS).

La adición del sobrenadante a las células en medio de GEY-A, produjo ciertos cambios morfológicos que sugieren la desaparición del débil efecto estimulante del medio de cultivo, e incluso la cancelación de la movilidad aleatoria espontánea de los monocitos.

Los rasgos de movilidad estuvieron especialmente afectados y disminuyeron significativamente con respecto al MAS, el aplanamiento disminuyó significativamente incluso respecto al GEY-A.

Entre los rasgos de orientación, el índice nuclear también se redujo significativamente y se acercó mucho al índice teórico para condiciones de no estimulación absoluta (0.54 vs 0.50 contra 0.60 del GEY-A).

En contraste, el número de microtúbulos asociados al centriolo se elevó significativamente, por encima de los valores de los grupos estimulados SAZ y SAZ+MA. Esto indica la aparición de un rasgo característico, fuera del rango "habitual" de variación de esta estructura citoesquelética (GEY-A 11, SAZ 15, vs SNS 21).

Una implicación fundamental de este hecho, es que el efecto del FILM de los sobrenadantes se ejerce sobre una estructura preexistente, cuya funcionalidad es necesaria para la movilidad del monocito, y no sobre un mediador transitorio generado durante la quimiotaxis.

EFFECTOS DEL SOBRENADANTE VS EL SAZ (grupo SAZ+SN).

Los cambios observados en este grupo permiten establecer un perfil inhibitorio del FILM de los sobrenadantes de E. histolytica sobre la morfología quimiotáctica de los monocitos humanos, consistente en una disminución moderada de los rasgos de movilidad, una disminución profunda de los rasgos de orientación y una alteración del citoesqueleto con disminución de microfilamentos y aumento de microtúbulos.

La inhibición de los rasgos morfológicos asociados a la quimiotaxis en este grupo, sí indica una disminución de la función del monocito, que en presencia del gradiente del atractante, debería mostrar la reorganización celular que acompaña y controla la locomoción.

Los cambios encontrados en los rasgos morfológicos estudiados, excepto el aumento de microtúbulos, son compatibles con los cambios predecibles para un inhibidor quimiotáctico "completo", esto es, que cancele tanto orientación como movilidad, tal como lo hace la colchicina.

Sin embargo, el cambio predecible para los microtúbulos era una disminución y no un aumento "exagerado", que es lo que se encontró.

Esta situación plantea el problema de la interpretación del cambio morfológico; ¿sobre-estimulación o inhibición?

La disminución de los demás rasgos morfológicos evaluados en las mismas células, especialmente las posiciones del núcleo y de los organelos, que son directamente determinadas por los microtúbulos (12, 80, 116, 138, 141), indican que el aumento exagerado de éstos no se tradujo en una sobreestimulación eficaz, y debe ser interpretado como parte del perfil de inhibición del FILM.

Existen dos alternativas para explicar el aumento de microtúbulos, asociado a inhibición quimiotáctica que son:

- a) El FILM inhibe directamente los microtúbulos, pero por un mecanismo diferente al utilizado por inhibidores del ensamble tubular como la colchicina y la vimblastina.
- b) El aumento de los microtúbulos representa un esfuerzo de la célula por superar, sin conseguirlo, un obstáculo en una etapa posterior del proceso quimiotáctico.

En el segundo caso el efecto primario debería estar en una etapa más tardía de la respuesta quimiotáctica, que es la de la movilidad y que está controlada por el sistema de los microfilamentos. Los datos del estudio y de la línea ayudan a perfilar, pero no a excluir ninguna de las dos opciones, por lo que persiste cierto grado de reserva al ir más allá de la caracterización morfológica.

COMPARACION DEL FILM CON LOS OTROS INHIBIDORES.

Al comparar los cambios morfológicos producidos por el FILM con los causados por los otros inhibidores emergió un complejo patrón de similitudes y diferencias.

La citocalasina B fue la única que compartió el aumento exagerado de los microtúbulos, pero falló en inhibir los rasgos asociados a la orientación. Redujo las zonas densas de microfilamentos en forma drástica, mientras que el FILM lo hizo sólo en forma moderada y además, la citocalasina B indujo la disrupción del halo submembranal de microfilamentos, cambio ausente en el caso del FILM.

Las diferencias en los efectos sobre los microfilamentos son fundamentales. En el caso de la citocalasina B, las alteraciones morfológicas reflejaron directamente la acción bioquímica de ésta en la etapa más temprana de la polimerización de microfilamentos. Los cambios mucho más leves producidos por el FILM, excluyen que éste actúe en esa etapa, pero dejan abierta la posibilidad de que el FILM actúe en la etapa más tardía del anillado, en la que los polímeros de actina, se entrecruzan entre sí, y con los demás filamentos.

Los perfiles de inhibición del FILM y de la colchicina fueron muy semejantes, ambos inhibieron los rasgos de la movilidad y de la orientación, pero los cambios en los microtúbulos son diametralmente opuestos. Este hecho excluye que el FILM actúe como la colchicina, al evitar el ensamble de los microtúbulos, pero deja abiertas las posibilidades de que el FILM induzca un "sobre-ensamble", que evite el desensamble, o que ejerza un efecto indirecto.

Los perfiles de inhibición de la vimblastina y el FILM difirieron más. La vimblastina, además de disminuir los microtúbulos, presentó una discrepancia en los rasgos de orientación, discrepancia que no se presentó con el FILM.

Los perfiles inhibitorios del FILM e hidrocortisona también fueron distintos, especialmente porque la hidrocortisona redujo los microtúbulos. El perfil de inhibición de la hidrocortisona fue compatible con lo esperado en una estimulación abortiva, en correspondencia con su nivel de inhibición en una etapa muy temprana de la activación quimiotáctica. El aumento de los microtúbulos en el caso del FILM no es explicable con esta hipótesis, y consecuentemente no es en este nivel donde el FILM ejerce su efecto.

La comparación de los cambios morfológicos inducidos por el FILM y los otros inhibidores sugiere que el FILM podría actuar en la fase efectora de la quimiotaxis, teniendo como blanco las estructuras citoesqueléticas, o alguna molécula estrechamente relacionada con ellas, y que esta acción se ramifica en varios efectos secundarios.

Los resultados apoyan que el efecto del FILM es sobre la célula, pues algunos cambios ocurren ya en ausencia de atractante. Sin embargo, a nivel subcelular, como el perfil inhibitorio del FILM no fue idéntico a ninguno de los perfiles de los otros inhibidores estudiados, persiste cierta incertidumbre sobre el nivel preciso al que se ejerce el efecto inhibidor directo del FILM. Podrían ser los microtúbulos ya que existen antecedentes de inhibición quimiotáctica asociada al aumento de los microtúbulos en ciertas situaciones particulares, fisiológicas (99), o patológicas (43), pero también podrían ser los microfilamentos. Existe también la posibilidad de un doble efecto primario.

EL FILM. II. ANALISIS INTRALINEA.

INHIBICION DE LA ORIENTACION Y LA MOVILIDAD.

Al analizar los resultados del estudio junto con el resto de los datos conocidos sobre el FILM de E. histolytica, aparecen dos aspectos de especial relevancia, que son, la afectación simultánea de la movilidad y de la orientación y la necesidad de una molécula intermediaria. Parece existir una alteración simultánea de la movilidad y de la orientación. La capacidad de orientación del monocito se pierde, como lo demuestran los cambios en los índices nuclear, centriolar y de organelos, además de la semejanza que, excepto en los microtúbulos, hubo entre los perfiles inhibitorios del sobrenadante y la colchicina, que es un inhibidor de la orientación y secundariamente de la movilidad (80, 138). Pero el FILM también inhibe las movi­lidades aleatoria y quimio­cinética de los monocitos (72, 73), funciones que no requieren de la orientación. Esto sugeriría un efecto primario sobre la porción matriz del citoesqueleto, pero si el efecto fuera sólo sobre movilidad, entonces la orientación, que es previa, no debería afectarse, tal como ocurre con citocalasina B (80).

Provisionalmente, habrían tres formas de explicar los efectos del FILM sobre las movi­lidades no quimiotácticas y sobre los componentes de movilidad y de orientación de la quimiotaxis de los monocitos, que serían:

- a) EL FILM tiene dos acciones primarias.
- b) EL FILM actúa en la encrucijada donde se acoplan orientación y movilidad.
- c) EL FILM actúa sobre algún elemento común a ambos procesos.

La opción del doble efecto es "cómoda" pero difícil de probar. Un efecto en la encrucijada es una hipótesis factible, ya que existen enlaces entre microtúbulos y microfilamentos y algunas MAPs interactúan con ambos tipos de filamentos, sin embargo estas moléculas son todavía demasiado poco conocidas para definir su acción. La opción de un efecto sobre un factor común también existe, pues iones, como el Ca^{++} , y nucleótidos, como el GMPc participan tanto en orientación como en movilidad.

¿UNA MOLECULA FRENADORA INTERMEDIARIA?

La integración de este estudio a la línea de investigación, aporta evidencia adicional de que el FILM utiliza una molécula intermediaria que es propia del monocito. Esto fue sugerido inicialmente, por que el efecto inhibitorio del FILM, se pierde al inhibir la síntesis protéica del monocito con cicloheximida (25, 70). Los cambios citoesqueléticos ocurren en la profundidad del citoplasma y sólo son explicables por algún mecanismo de inhibición activa pero no como una simple pérdida de la estimulación.

Si se unen las observaciones morfológicas, con los datos de que el FILM encuentra un receptor específico en el monocito (23, 74), que no es el del attractante (72, 73), que está presente en PMN y monocitos, pero que sólo en estos últimos se acopla a la inhibición (72, 73, 94), y que el FILM depende de la síntesis protéica para ejercer su efecto (25, 70). Se tiene, entonces, una vía de acción relativamente larga, que requiere de la participación de un intermediario, que actúe como un freno de la quimiotaxis.

La identidad de esta molécula permanece desconocida. No es la fosfolipasa A₂ de Hirata (60, 61) ya que el perfil de inhibición del FILM es distinto al de la hidrocortisona que actúa a través de dicha proteína. Tampoco es probable que el elemento afectado sea la síntesis de tubulina, dineína, actina u otras proteínas constitutivas de los microtúbulos o microfilamentos, pues el fondo de subunidades no ensambladas existentes en el citoplasma permite un gran margen de adaptación.

Tentativamente, y con reservas, podrían postularse tres candidatos a corresponder a la proteína frenadora detectada con cicloheximida y compatibles con la morfología observada, que serían:

- a) Alguna MAP que sobre estabilice los microtúbulos e impida o retrase su desensamble.
- b) Alguna proteína que regule la etapa tardía del ensamble de microfilamentos, donde los oligómeros se entrecruzan formando un enrejado y también se asocian con otros tipos de fibras incluyendo microtúbulos.
- c) Alguna proteína reguladora de los nucleótidos quimiotáctica-mente relevantes (GMPc, AMPc, etc.).

La tercera alternativa adquiere mayor importancia, ante la evidencia de que el FILM incrementa los niveles de AMPc en los monocitos, según datos de un estudio en proceso (G. Rico, comunicación personal).

EL FILM. III. ANALISIS GLOBAL.

EL FILM: ¿INHIBIDOR O REGULADOR?

Si el FILM utiliza una protefna intermediaria del propio monocito, para inhibir su locomoción, la composición química del FILM, no guardará relación con la estructura química de los componentes citoesqueléticos afectados, y puede excluirse que el FILM sea un polímero, como el taxol, que incrementa directamente los microtúbulos, al estabilizarlos y disminuir el desensamblaje y que de esta forma impide su funcionamiento (117, 128).

Por otra parte, si el FILM recluta elementos de los propios monocitos como parte de su mecanismo de inhibición de la locomoción, existe la posibilidad de que el FILM no sea un inhibidor que desarticule las funciones del monocito, como lo hacen la citocalasina B, la colchicina y la vimblastina, sino que más bien pudiera actuar explotando los mecanismos de regulación del propio monocito. Esta posibilidad se apoya también en otros datos, como son que el efecto del FILM sobre los monocitos no es tóxico (hasta donde se ha determinado), y que la inhibición producida por el FILM tiene una magnitud tope de cerca del 50%, que parece no poder ser aumentada al incrementar la cantidad del sobrenadante. El argumento de la inhibición limitada, aunque es discutible, ha sido considerado como evidencia de la activación de un mecanismo fisiológico de regulación, más que de uno propiamente inhibidor (33, 110, 135).

EL FILM VS EL MIF.

En este sentido es particularmente relevante que el aumento de microtúbulos en condiciones de inhibición quimiotáctica ha sido descrito también en la inhibición con MIF (99).

El estudio de Pick (99) está hecho con macrófagos de cobayo y se requieren 16 horas de incubación para provocar el aumento en los microtúbulos. El FILM ya ha inducido ese cambio a los 90 minutos, sin embargo el paralelismo en los cambios microtubulares obliga a analizar las posibles relaciones entre FILM y MIF.

Los resultados del estudio de Pick y éste, no son directamente comparables, y una respuesta definitiva requeriría una investigación dirigida a este problema. Sin embargo, pueden hacerse ciertas consideraciones: El FILM no es MIF ya que su peso molecular está entre 500 y 1000 Daltons (94), mientras que el del MIF es mayor de 10.000 (111, 118).

Tampoco es probable que el FILM induzca la producción de MIF, pues éste es producido por los linfocitos sensibilizados por contacto, en presencia de un estímulo y requiere de varias horas para su síntesis y liberación (69, 93, 99), mientras que el FILM ejerce su efecto en condiciones experimentales en las que los linfocitos carecen del tiempo, el contacto y la sensibilización específicos requeridos, y aparentemente carecen de receptores para el FILM (72, 73). La posibilidad de que el FILM actúe aprovechando el sistema de recepción al MIF queda limitada, ya que el FILM utiliza un receptor que contiene manosa, carbohidrato ausente en el receptor del MIF (74).

¿TIENE EL FILM EFECTOS ADICIONALES?

Entre los leucocitos, el efecto del FILM está limitado a los tres tipos de movilidad de los monocitos. Ninguno de estos tipos de movilidad está afectado en los PMN (72, 73, 94) y probablemente tampoco en los linfocitos, pero su actividad sobre células no leucocíticas no ha sido estudiada.

A este respecto hay un estudio de Ravdin (106) que identifica un factor soluble de E. histolytica, que produce pérdida de la orientación, redondeamiento y desprendimiento de células epiteliales intestinales en cultivo de tejidos, a través de un efecto no tóxico. La posible relación entre el FILM y el factor soluble de Ravdin es interesante, pero por el momento simplemente es especulación.

Si se considera que el FILM es producido por varias cepas de amibas (72), y que es liberado por las amibas en el medio de cultivo, en ausencia de monocitos y de cualquier reto inmunológico (32), debe plantearse si la inhibición de la locomoción de los monocitos humanos es la función primaria del FILM, o si ese fenómeno es sólo un accidente biológico "afortunado" (para la amiba), y en este caso ¿cuál sería la función primaria del FILM?

El FILM podría ser un factor para producir el desprendimiento de las células intestinales, como el factor soluble de Ravdin que incidentalmente también afectase a los monocitos.

El FILM también podría ser un regulador de la movilidad de la propia amiba, cuyo efecto se extendiese a estructuras homólogas persistentes en los monocitos humanos como por ejemplo alguna de las fosfolipasas A2 identificadas en la amiba (77). Esto es factible ya que a lo largo de la evolución, los leucocitos han ido incorporando nuevos mecanismos de locomoción, pero sin desechar los antiguos, que pueden ser evidenciados cuando se inhiben las formas "superiores" de locomoción (11, 12).

Si éste fuera el caso, serían los microfilamentos la estructura blanco más probable, pues éstos participan ya en la formas más primitivas de movilidad, y existe un gran parecido molecular y funcional entre las actinas de E. histolytica y la humana, que son capaces de copolimerizar. Incluso proteínas asociadas como las proteínas ligadoras de actina humana y de la amiba, están muy estrechamente relacionadas (103), lo que representa varios elementos comunes entre los sistemas locomotores de la amiba y los monocitos. En cambio los microtúbulos, importantes en el mantenimiento de las formas "superiores" de locomoción, son aparentemente innecesarios para la movilidad por cambios de viscosidad y flujos de citoplasma de la amiba (53). Cuando los microtúbulos han podido ser demostrados en ésta, son de diámetro y características distintas a los microtúbulos de los monocitos (83, 106, 107, 113, 123), lo que reduce su probabilidad como posible blanco para el FILM.

Las semejanzas en el sistema microfibrilar, las diferencias en el sistema microtubular y el hecho de que todos los tipos de movilidad del leucocito están afectados, junto con el hecho de que el sobrenadante afecta la morfología de los monocitos, aún en ausencia de un estímulo quimiotáctico, apoyarían que el elemento microfibrilar, más básico y primitivo, fuese la estructura blanco del FILM.

ESPECIFICIDAD DE ESTIRPE BLANCO: MONOCITOS VS PMN.

Si el FILM actuase sobre alguna estructura básica de la locomoción celular (136), debe retomarse el problema del efecto diferencial del FILM sobre los monocitos y los PMN humanos.

Generalmente, las respuestas de ambas estirpes a los inhibidores como la colchicina y la citocalasina B (27, 138), son aceptablemente paralelas, pero en algunas situaciones ocurre la inhibición sólo en una de las estirpes, como con el NIF (52) y el LIF (33) que inhiben sólo la quimiotaxis de los PMN.

En el caso del FILM es poco probable que la existencia de diferencias en el tipo de los receptores inhibitor-específicos, presentes en ambos leucocitos produjese la inhibición diferencial, ya que los PMN también presentan receptores que unen al FILM, y sin embargo esta unión no se transduce en una inhibición quimiotáctica (72).

Existen situaciones de inhibición diferencial de la movilidad de monocitos y PMN que no dependen de diferencias en el receptor al inhibidor, estas situaciones han sido descritas principalmente en relación con los cambios metabólicos de la membrana, tanto en las reacciones de transmetilación de fosfolípidos (110), como por alteraciones en la vía del colesterol (102). Estas condiciones producen una inhibición estirpe específica pero atrayente inespecífica (52, 102, 110).

La inhibición quimiotáctica diferencial del FILM sobre los monocitos y no sobre los PMN podría relacionarse con las complejas reacciones membranales que no son comunes a ambas estirpes leucocitarias. Si se postulase un efecto directo del FILM a este nivel, quedarían sin explicación ciertos hallazgos morfológicos, especialmente el aumento de microtúbulos, pero es posible un mecanismo indirecto donde el FILM actúe sobre el citoesqueleto y éste sobre las reacciones de membrana, que serían cronológicamente secundarias pero biológicamente críticas, ya que éstas requieren de buena movilidad en la membrana y de la posición relativa adecuada de ciertas enzimas y estos dos factores son regulados por el citoesqueleto presente por debajo de la membrana (29, 88).

POSIBLE IMPORTANCIA DEL FILM.

Aunque la importancia biológica del FILM, in vivo, no debe ser extrapolada directamente, los resultados de este estudio in vitro aportan evidencias de que Entamoeba histolytica tiene, en el FILM, un mecanismo capaz de ayudarla a evadir la respuesta inmune, al reducir el acceso de los fagocitos mononucleares al foco de infección, y apoya la hipótesis antimigratoria como causa de la escasa inflamación presente en el AHA.

El FILM parece no cortar la quimiotaxis, sino actuar sobre una estructura preformada, y establecer un bloqueo, que la estimulación quimiotáctica no puede sobrepasar, explotando quizá, los mecanismos reguladores de la movilidad del propio monocito, y podría corresponder a una preadaptación de la amiba, que actuase en forma cruzada, sobre las estructuras y mecanismos más básicos, pero filogenéticamente preservados, de la locomoción celular.

CONCLUSIONES.

- 1) EL FILM DE SOBRENADANTES DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS (HM - 1), ALTERA TODOS LOS RASGOS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA QUIMIOTAXIS, ESTUDIADOS EN MONOCITOS HUMANOS IN VITRO.

Induce un aumento en los microtúbulos pericentriolares, y reduce todos los demás, por lo que inhibe tanto los indicadores de orientación como los de movilidad.

- 2) EL PERFIL DE INHIBICION DEL FILM ES DISTINTO AL DE LOS DEMAS INHIBIDORES ESTUDIADOS.

Esto impide identificar el nivel preciso de su acción, pero sugiere que el FILM actúe en, o muy cerca, de la encrucijada de orientación y movilidad (ya sea en la etapa tardía de polimerización y ensamble microtubular; o en las proteínas que regulan estructural o energéticamente a ambas estructuras o su interacción).

- 3) HIDROCORTISONA TIENE UN PERFIL INHIBITORIO CASI COMPLETO, INHIBE TODOS LOS RASGOS EXCEPTO EL DESPLAZAMIENTO CAUDAL DEL NUCLEO.

La semejanza en los perfiles inhibitorios de hidrocortisona y vimblastina sugiere la existencia de mecanismos comunes de acción, aún desconocidos, en alguno de los inhibidores.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1- Abo, T., Kawate, T., Itoh, K. y Kumagai, K.: Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J. Immunol.* 1981, 126:1360-1363.
- 2- Acosta-Altamirano, G., Torres-Sánchez, E., Meraz, E., Isibasi-Araujo, A., y Kumate-Rodríguez, J.: Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* en muestras de calostro humano. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1986, 17 (supl. 1.):291-295.
- 3- Aguirre-García, J., Tanimoto-Weki, M., Resano-Pérez, F., Landa, L. y Sepúlveda, B.: Estudio sobre diapédesis en amibiasis experimental. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 1986, 17 (supl.1): 215-221.
- 4- Allan, R. B. y Wilkinson, P. C.: A visual analysis of chemotactic and chemokinetic locomotion of human neutrophil leukocytes; Use of a new chemotaxis assay with *Candida albicans* as gradient source. *Exp. Cell Res.* 1978, 111:191-203.
- 5- Allen, R. D.: Motility. *J. Cell Biol.* 1981, 91 (3-parte 2): 148s-155s.
- 6- Altman, L.C., Snyderman, R., Oppenheim, J. J. y Mergenhagen, S. E.: A human mononuclear leukocyte chemotactic factor: Characterization, specificity and kinetics of production by homologous leukocytes. *J. Immunol.* 1973, 110:801-810.
- 7- Anderson, D. C., Wible, L. J., Hughes, B. J., Smith, C. W. y Brinkley, B. R.: Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes: Effects of chemotactic stimulation and colchicine. *Cell* 1982, 31 (parte 2):719-729.
- 8- Barroeta, O., Nungaray, M. L., Salamanca, F. y Kretschmer, R.: Quimiotaxis y quimocinesis de los monocitos en el síndrome de Down. LI Reunión Reglamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica A. C. 1980, pp 92-107.
- 9- Barroeta, O., Nungaray, L., López-Osuna, M., Armendares, S., Salamanca, F. y Kretschmer, R.: Defective monocyte chemotaxis in children with Down's syndrome. *Pediatr. Res.* 1983, 17:292.

- 10- Berlin, R. D. y Oliver, J. M.: Analogous ultrastructure and surface properties during capping and phagocytosis in leukocytes. *J. Cell Biol.* 1978, 77:789-804.
- 11- Bhisey, A. N. y Freed, J. J.: Ameboid movement induced in cultured macrophages by colchicine or vinblastine. *Exp. Cell Res.* 1971, 64:419-429.
- 12- Bhisey, A. N. y Freed, J. J.: Altered movement of endosomes in colchicine-treated cultured macrophages. *Exp. Cell Res.* 1971, 64:430-438.
- 13- Biagi, F.: Amibiasis. En *Enfermedades Parasitarias*. 1^a. México D. F., 1974, Ed. Prensa Méd. Méx., pp 81-124.
- 14- Birmingham, J. R., Tabatabai, L. B., Deyoe, B. L., Jeska, E. L. y Nuessen, M. E.: Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of Brucella abortus. *Immunol.* 1982, 46:17-22.
- 15- Bokisch, V. A. y Müller-Eberhard, H. J.: Anaphylatoxin inactivator of human plasma: Its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.* 49:2427-2436.
- 16- Boyd, A. y Simon, M.: Bacterial chemotaxis. *Ann. Rev. of Physiol.* 1982, 44:501-517.
- 17- Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 1962, 115:454-466.
- 18- Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, 21 (97 supl. 27): 77-89.
- 19- Brandt, H.: Amibiasis. En *Texto de Patología*. 2^a. México D.F., 1975, Ed. Prensa Méd. Méx., pp 226-238.
- 20- Cameron, D.J. y Churchill, W. H.: Macrophage mediated cytotoxicity in man: Role of hydrocortisone, trypan blue, chloroquine and prednisolone. *Int. J. Immunopharmac.* 1981, 3:77-85.

- 21- Campos-Rodríguez, R., Barranco-Tovar, C., Isibasi, A. y Kumate-Rodríguez, J.: Células plasmáticas antiambiha en sangre periférica de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (supl. 1):303-306.
- 22- Carnuccio, R., Di Rosa, M., Flower, R. J. y Pinto, A.: The inhibition by hydrocortisone of prostaglandin biosynthesis in rat peritoneal leucocytes is correlated with intracellular macrocortin levels. Br. J. Pharmac. 1981, 74:322-324.
- 23- Castro, E. M., Arellano, J., Pacheco, M. G. y Kretschmer, R.: Estudio in vitro de la interacción de monocitos humanos y el factor inhibidor de la locomoción de los monocitos producido por E. histolytica. VI Congreso Nacional de Inmunología, México D.F., 1985, Resumen 63.
- 24- Cianciolo, G. J., Mattheus, T. J., Bolognesi, D. P. y Snyderman, R.: Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular weight products from murine leukemia viruses. J. Immunol. 1980, 124:2900-2905.
- 25- Collado, M. L., Garibay, A. M., Barroeta, O. y Kretschmer, R.: Effect of cycloheximide on the inhibition of monocyte chemotaxis by products of E. histolytica. IV Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, Mor., 1981, Resumen 54.
- 26- Colton, T.: Statistics in medicine. Boston (E. U.), 1974, Ed. Little Brown Co. pp 129.
- 27- Confer, D. L. y Eaton, J. W.: Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. Science 1982, 217:948-950.
- 28- Councilman, W. T. y Lafleur, H. A.: Amoebic dysentery. Johns Hopkins Hosp. Rep. 1891, 2:395.
- 29- Cheung, H. T., Cantarow, W. D., y Sundharadas, G.: Colchicine and cytochalasin B (CB) effects on random movement, spreading and adhesion of mouse macrophages. Exp. Cell Res. 1978, 111:95-103
- 30- Daems, W. T. y Wisse, E.: Peroxidatic activity in monocytes and macrophages. En Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Londres, 1975, Ed. Ralph Vanfurth, Blackwell scientific publications, pp 57-77.

- 31- Dannenberg, A. M.: Macrophages in inflammation and infection. *New Engl. J. Med.* 1975, 293:489.
- 32- Diamond, L. S.: Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. *Science* 1961, 134:336-337.
- 33- Donabedian, H. y Gallin, J. I.: Two inhibitors of neutrophil chemotaxis are produced by Hyperimmunoglobulin E recurrent infection syndrome mononuclear cells exposed to heat-killed Staphylococci. *Infection and Immunity* 1983, 40:1030-1037.
- 34- El-Naggar, A. K., Van Epps, D. E. y Williams, R. C.: Human-B and T-Lymphocyte locomotion in response to casein, C5a, and f-Met-Leu-Phe. *Cell. Immunol.* 1980, 56:365-373.
- 35- Everson-Pears A. G.: *Histochemistry. Theoretical and applied.* Edinburgh, 1972, Ed. Churchill Livingstone, Vol. 2, pp 1305.
- 36- Falk, W. y Leonard, E. J.: Human monocyte chemotaxis: Migrating cells are a subpopulation with multiple chemotaxin specificities on each cell. *Infection and Immunity.* 1980, 29:953-959.
- 37- Fernández, H. N., Henson, P. y Hugli, T. E.: A single scheme for C3a and C5a isolation and characterization of chemotactic behavior. *J. Immunol.* 1976, 116:1732.
- 38- Fernández, H. N. y Hugli, T. E.: Partial characterization of human C5a anaphylatoxin. I. Chemical description of the carbohydrate and polypeptide portions of human C5a. *J. Immunol.* 1976, 117 (5 parte 1):1688-1694.
- 39- Fernández, H. N., Henson, P. M., Otani, A. y Hugli, T. E.: Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylotoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under simulated in vivo conditions. *J. Immunol.* 1978, 120:109-115.
- 40- Fries, L. F., Brockman, Ch. M. y Frank, M. M.: Monocyte receptors for the Fc portion of IgG increase in number in autoimmune hemolytic anemia and other states and decreased by glucocorticoid therapy. *J. Immunol.* 1983, 131:1240-1245.
- 41- Gallin, J. I., Clark, R. A. y Kimball, H. R.: Granulocyte chemotaxis: an improved in vitro assay employing ⁵¹Cr-labeled granulocytes. *J. Immunol.* 1973, 110:233-240.

- 42- Gallin, J. I. y Rosenthal, A. S.: The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis, evidence for an association between calcium exchange and microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 1974, 62:594-609.
- 43- Gallin, J. I., Malech, H. L., Wright, D. G., Whisnant, J. K. y Kirkpatrick, C. H.: Recurrent severe infections in a child with abnormal leukocyte function: Possible relationship to increased microtubule assembly. *Blood* 1978, 51:919-933.
- 44- Gallin, J. I., Wright, D. G. y Schiffmann, E.: Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 1978, 62:1364-1374.
- 45- Gerard, C. y Hugli, T. E.: Identification of classical anaphylatoxin as the des-Arg form of the C5a molecule: evidence of a modulator role for the oligosaccharide unit in human des-Arg74-C5a. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 1981, 78:1833-1837.
- 46- Gerish, G.: Chemotaxis in Dictyostelium. *Ann. Rev. Physiol.* 1982, 44:535-552.
- 47- Gibbons, I. R.: Cilia and flagella of eukaryots. *J. Cell Biol.* 1981, 91(3-parte 2):107s-124s.
- 48- Giménez-Scherer, J. A., Collado, M. L., Cruz Lavín, E., Hernández-Jáuregui, P. y Kretschmer, R. R.: Inhibition of human monocyte chemotaxis by products of E. histolytica. Ultrastructural aspects. IV Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, Morelos, 1981. Resumen 52.
- 49- Giménez-Scherer, J. A., Pacheco, M. G., Cruz de Lavín, E., Hernández, P. y Kretschmer, R.: Cambios ultraestructurales asociados a la inhibición de la quimiotaxis de monocitos humanos provocada por productos de E. histolytica cultivada en medio axénico. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1986, 17 (supl. 1):251-254.
- 50- Giménez-Scherer, J. A., Pacheco-Cano, M. G., Cruz de Lavín, E., Hernández-Jáuregui, P., Merchant, M. T. y Kretschmer R.: Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown Entamoeba histolytica. *Lab. Invest.* 1987, 57:45-51.

- 51- Giménez-Scherer, J. A., Pacheco, M. G., Cruz, E., Hernández, P. y Kretschmer R.: Inhibición de la quimiotaxis (QT) de monocitos humanos (FM) por hidrocortisona (HC). VII Congreso Nacional de Inmunología, Zacatecas, Zac. 1987. Resumen 96.
- 52- Goetzl, E. J. y Austen, K. F.: A Neutrophil-immobilizing factor derived from human leukocytes. I Generation and partial characterization. *J. Exp. Med.* 1972, 136:1564-1580.
- 53- Goodall, R. J. y Thompson, J. E.: Scanning electron microscopic study of phagocytosis. *Exp. Cell Res.* 1971, 64:1-8.
- 54- Griffith, L. M. y Pollard, T. D.: Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J. Cell Biol.* 1978, 78:958-965.
- 55- Gutiérrez, G.: Epidemiología y control de la amibiasis en México. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1986, 17 (supl. 1):375-383.
- 56- Haimo, L. T. y Rosenbaum, J. L.: Cilia, Flagella, and microtubules. *J. Cell Biol.* 1981, 91 (3 parte 2):125s-130s.
- 57- Harries, J.: Amoebiasis: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1982, 75:190-197.
- 58- Havercroft, J. C., Quinlan, R. A. y Gull, K.: Characterisation of a microtubule organising centre from Physarum polycephalum Myxamoebae. *J. Ultrastruc. Res.* 1981, 74:313-321.
- 59- Hirata, F., Corcoran, B. A., Venkatasubramanian, K., Schiffmann, E. y Axelrod, J.: Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76:2640-2643.
- 60- Hirata, F., Schiffmann, E., Venkatasubramanian, K., Salomon, D. y Axelrod, J.: A phospholipase A₂ inhibitory protei in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77:2533-2536.
- 61- Hirata, F.: The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1981, 256:7730-7733.

- 62- Hong, K., Kinoshita, T., Miyazaki, W., Izawa, T. y Inoue, K.: An anticomplementary agent, K-76 monocarboxylic acid: Its site and mechanism of inhibition of the complement activation cascade. *J. Immunol.* 1979, 122:2418-2423.
- 63- Inoué, S.: Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 1981, 91 (3 parte 2): 131s-147s.
- 64- Jervis, H. R. y Takeuchi, A.: Amebic Dysentery. Experimental Entamoeba histolytica infection in the germfree guinea pig. *Am. J. Pathol.* 1979, 94:197-200.
- 65- Kawate, T., Abo, T., Hinuma, Sh. y Kumagai, K.: Studies on the bioperiodicity of the immune response. II. Co-variations of Murine T and B cells and a role of corticosteroid. *J. Immunol.* 1981, 126:1364-1367.
- 66- Kretschmer, R. R., Sepúlveda, B., Almazán, A. y Gamboa, F.: Intradermal reactions to an antigen (Histolyticin) obtained from axenically cultivated Entamoeba histolytica. *Trop. Geogr. Med.* 1972, 24:275-281.
- 67- Kretschmer, R. R.: Chemotaxis. En *Molecules, cells and parasites in immunology*. Nueva York (E. U.), 1980, Ed. Larralde, C., Wills, K., Ortiz-Ortiz, L., Sela, M; New York, academic press, pp 91-102.
- 68- Kretschmer, R. R. y Collado, M. L.: Chemotaxis. *Infection* 1980, 8 (supl. 3):s299-s302.
- 69- Kretschmer, R., Salinas-Carmona, M. C., López-Osuna, M. y Avila, M. E.: Efecto de Entamoeba histolytica sobre la quimiotaxis de monocitos humanos. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1980, 11 (supl. 1):147-151.
- 70- Kretschmer, R. R., Collado, L., Garibay, A. M. y Barroeta, O.: Effect of cycloheximide on the inhibition of monocyte chemotaxis by soluble products of E. histolytica. *Fed. Proc.* 1981, 40:1075.
- 71- Kretschmer, R. R., Giménez, J. A., Collado, L., Cruz, E. y Hernández, P.: Further characterization of the monocyte chemotaxis inhibitory factor produced by E. histolytica. *Fed. Proc.* 1982, 41:579.

- 72- Kretschmer, R., Collado, M. L., Pacheco, M. G., Salinas, M. C., Lecuona, M., López-Osuna, M., Castro, E. M. y Arellano, J.: Inhibición de la locomoción de monocitos humanos por productos de E. histolytica cultivada en medio axénico. VI Congreso Nacional de Inmunología, México D. F., 1985, Resumen 29.
- 73- Kretschmer, R. R., Collado, M. L., Pacheco, M. G., Salinas, M. C., López-Osuna, M., Lecuona, M., Castro, E. M. y Arellano, J.: Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown E. histolytica. Parasite Immunol. 1985, 7:527.
- 74- Kretschmer, R., Castro, E. M., Arellano, J. y Pacheco, M. G.: In vitro studies on the interaction of human monocytes and the monocyte locomotion inhibitory factor produced by E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 1986, 17 (supl. 1):243-246.
- 75- Kung, Ch. y Saimi, Y.: The physiological basis of taxes in Paramecium. Ann. Rev. Physiol. 1982, 44:519-534.
- 76- Lecuona, M., Pacheco, G., Castro, E. M. y Kretschmer, R.: Estudios in vivo del factor inhibidor de la quimiotaxis producido por E. histolytica. V Congreso Nacional de Inmunología. México D. F., 1983, Resumen 45.
- 77- Long-Krug, S. A. y Ravdin, J. I.: Partial purification of phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica. X seminario sobre amibiasis, México D. F., 1986, Resumen 19.
- 78- López-Osuna, M., Contreras, B. A. y Kretschmer, R.: In vitro interaction of polymorphonuclear leukocytes and Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (supl. 1):247-249.
- 79- MacLean-Fletcher, S. y Pollard, T. D.: Mechanism of action of cytochalasin B on actin. Cell 1980, 20:329-341.
- 80- Malech, H. L., Root, R. K. y Gallin, J. I.: Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. J. Cell Biol. 1977, 75:666-693.

- 81- Marder, S. R., Chenoweth, D. E., Goldstein, I. M. y Perez, H. D.: Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *J. Immunol.* 1985, 134:3325-3331.
- 82- Martin, S. E., Breckenridge, R. T., Rosenfeld, S. I. y Leddy, J. P.: Responses of human platelets to immunologic stimuli: Independent roles for complement and IgG in Zymosan activation. *J. Immunol.* 1978, 120:9-14.
- 83- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. y Chávez de Ramírez, B.: Ultrastructural studies of various Entamoeba strains. En *Memorias de la Conferencia Internacional Sobre Amibiasis*. México D.F., 1976, Ed. B. Sepúlveda y L. S. Diamond, pp 226-237.
- 84- Masur, H., Murray, H. W. y Jones, T. C.: Effect of hydrocortisone on macrophage response to lymphokine. *Infection and Immunity* 1982, 35:709-714.
- 85- McCann, F. V., Cole, J. J., Guyre, P. M. y Russell, J. A. G.: Action potentials in macrophages derived from human monocytes. *Science* 1983, 219:991-993.
- 86- Mc Kay, T. J., Phelan, A. W. y Plummer, T. H.: Comparative studies on human carboxipentidases B and N. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1979, 197:487-492.
- 87- Mease, A. D., Fischer, G. W., Hunter, K. W. y Ruymann, F. B.: Decreased Phytohemagglutinin-induced aggregation and C5a-induced chemotaxis of human newborn neutrophils. *Pediat. Res.* 1980, 14:142-146.
- 88- Mookerjee, B. K. y Jung, Ch. Y.: Effects of cytochalasins on lymphocytes: mechanism of inhibition of rosette formation. *J. Immunol.* 1983, 131:1126-1130.
- 89- Muñoz-Espinoza, L. E. y Salazar-Flores, O. G.: Systemic inflammation in patients with amebic liver abscess: Chemotaxis of polymorphonuclear cells. *Arch. Invest. Méd. (Méx).* 1986, 17 (supl. 1): 313-318.
- 90- Naacache, P. H., Showell, H. J., Becker, E. L. y Sha'afi, R. I.: Transport of sodium, potassium and calcium across rabbit polymorphonuclear leukocyte membranes. Effect of chemotactic factor. *J. Cell Biol.* 1977:428-444.

- 91- Nelson, R. D., Fiegel, V. D. y Simmons, R. L.: Chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils under agarose: morphologic changes associated with the chemotactic response. *J. Immunol.* 1976, 117 (5-parte 1):1676-1683.
- 92- Ogawa, T., Kotani, S., Kusumoto, S. y Shiba, T.: Possible chemotaxis of human monocytes by N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine. *Infection and Immunity* 1983, 39:449-451.
- 93- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., Capin, N. R.: Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1975, 4:127-134.
- 94- Pacheco, G., Vega, E., Lecuona, M., Collado, M. L. y Kretschmer, R.: Caracterización del factor inhibidor de la quimiotaxis producido por E. histolytica. V Congreso Nacional de Inmunología, México, D. F., 1983, Resumen M.
- 95- Papierniak, C. K., Bourey, R. E., Kretschmer, R. R., Gotoff, S. P. y Colombetti, L. G.: Technetium-99m labeling of human monocytes for chemotactic studies. *J. Nucl. Med.* 1976, 17:988-992.
- 96- Pérez-Tamayo, R. y Brandt, H.: Amebiasis. En *Pathology of protozoal and helminthic diseases*. Baltimore (E. U.), 1971, Ed. Marcial-Rojas, R. A./Williams and Wilkins, pp 145.
- 97- Pérez-Tamayo, R., Martínez-Villegas, J. E. y Pérez-Montfort, R.: Efecto de la inmunidad celular en la interacción entre célula peritoneal y amiba in vitro. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1986, 17 (supl. 1):259-267.
- 98- Perrín, T. G.: Citocinesis e irritabilidad celular. En *Manual de Histología Normal Humana*. Buenos Aires (Arg.), 1947, Ed. Espasa-Calpe, pp 99-118.
- 99- Pick, E., Honig, S., Griffel, B. y Grunspan-Swirsky, A.: Does migration inhibitory factor (MIF) act by promoting tubulin polymerization. *Cell. Immunol.* 1976, 27:339.
- 100- Pike, M. C., Kredich, N. M. y Snyderman, R.: Requirement of S-adenosyl-L-methionine-mediated methylation for human monocyte chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, 75:3928-3932.

- 101- Pike, M. C. Kredich, N. M. y Snyderman, R.: Influence of cytoskeletal assembly on phosphatidylcholine synthesis in intact phagocytic cells. *Cell* 1980, 20:373-379.
- 102- Pike, M. C. y Snyderman, R.: Chemoattractant-receptor interactions in leukocytes. *Advances in Inflammation Research* 1982, 4:109-130.
- 103- Pollard, T. D.: The role of actin in the temperature-dependent gelation and contraction of extracts of Acanthamoeba. *J. Cell Bio.* 1976, 68:579-601.
- 104- Plummer, T. H. y Hurwitz, M. Y.: Human plasma carboxipeptidase N, isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 1978, 253:3907-3912.
- 105- Ramos-Martínez, E., Martínez-Madrigal, F., Velasco-Aviles, F., Flores-Barroeta, F. y Aguirre-García, J.: Amibiasis: Estudio comparativo de dos grupos de 5000 necropsias del Hospital General "Dr. Bernardo Sepúlveda G." del Centro Médico Nacional. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 1986, 17 (supl. 1):351-357.
- 106- Ravdin, J. I., Croft, B. Y. y Guerrant, R. L.: Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 1980, 152:377-390.
- 107- Ravdin, J. I. y Guerrant, R. L.: A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Reviews of Infectious Diseases* 1982, 4:1185-1207.
- 108- Reaven, E. P., Cheng, Y. y Miller, M. D.: Quantitative analysis of tubulin and microtubule compartments in isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 1977, 75:731-742.
- 109- Rhodes, J. M.: Measurement of chemotaxis in Boyden chamber filter assays. Is the checkerboard correction valid? *J. Immunol. Methods* 1982, 49:235-236.
- 110- Rinehart, J. J., Balcerzak, S. P., Sagone, A. L. y LoBuglio, A. F.: Effects of corticosteroids on human monocyte function. *J. Clin. Invest.* 1974, 54:1337-1343.

- 111- Rocklin, R. E.: Mediators of cellular immunity. En Basic & clinical immunology. Canada, 1976, Ed. Fudenberg, H. H./ Lange Medical Publications, pp 102-113.
- 112- Rojkind, M. y Ponce-Noyola P.: The extracellular matrix of the liver. Coll. Relat. Res. 1982, 2:151.
- 113- Rosenbaum, R. M. y Wittner, M.: Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. J. Cell Biol. 1970, 45:367-382.
- 114- Samuelsson, B.: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science 1983, 220: 568-575.
- 115- Sattilaro, R. F., Dentler, W. L. y LeCluyse, E. L.: Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. J. Cell Biol. 1981, 90:467-473.
- 116- Schiffmann, E.: Leukocyte chemotaxis. Ann. Rev. Physiol. 1982, 44:553-568.
- 117- Schliwa, M. y van Blerkom, J.: Structural interaction of cytoskeletal components. J. Cell Biol. 1981, 90:222-235.
- 118- Sell, S.: Cell mediated immunity in vitro. En Immunology, Immunopathology and Immunity. 3^a. Maryland (E. U.), 1980, Ed. Harper & Row, Publishers, pp 144-171.
- 119- Sepúlveda, B.: Amoeba: Companion or killer? World Health 1984, --4-7.
- 120- Showell, H. J., Freer, R. J., Zigmond, S. H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B. y Becker, E. L.: The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. J. Exp. Med. 1976, 143:1154-1169.
- 121- Snyderman, R. y Goetzl, E. J.: Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. Science 1981, 213:830-837.
- 122- Sodërling, E. y Knuuttila, M.: Release of chloride dependent arginine aminopeptidase from PMN leukocytes and macrophages during phagocytosis. Life Sciences 1980, 26:303-312.

- 123- Solís, F. J., Chávez, B. y Orozco, E.: Fases de la división nuclear en Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (supl. 1):95-99.
- 124- Stevenson, M. M., Rees, J. C. y Meltzer, M. S.: Macrophage function in tumor-bearing mice: Evidence for lactic dehydrogenase-elevating virus-associated changes. J. Immunol. 1980, 124:2892-2899.
- 125- Stevenson, R. D.: Hydrocortisone and the migration of human leukocytes: An indirect effect mediated by mononuclear cells. Clin. Exp. Immunol. 1973, 14:417-426.
- 126- Trissl, D.: Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Reviews of Infectious Diseases 1982, 4:1154-1184.
- 127- Trissl, D., Müller, R., Ries, R. y Rathmann, M.: Antisurface antibodies to Entamoeba histolytica and their role in complement lysis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (supl. 1): 203-208.
- 128- Vallee, R. B.: A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs). J. Cell Biol. 1982, 92:435-442.
- 129- Vega, E.: Locomoción de leucocitos en pacientes con síndrome de Turner. Tesis de Maestría en Biología experimental, Univ. Autónoma Metropolitana, México D. F., 1984.
- 130- Walsh, J. A.: Amebiasis in the world. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (supl. 1):385-389.
- 131- Ward, P. A.: Chemotaxis of mononuclear cells. J. Exp. Med. 1968, 128:1201-1221.
- 132- Weibel, E. R., Stäubli, W., Gnägi, H. R. y Hess, F. A.: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. J. Cell Biol. 1969, 42:68-91.
- 133- Welch, T. M.: Parasitic Diseases. En. Basic & clinical immunology. Canada, 1976, Ed. Fudenberg, H. H./Lange Medical Publications, pp 587-595.

- 134- Werb, Z., Foley, R. Munck, A.: Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 1978, 147:1684-1694.
- 135- Werb, Z.: Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture. *J. Exp. Med.* 1978, 1695-1712.
- 136- Wilkinson, P. C.: Chemotaxis and inflammation. Edinburgh, G. B., 1982, Ed. Churchill Livingstone, pp 1.
- 137- Wilson, L.: Action of drugs on microtubules. *Life Sciences* 1975, 17:303-310.
- 138- Zakhireh, B. y Malech, H. L.: The effect of colchicine and vinblastine on the chemotactic response of human monocytes. *J. Immunol.* 1980, 125:2143-2153.
- 139- Zigmond, S. H. y Hirsh, J. G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis; new methods for evaluation and demonstration of a cell derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 1973, 137:387-410.
- 140- Zigmond, S. H.: Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J. Cell Biol.* 1977, 75:606-616.
- 141- Zigmond, S. H.: Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 1978, 77:269-287.
- 142- Zor, U.: Role of cytoskeletal organization in the regulation of adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate by hormones. *Endocrine Reviews* 1983, 4:1-21.