

11281

7

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

*Efecto del zinc sobre la
patogenicidad de
Entamoeba histolytica.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS:

INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

GLORIA BERTHA VEGA ROBLEDO

MEXICO, D. F. FALLA DE ORIGEN 1995

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo contó con la colaboración y el apoyo del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, dirigido por el Dr. Librado Ortiz Ortiz.

Para la realización de los estudios de inmunofluorescencia con el apoyo del Departamento de Microscopía Electrónica y del Laboratorio del Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, encabezado por la Dra. María de Lourdes Muñoz, con la contribución de la Q. Rosalinda Tovar.

Al Dr. Jorge Larriva y al Q. Ismael Ramírez Jiménez del Instituto Nacional de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán" y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, respectivamente, por la asistencia para la preparación e interpretación de los estudios de anatomía patológica.

Por el apoyo técnico, al Biólogo Angel Oliva, al Q. Julio César Carrero y al Biólogo Antonio Ramírez del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Por la colaboración en la ilustración de este trabajo a los señores José Aviles y Enrique Vázquez del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCION	9
Adherencia	9
Citolisis y alteración de la respuesta inmune	11
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	20
General	20
Particulares	20
MATERIAL Y METODOS	21
Cultivo de <u>E. histolytica</u>	21
Determinación de la viabilidad y la proliferación amibianas	21
Estudio de la adherencia amibiana a monocapas de células MDCK	22
Electroforesis de proteínas	23
Efecto del zinc sobre la actina y la tubulina de <u>E. histolytica</u>	24
Inmunoelectrotransferencia	24
Inmunofluorescencia	24
Animales experimentales	25
Serología	27
Análisis estadístico	28

RESULTADOS	29
<u>In vitro</u>	29
Efecto del zinc sobre la viabilidad de los trofozoitos de <u>E. histolytica</u>	29
Efecto del zinc sobre la proliferación de trofozoitos de <u>E. histolytica</u>	30
Efecto del zinc sobre la adherencia amibiana	30
Estudio electroforético e inmunoelectrotransferencia de trofozoitos de <u>E. histolytica</u> tratados con zinc	31
Estudio por inmunofluorescencia de los trofozoitos tratados con zinc	31
<u>In vivo</u>	32
Efecto del zinc sobre la inducción del absceso hepático amibiano en hámster	32
Anatomía patológica	33
Efecto del zinc sobre la respuesta humoral de hámsters inoculados intrahepáticamente con <u>E. histolytica</u>	34
 FIGURAS Y TABLAS	 10, 14, 26, 35 - 48
 DISCUSION	 49
Posibles mecanismos de acción del zinc sobre los trofozoitos de <u>E. histolytica</u>	49
Inactivación del parásito	54
Inducción de la inmunidad en el huésped	55
Disminución de prostaglandinas y producción de citocinas	55
Activación celular	56
Protección de la célula blanco	58
Interferencia con el ión calcio	58
Estabilización de membranas	59
 BIBLIOGRAFIA	 61

RESUMEN

Se ha descrito que el zinc, en algunos sistemas, afecta a proteínas del citoesqueleto y antagoniza con el calcio. Si estos factores, vitales para la actividad de *E. histolytica* se alteran, su patogenicidad podría modificarse, lo que nos indujo a estudiar el efecto del zinc directamente sobre algunas funciones del parásito y posteriormente, en el desarrollo del absceso hepático, en un modelo experimental.

Para el cultivo de los trofozoítos se utilizó medio TYI-S-33 sin zinc o suplementado con el metal (.001 - 10.0 mM). La viabilidad, replicación y adherencia del parásito a células epiteliales, se evaluaron utilizando las siguientes técnicas: observación microscópica de trofozoítos teñidos con azul tripano, incorporación de timidina (3H) y ensayos inmunoenzimáticos.

Los resultados obtenidos muestran que el zinc a 10 mM fue letal para las amibas. Al utilizarlo a 1.0 mM la viabilidad fue normal, sin embargo, disminuyeron su replicación y adherencia ($p < .001$) la que permaneció alterada con 0.01 mM del metal ($p < .01$).

En el estudio electroforético, las proteínas de los trofozoítos normales y de los tratados con zinc, fueron similares. Sin embargo, la fluorescencia obtenida mediante el reconocimiento de anticuerpos anti-tubulina, se manifestó en aproximadamente el 30% de los trofozoítos normales y en el 70% de los tratados con el metal. En estos últimos, la distribución de la fluorescencia fue de mayor intensidad o de localización más periférica que la de los controles sin tratar, en donde la distribución individual fue más uniforme.

En el modelo de absceso hepático experimental en hámsters, se observó que la administración intraperitoneal de una dosis de zinc, 48 horas después de la inoculación intrahepática de los trofozoitos amibianos, inhibió significativamente ($p < .001$) el desarrollo del absceso.

Resulta evidente el efecto nocivo que el zinc ejerce en la funcionalidad de la amiba *in vitro*. Sin embargo, para conocer la injerencia real del metal sobre la respuesta inmunitaria del hospedero se requiere de estudios más profundos, por lo que sólo se puede plantear su mecanismo de acción a través de algunos de sus efectos ya conocidos, como son: su antagonismo con el calcio, la inhibición de prostaglandinas y principalmente, la estimulación de los linfocitos T cooperadores.

ABSTRACT

In some systems, zinc has been described to affect cytoskeleton proteins and to antagonize with calcium. If these factors, vital to *E. histolytica* activity, are altered, its pathogenicity could be modified. This hypothesis lead us to study the effect of zinc directly on some parasite functions and later on the development of liver abscess in an experimental model.

Trophozoites were cultured in TYI-S-33 culture medium supplemented with zinc (0.001 - 10.0 mM). Viability, replication and adherence of the parasite to epithelial cells were assessed with the following techniques: microscopic observation of trophozoites stained with trypan blue, (3H) thymidine incorporation and inmunoenzymatic assays.

Results show that 10 mM zinc was lethal for ameba. The 0.1 mM concentration allowed normal viability, however, replication and adherence were diminished ($p < 0.001$) and remained altered at 0.01 mM zinc concentration ($p < 0.01$).

The electrophoretic study revealed that the proteins of normal trophozoites and zinc-treated trophozoites were similar. However, fluorescence by anti-tubuline antibody recognition was obtained for 30 % of normal and by 70 % of treated trophozoites. In the latter, fluorescence distribution was of greater intensity and located more peripherically than in untreated controls where distribution showed more uniformity.

the experimental hamster model of liver abscess revealed that intraperitoneal administration of a single zinc dosis, 48 h after intrahepatic inoculation of amebic trophozoites, significantly inhibited ($p < 0.001$) abscess development.

The noxious effect of zinc on the functionality of amebas *in vitro* is quite evident. Nevertheless, a more profound knowledge of the real effect of the metal on the host immune response requires further studies. Therefore, at present, we can only suggest the underlying mechanism of action through some of its known effects which are calcium antagonism, prostaglandin inhibition and, more importantly, simulation of cooperative T-lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica, es un protozooario ampliamente diseminado que prevalece en aquellos países con problemas socioeconómicos, los que generan en su población hábitos higiénico-dietéticos óptimos para el desarrollo de las enfermedades parasitarias. Durante el proceso invasivo, la amiba utiliza mecanismos certeros y complejos (Fig.1) que actúan de manera directa, y/o a través de el aumento o la disminución de la actividad celular normal del hospedero, de tal forma, que se permita el establecimiento del parásito y la consecuente lesión tisular. De los mecanismos invasores del parásito, la adherencia, resulta fundamental para el desarrollo de la enfermedad.

Adherencia

La adherencia amibiana, mediada entre otras moléculas por la lectina N-acetil-D-galactosamina, va seguida de cambios moleculares importantes. Después del contacto de la célula blanco con la amiba y antes de que el parásito la destruya, el calcio aumenta irreversible y notablemente en esta célula. En tanto que en el parásito, el catión aumenta sólo discretamente (1-2).

El fenómeno descrito, no se observa en la célula blanco en presencia de galactosa o de glicoproteínas que portan este carbohidrato en su porción terminal. Así, se ha visto que moléculas como la asialofetulina o la asialo-orosomucoide, inhiben la adherencia amibiana (3).

ACTIVIDAD CITOLICA AMIBIANA

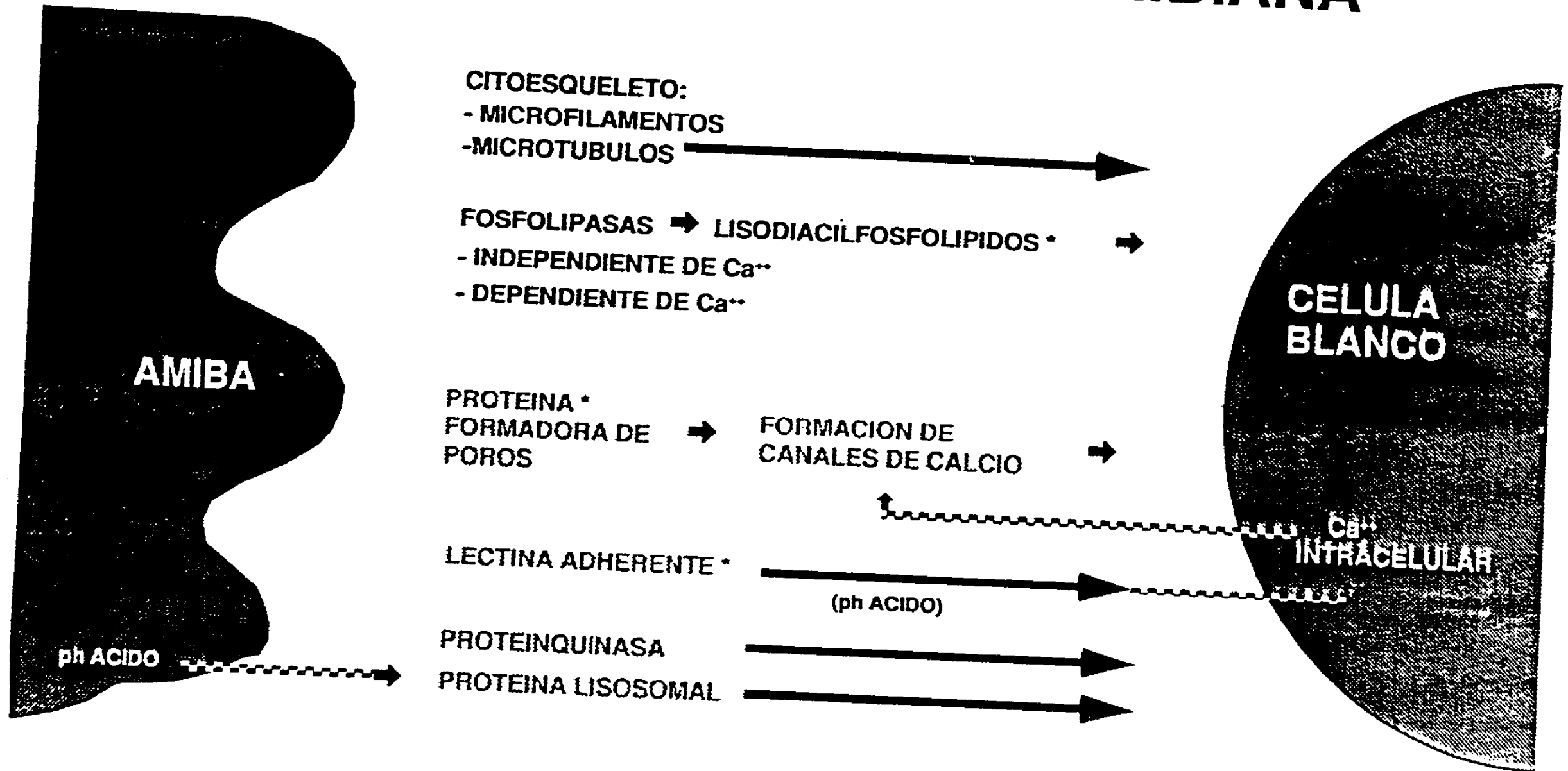


Figura 1. Representación esquemática de algunos de los mecanismos que utiliza la amiba en la progresión del evento citolítico

FALLA DE ORIGEN

La adherencia del parásito a la célula blanco, depende también de la capacidad de reconocimiento que obtiene a través de sus receptores. Los microfilamentos de E. histolytica son los responsables del movimiento de los trofozoítos y de la expresión de receptores en la membrana citoplásmica, al respecto, se ha observado que, alteraciones de los microfilamentos producen variaciones en los receptores para fibronectina (4), a través de la cual el parásito se une a los tejidos.

Citolisis y alteraciones de la respuesta inmune

Existen evidencias de que los microtúbulos, en las células asesinas naturales (NK), intervienen tanto en su fase destructiva como en el movimiento, la forma, la endo y la exocitosis (5). Estas estructuras, se han detectado en trofozoítos de E. histolytica en división (6).

La citolisis de la célula blanco adherida a E. histolytica (Fig.1), depende de las lectinas adherentes y de la integridad del citoesqueleto, lográndose la culminación del proceso con la participación activa de otros elementos esenciales, como son: las enzimas, las proteínas lisosomales, el amebaporo y el calcio (7).

La fosfolipasa A al hidrolizar diacil-fosfolípidos, genera liso-monoacil fosfolípidos, los cuales son tóxicos para las membranas celulares. Los trofozoítos amibianos contienen dos fosfolipasas, una dependiente del calcio con actividad óptima a pH 8.5 y otra independiente del catión y con actividad máxima a pH 4.5.

Otras enzimas amibianas que participan en la muerte de la célula son: las colagenasas, capaces de digerir colágena I y III; la proteína cinasa C; las cisteína proteasas, que son las más abundantes en el parásito y tienen como sustratos a: colágena I, IV y V, laminina, fibronectina, azocaseína y hemoglobina; la

neuraminidasa, que al degradar a la mucina puede liberar al medio ácido n-acetil neuramínico (8).

El amebaporo, polipéptido formador de canales, es probablemente responsable de la citolisis por contacto producida por la amiba. Este efecto, se logra mediante la inserción de canales derivados del parásito dentro de la bicapa lipídica de la membrana celular del huésped, con la inducción de cambios en la conductividad iónica (9).

El calcio, que actúa como cofactor en la unión de la fosfolipasa a la membrana de la célula blanco, también se requiere para el movimiento de los microfilamentos y en la formación de los canales celulares (9); asimismo, el calcio al unirse a la calmodulina regula la secreción de la colagenasa. Por otro lado, se ha observado que los antagonistas del calcio pueden inhibir la exocitosis de las enzimas de la vesícula amibiana (10), lo cual apoya la importancia de este elemento en la progresión del evento citolítico. El calcio es esencial para el metabolismo celular, pero el aumento que el parásito induce en la célula blanco tiene un efecto deletéreo (1). El ión inicialmente, podría estimular algunas funciones celulares, las que posteriormente y debido a la redistribución y/o al aumento del calcio libre intracelular se alterarían. Así, por cambios en la permeabilidad de la membrana se modifican: su fluidez, actividades enzimáticas y receptores membranales. Un cambio en estos últimos podría generar un estímulo adicional o diferente, para que la cantidad y el tipo de sustancias que libera la célula no sean los normales. En algunas células, entre ellas los macrófagos, el calcio asociado a la calmodulina actúa sobre microfilamentos, los que al movilizarse originan la extrusión de los gránulos y su contenido. Esto posiblemente varíe, si como respuesta a un cambio en las señales generadas por la membrana, la acción que ejerce el complejo calmodulina-calcio es más intensa o más selectiva.

La amiba en su trayecto invasor utiliza mecanismos potentes y muy versátiles, que interaccionan constantemente y se sinergizan para lograr su cometido. Unos, agreden y destruyen a los tejidos del hospedero para lograr su penetración (1,4). Otros, alteran diferentes fases de la respuesta inmune (10 - 12). Sin embargo, desde el inicio del proceso su interacción es de tal magnitud que impide describirlos separadamente. Entre los primeros tendríamos a los efectos ya descritos y que se inducen a través de las fosfolipasas, el amebaporo, la colagenasa, la neuraminidasa y las cistein-proteasas (1, 2, 7, 8, 13); asociados a estos, se encuentran también los cambios que genera al unirse a la fibronectina.

Se han detectado en el parásito dos receptores de superficie específicos para fibronectina, cuyos pesos moleculares (PM) corresponden a 37 y 140 kDa respectivamente (4, 14). Esta unión promueve cambios en el citoesqueleto y liberación de proteasas amibianas; la subsecuente degradación de componentes de la matriz extracelular facilita su invasión tisular.

La fibronectina, además de favorecer la adhesión de los linfocitos T a través de sus receptores CD4, dá una señal coestimuladora para que la proliferación de estas células se efectúe. La amiba al unirse a la fibronectina es capaz de degradarla, lo que podría traer como consecuencia una alteración en la proliferación de los linfocitos T. Los fragmentos de fibronectina degradada, ejercen una acción quimiotáctica sobre los monocitos; a su vez la amiba, inhibe la locomoción de estas células (15) y genera en ellas una respuesta diferente a la normal. Así, la amiba induce a los monocitos a liberar cantidades elevadas de prostaglandinas (PGE₂) y leucotrienos (LTB₄ y LTC₄), probablemente, por alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico (16) (Fig.1a).

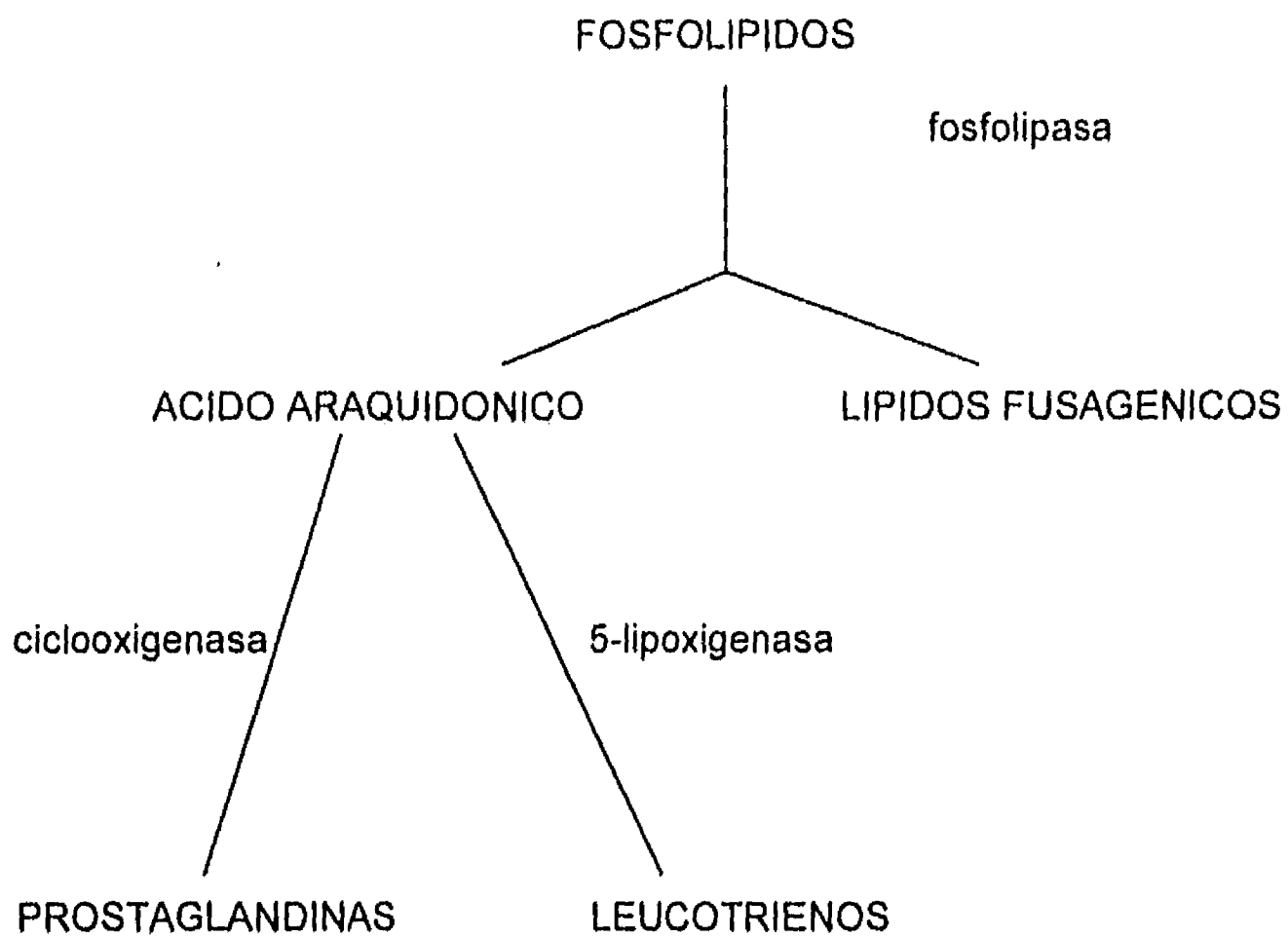


Figura 1a. Representación esquemática de las vías metabólicas principales, que puede seguir el ácido araquidónico al ser liberado de los fosfolípidos de la membrana celular.

La preexposición de macrófagos, neutrófilos y monocitos a LTB₄, aumenta su estallido respiratorio (16). Este aumento se ha observado al inicio de la invasión amibiana (17) y podría contribuir a la necrosis y a la formación del granuloma, en estas etapas tempranas de la inflamación

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es un potente vasodilatador, que al aumentar el flujo sanguíneo favorecería aun más la llegada de células al sitio de la invasión. Esta prostaglandina controla el transporte de iones y se ha visto que, en el hígado de rata, los eicosanoides (PG) inducen una redistribución intracelular del calcio (18). El exceso de PGs aumenta el AMPc intracitoplásmico, a lo que también contribuyen la CaATPasa y el factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) (15).

Al aumentar el AMPc en macrófagos disminuye el GMP. Esto impide la formación del fagolisosoma, debido a que los microtúbulos que participan en ella requieren del GMP para su movimiento; consecuentemente, se inhibe el "estallido respiratorio" (11, 15) y el mecanismo de fagocitosis se torna rápidamente ineficiente en contra de la amiba.

Los lípidos y los eicosanoides intervienen en la regulación de las citocinas (19). Normalmente, en los macrófagos, la Interleucina 1 (IL-1) al encontrarse en cantidades muy elevadas induce la liberación de PGE₂, la que a su vez frena la producción de esta citocina (19). Es posible que la amiba al inducir cantidades tan elevadas de esta prostaglandina, inhiba de igual manera la producción de IL-1.

En gerbos con amibiasis, se ha detectado una disminución en la cantidad y en la actividad de la IL-1 secretada por el macrófago (11). En estudios realizados en células mononucleares humanas *in vitro* (19), se ha visto que algunos ácidos grasos (eicosapentanoico) y la PGE₂ inhiben la producción de la IL-1 y del factor de necrosis tumoral (FNT) respectivamente. Esta inhibición se atribuye al aumento

del AMPc, nucleótido postulado como un segundo mensajero en la regulación de la región llamada respondedora al AMPc, la que ha sido identificada en la región 5' no traducida del gen del FNT (20).

La interleucina 2 (IL-2) induce receptores para transferrina en la superficie de los linfocitos T cooperadores (Th) y, a través de estos receptores, penetran en ellos el fierro y el zinc requeridos para la proliferación celular. La IL-2, también es responsable de la activación de las células asesinas naturales (LAK) (21). Recientemente se observó que la producción *in vitro* de IL-2 humana, se inhibe en cultivos de linfocitos que contienen más del 10 % de macrófagos (22); lo que se atribuyó a las células T supresoras, generadas en respuesta a la PGE2 derivada de los macrófagos (22). En pacientes con absceso hepático amibiano hay una disminución de células T cooperadoras y un aumento en las células T supresoras (10). El efecto de las células T supresoras aunado a la disminución de IL-1 y al aumento de PGE2, podría disminuir la secreción de IL-2 en la amibiiasis invasora. Por otro lado, se ha descrito una falla en la síntesis de IL-2 como causa de anergia de células T antígeno-específicas (23); ésto podría explicar lo observado en pacientes con absceso hepático amibiano, en quienes durante la fase aguda y antes del tratamiento, hay anergia específica para el antígeno amibiano (24). De igual manera, en la amibiiasis intestinal experimental se presenta una disminución en los niveles de IL-2 (Ghosh, Castellanos, Ortiz, manuscrito en preparación).

En algunos estudios se ha observado que la amiba activa al complemento (25) y también, que el parásito es capaz de evadir su acción (12). La proteína de membrana celular CD59 o MIRL (inhibidor membranal de la lisis reactiva) que se encuentra en linfocitos, monocitos, neutrófilos, plaquetas, células epiteliales y endoteliales, bloquea la unión de C8 - C9. La similitud que existe entre las secuencias de CD59 y la proteína amibiana de 170 kDa, origina entre ellas una reacción cruzada, que inhibe la lisis de la amiba por el complemento (12).

La célula B, transformada, produce anticuerpos contra el protozoo. Durante el tiempo requerido para que los anticuerpos sean sintetizados, la invasión amibiana progresa favorecida por la disfunción de algunos mecanismos inmunológicos mencionados con anterioridad; de tal manera que al hacer su aparición los anticuerpos, resultan ineficaces para controlar el proceso. Al respecto, se han mencionado como mecanismos de evasión: al desprendimiento de porciones de la membrana a cuyos antígenos se han unido ya los anticuerpos y a la exposición de antígenos nuevos en la superficie de la amiba (26-27).

La actividad citolítica amibiana, se inhibe con algunas sustancias que actúan en diferentes fases del proceso. Así, se han descrito inhibidores de la fosfolipasa dependiente del calcio (hidrocortisona, quinacrina) (28-29)); inhibidores de proteína cinasa (esfingosina) (1); inhibidores de proteína lisosomal (citocalasina B y D) (30); antagonistas intracelulares del calcio (TMB-8) (29); antagonistas de calmodulina amibiana (bepridil) (31-32) y bloqueadores de canales de calcio en la célula blanco (verapamil) (30).

El zinc, es un elemento que interviene en varias funciones de nuestro organismo, algunas de ellas tan importantes como lo son: el crecimiento, la fertilidad, la visión nocturna, la cicatrización y la inmunidad (33 - 37). En relación con el último punto, que se abordará ampliamente en la discusión, mencionaremos que en los pacientes con deficiencia de zinc, se han detectado alteraciones inmunológicas principalmente a nivel celular como son: linfocitopenia T, anergia cutánea e inactivación de la timulina (factor tímico sérico), así como disminución en la producción de linfocinas y en la actividad de las células asesinas naturales (35 - 37).

El metal participa activamente en numerosos procesos metabólicos que incluyen la síntesis de DNA, RNA y proteínas (38). Estabiliza la estructura de numerosas proteínas, en algunas de las cuales se han identificado sitios específicos de interacción proteína-metal (39). En el citoesqueleto, ejerce un efecto directo sobre los microfilamentos (40) y en la polimerización de la tubulina (39 - 41). Atribuyéndose también a este metal, la capacidad de inhibir en forma competitiva algunos efectos del calcio (42-44).

HIPOTESIS

Si el zinc logra interferir con la actividad del calcio y/o alterar la estructura del citoesqueleto de *E. histolytica*, probablemente afecte la capacidad de adhesión, el efecto citolítico y en consecuencia, la patogenicidad del parásito.

OBJETIVOS

General

Este cuestionamiento, y la expectativa de poder participar en la búsqueda de nuevos elementos que coadyuven en la lucha contra la amibiasis, motivaron la realización de este estudio. En él, los elementos analizados tuvieron como objetivo principal, el de poder determinar el efecto del zinc sobre la funcionalidad de la amiba in vitro y posteriormente, en el desarrollo del absceso hepático in vivo.

Particulares

I. In vitro. Determinar el efecto que el zinc ejerce sobre la viabilidad, la replicación y la adherencia de los trofozoitos amibianos.

II. In vivo. Observar el efecto de la administración intraperitoneal de zinc, en el modelo experimental de absceso hepático amibiano en hámsters.

MATERIAL Y METODOS

Cultivo de E. histolytica

Los trofozoítos de la cepa patógena HM1:IMSS, fueron cultivados a 37 °C en medio axénico TYI-S-33 suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml), según el método de Diamond (45).

Determinación de la viabilidad y la proliferación amibianas.

Viabilidad

Los trofozoítos se incubaron en medio de cultivo normal (1×10^5 amibas/10 ml de medio de cultivo a 37 °C) ó suplementado con zinc ($ZnCl_2$, $ZnAc$ o $ZnSO_4$) a diferentes concentraciones (0.01 - 10 mM). Con el objeto de analizar el efecto del metal sobre la viabilidad y la proliferación de los trofozoítos, se realizó la observación microscópica y el recuento en una cámara de Neubauer con la técnica de exclusión con azul tripano, a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo (n=30). Los trofozoítos colocados en medio de cultivo con 5.0 y 10.0 mM de zinc, se observaron a 0.5, 1.0 y 24 horas, o bien, se lavaron con PBS (0.15 M y pH 7.4) después de haber permanecido 30 minutos en contacto con el metal. Posteriormente se incubaron en medio de cultivo normal, durante los tiempos antes señalados, con el objeto de estudiar la reversibilidad del proceso.

Proliferación

La determinación de la proliferación amibiana se midió por medio de la incorporación de (³H) timidina. Los trofozoítos ajustados a 1×10^5 /10 ml de medio de cultivo normal o suplementado con zinc (0.001-1.0), se colocaron en tubos de vidrio con tapa de rosca y se incubaron a 37 °C durante 24, 48 y 72 horas; todos los cultivos se realizaron por triplicado. Dieciocho horas antes de la cosecha, se marcaron con 10 µCi de (³H) timidina con alta actividad específica (Amersham, 25 Ci/mmol). Los trofozoítos se cosecharon por enfriamiento (4 °C) y centrifugación a 150 g por cinco minutos, se lavaron y centrifugaron tres veces y el botón celular resuspendido en PBS 0.15 M y pH 7.4, se colocó en placas de plástico de 96 pozos. Las muestras se procesaron en un cosechador (modelo Brandel 24 V) y la incorporación de (³H) timidina se determinó en un contador de centelleo (Packard Tri-carb) a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Los resultados se expresaron como el promedio de cuentas por minuto (cpm) ± el error estándar.

Estudio de la adherencia amibiana a monocapas de células MDCK.

Los trofozoítos amibianos normales o preincubados con zinc (0.001 - 1.0 mM) durante 72 horas, fueron estudiados mediante un microensayo desarrollado en nuestro laboratorio. El método está basado en la técnica de ELISA y en él se utiliza un anticuerpo monoclonal (C29) dirigido contra una de las moléculas de superficie de *E. histolytica* (46). Las condiciones óptimas para la adherencia de la amiba a la monocapa de células MDCK (obtenidas en placas de cultivo de 96 micropozos con 50,000 células en cada uno de ellos), se obtuvieron con: 50,000 amibas por micropozo (200 µl) en PBS 2.0 mM y pH 5.7, coincubación durante 15 minutos a 37 °C y agitación a 75 rpm; los ensayos se realizaron por triplicado. Los

trofozoítos adheridos a las células fueron fijados con glutaraldehído 0.25% en NaCl 0.15 M, a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon con 200 µl de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron con Tween 20 0.05% y BSA 1% en PBS a pH 7.4 (T-BSA-PBS). A continuación se agregaron a la placa 50 µl del anticuerpo monoclonal biotinilado (C29) anti *E. histolytica*, diluido 1:400 y se incubó durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron de la manera antes señalada. Se agregó un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (1:2,000) y se incubó a 37 °C durante una hora; la preparación se lavó nuevamente y por último, se utilizó o-fenilendiamina como sustrato. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5 N y la densidad óptica (DO) se midió a 490 nm en un lector ELISA-Processor (Marburg, Germany). Se encontró una relación directa entre el número de amibas unidas a las células MDCK y la DO a 490 nm.

Electroforesis de proteínas.

Los trofozoítos amibianos fueron cultivados en medio TYI-S-33 sólo ó con zinc a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 mM. La cosecha se realizó a las 72 horas por enfriamiento (4 °C) y se centrifugaron a 150 g por cinco minutos; se lavaron tres veces con PBS 0.14 M y pH 7.4 y se contaron en una cámara de Neubauer. Las muestras ajustadas a 20,000 trofozoítos/ml, se lisaron por ciclos de enfriamiento y calentamiento en presencia de para-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM y de para-hidroxi-mercuri-benzoato (PHMB) 2 mM. Los lisados amibianos (20,000 amibas/carril) se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % bajo condiciones reductoras y se tiñeron con azul de Coomassie (47).

Efecto del zinc sobre la actina y la tubulina de *E. histolytica*.

Inmunoelectrotransferencia

Los trofozoítos amibianos normales y tratados con zinc (1.0 mM, 72 h) fueron lisados por enfriamiento y calentamiento en presencia de PMSF y PHMB 2 mM y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10 % bajo condiciones reductoras y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Tiras de nitrocelulosa de 3 mm de ancho transferidas con el antígeno amibiano tratado o no tratado con zinc, se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-actina cadena ligera Kappa de IgG1 murino (ICN Immunobiologicals, Costa Mesa CA) diluido 1:400 en PBS-BSA 1 %; a continuación se lavaron tres veces con amortiguador PBS-tween y se agitaron durante 15 minutos. Las tiras tratadas con el anticuerpo anti-actina, ya lavadas, se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG1 de ratón (Zimed Laboratories Inc., San Francisco). Posteriormente se lavaron en la forma ya descrita y finalmente se reveló la reacción con diaminobenzidina como sustrato (48).

Inmunofluorescencia

Los trofozoítos amibianos, después de permanecer 24 horas a 37°C en medio de cultivo normal o suplementado con zinc (1.0 mM), se lavaron con PBS (0.15 M, pH 7.4) y se fijaron con una solución de formaldehído al 1.85% + glutaraldehído al 0.025% en PBS 0.15 M. A continuación se lavaron tres veces con la solución antes señalada y se centrifugaron a 150 g durante tres minutos, cada vez. Este procedimiento de lavado se repitió, después de transcurrido el tiempo señalado para su permanencia con cada uno de los siguientes compuestos: PBS-tritón 0.05% (15 minutos); azul de Evans 0.002% (15 minutos); glicina 1M (30 minutos);

anticuerpo anti-tubulina de ratón 1:10, Amersham (toda la noche a 4 °C); anticuerpo biotinilado de conejo anti-ratón 1:200 (dos horas); isotiocianato de fluoresceína-estreptoavidina 1:500 (dos horas) y finalmente, los trofozoítos se resuspendieron en glicerol al 50% para su observación al microscopio de fluorescencia (Zeiss).

Animales experimentales.

Después de realizar una serie de ensayos, que implicaron variaciones tanto en las cifras del inóculo como en la cantidad y la frecuencia de las dosis del zinc administradas a los animales, definimos los parámetros a seguir en los experimentos descritos a continuación. En estos experimentos se utilizaron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) del sexo femenino, con 65 ± 5 g de peso y de 7 a 8 semanas de edad (Fig.2); los animales se dividieron en seis grupos, tres de los cuales fungieron como controles. Los integrantes de los tres grupos restantes, fueron inoculados intrahepáticamente con 1.5×10^6 trofozoítos viables de *E. histolytica* (HM1-IMSS) de 72 horas de desarrollo, resuspendidos en 0.15 ml de medio de cultivo. La técnica utilizada para la inoculación fue la siguiente: los animales se anestesiaron por vía intramuscular en la cara externa del muslo, con 9.4 g de pentobarbital sódico (Anestesall, Smith-Kline & French, México) por 100 g de peso corporal. Bajo condiciones asépticas se practicó una incisión longitudinal en el abdomen y una vez expuesto el órgano hepático se le administró el inóculo con una jeringa de insulina. La incisión se cerró con grapas quirúrgicas. El zinc se administró intraperitonealmente a razón de 4 mg/kg de peso/ día, utilizando el siguiente esquema: a) 11 dosis - tres previas al reto amibiano y ocho posteriores al mismo (17 animales); b) 1 dosis - se administró 48 horas después del reto amibiano (10 animales), y c) grupo control - inoculado con *E. histolytica*, y al cual no se le administró zinc (17 animales).

DISEÑO EXPERIMENTAL

FALLA DE ORIGEN

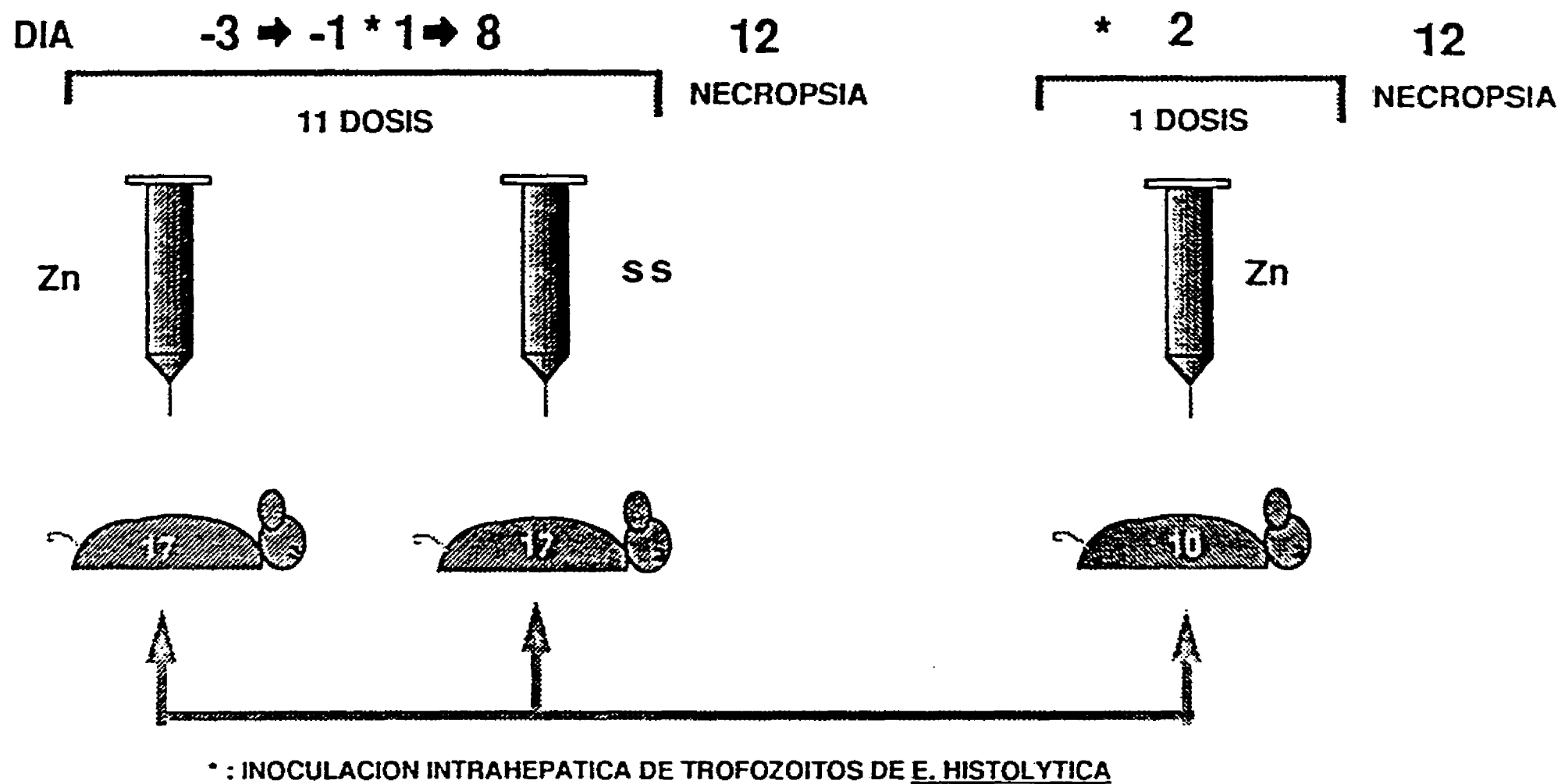


Figura 2

Los integrantes de los otros tres grupos que no fueron inoculados con *E. histolytica*, fungieron como controles sanos y se clasificaron de la siguiente manera: a) grupo control que recibió 11 dosis de zinc (seis animales); b) grupo control que recibió una dosis de zinc (seis animales); c) grupo control normal, al que no se le administró zinc (seis animales).

Los animales fueron sacrificados doce días después del reto amibiano y de cada uno se obtuvo sangre, mediante punción cardíaca, para la determinación de anticuerpos anti *E. histolytica*. Los hígados se extrajeron y se determinó la relación porcentual del tamaño del absceso con el resto del tejido sano. Fragmentos representativos de las lesiones se fijaron con formaldehído al 10% en PBS, se hicieron cortes del tejido hepático incluido en parafina y se tiñeron con eosina y plata-metenamina (Gomori-Grocott) para su estudio histopatológico.

Serología.

Se utilizaron pruebas de ELISA para cuantificar anticuerpos anti-amiba. Los pozos de las microplacas con los lisados de los trofozoítos amibianos (20 µg/ml), se incubaron toda la noche a 4 °C. Los sitios inespecíficos de reacción, se bloquearon con carbonato-caselna al 1% (una hora, 37 °C). En los pozos sensibilizados con el antígeno amibiano, se colocaron los plasmas de los hámsters (1:100 y 1:200). Después de incubar durante dos horas a 37 °C y lavar, se agregó IgG de conejo anti-hámster, repitiéndose los procedimientos de incubación y lavado. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con orto-fenilendiamina y la lectura se realizó a 490 nM.

También se determinó la reactividad de los plasmas al antígeno amibiano por inmunoelectrotransferencia. En este caso, las proteínas del antígeno amibiano

total después del corrimiento electroforético en geles SDS/PAGE, se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Se colocó el plasma de los hámsters diluido 1:30 y se incubó a 4 °C toda la noche, después de lavar se agregó el segundo anticuerpo de IgG anti-hámster biotinilado, se incubó dos horas a 37 °C y se lavó. Se adicionó la estreptavidina-peroxidasa (1:750) y después de permanecer dos horas a 37 °C, se lavó y reveló con orto-cloro-naftol.

Análisis estadístico

La significancia estadística se obtuvo por medio de las pruebas t de Student y Mann-Whitney (49 - 51).

RESULTADOS

In vitro

Efecto del zinc sobre la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*.

El efecto que el zinc ejerció sobre la viabilidad de los trofozoítos amibianos, incubados con 5 y 10 mM del metal (Fig.3) fue casi inmediato, observándose una mortalidad >74 % a las dos horas y > 93 % a las 24 horas, mientras que en los controles, las cifras de mortalidad a las dos y a las 48 horas fueron < 10 % y a las 24 horas de 20 %.

En los trofozoítos que sobrevivieron, luego de haber permanecido en contacto con el metal (10 mM) durante un lapso inferior a 30 minutos, el efecto se inhibió al lavarlos e incubarlos durante 72 horas en medio de cultivo normal (Fig. 4) .

La viabilidad y el número total de los trofozoítos normales y de los que fueron tratados con dosis de zinc, que variaron de 0.01 a 1.0 mM, no mostraron diferencias importantes entre sí, después de permanecer a 37 °C durante 24 horas. A las 48, 72 y 96 horas de incubación, la viabilidad observada en ambos grupos fue similar; sin embargo, el estudio microscópico mostró que el número total de los trofozoítos tratados con las diferentes concentraciones del metal, fue inferior al de los controles en todos los casos. Esta observación fue significativa ($p < .001$) en los experimentos en donde se utilizaron dosis de 0.5 (dato no graficado) y 1.0 mM de zinc y lapsos de incubación de 48, 72 y 96 horas. La replicación de los trofozoítos

tratados con 0.1 mM del metal, también se inhibió significativamente ($p < .05$) en relación con la de los controles a las 48 y 72 horas (Fig. 5).

Efecto del zinc sobre la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica*.

La incorporación de (^3H) timidina (cpm), en ambos grupos de trofozoítos, fue similar al efectuar la lectura en los cultivos de 24 horas. En los parásitos incubados con el zinc durante 48 horas, la cifra de cpm fue menor ($p < .01$) a la observada en los controles (Fig. 6). A las 72 horas, sólo los trofozoítos incubados con 1.0 mM del metal continuaron con las cifras de incorporación de (^3H) timidina significativamente inferiores ($p < .001$) a las de los controles. Así, observamos que 1.0 mM fue la dosis de zinc, que resultó persistentemente tóxica para el parásito.

Efecto del zinc sobre la adherencia amibiana.

La adherencia de los trofozoítos tratados con el metal a las monocapas de células MDCK, se inhibió discretamente (10%) al utilizar dosis de 0.001 mM. En aquellos parásitos incubados con 0.01, 0.1 y 1.0 mM de zinc, la adherencia fue de un 30 a 40 % inferior ($p < .001$) a la observada (100 %) en los trofozoítos normales (Fig. 7).

Estudio electroforético e inmunolectrotransferencia de trofozoítos de *E. histolytica* tratados con zinc.

El análisis electroforético de las proteínas provenientes del lisado total de los trofozoítos amibianos, que estuvieron en contacto con dosis de 0.01 a 1.0 mM de zinc durante 72 horas, mostró un patrón muy similar al observado en el estudio de las proteínas obtenidas de los trofozoítos normales no tratados con el metal (Fig.8).

En la inmunolectrotransferencia en donde se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-actina, se obtuvo una banda de aproximadamente 46 kDa, patrón que se observó tanto en los trofozoítos normales como en los tratados con zinc 1.0 mM durante 72 horas (Fig.9).

Estudio por inmunofluorescencia de los trofozoítos tratados con zinc

La fluorescencia obtenida mediante el reconocimiento de anticuerpos anti-tubulina, se observó en aproximadamente el 30% de los trofozoítos normales, (Fig.10 A,C) y su distribución individual fue más uniforme, que en las amibas tratadas con zinc (1.0 mM). En estas últimas la fluorescencia, que se detectó en más del 70% de los trofozoítos, se localizó principalmente en la periferia y eventualmente en el área total del parásito con gran intensidad (Fig. 10 B, D).

In vivo

Efecto del zinc sobre la inducción del absceso hepático amibiano en el hámster.

Los resultados obtenidos en los estudios realizados in vitro, que muestran el efecto nocivo del zinc en los procesos de viabilidad, replicación y adherencia de la amiba, apoyan factores involucrados en el planteamiento de nuestra hipótesis. Con base en ello, decidimos observar, in vivo, el efecto que el zinc ejerce en el desarrollo del absceso hepático amibiano.

El desarrollo del absceso hepático amibiano (Fig.11), se inhibió significativamente ($p < .001$ y $p < .01$) en los animales a los que se les administró el zinc por vía intraperitoneal (una y once dosis respectivamente). Cabe señalar que la inhibición fue mayor con una dosis del metal, dado que sólo uno de los 10 integrantes de éste grupo mostró un absceso que abarcó el 20% del órgano hepático; en los nueve restantes, esta relación fue inferior al 2%, observándose en tres de ellos una inhibición total. En los hámsters que recibieron 11 dosis de zinc, la relación absceso-órgano hepático que se observó fue la siguiente: inferior al 20% en once de ellos, de 20% en dos y en dos más, los valores que estuvieron entre el 50 y el 65% se imbricaron con aquellos observados en los controles que no recibieron zinc. En los integrantes de éste último grupo, el absceso implicó aproximadamente del 40 al 75% del hígado, como se observa en la figura 11 (no se incluyeron los datos correspondientes a cinco integrantes de este grupo, que fallecieron como consecuencia del absceso antes de la fecha señalada para el sacrificio colectivo).

La mortalidad secundaria al desarrollo del absceso hepático amibiano, en el transcurso del lapso señalado para su sacrificio, fue nula en los animales que recibieron zinc.

Los hámsters de los grupos control, que no fueron inoculados con trofozoítos amibianos y que recibieron una y once dosis de zinc respectivamente, fueron sacrificados en el lapso señalado para el resto de los animales. Durante este tiempo, no mostraron alteraciones clínicas atribuibles a la administración del metal.

Anatomía Patológica

En los animales protegidos con la administración de zinc, esto es, con el hígado macroscópicamente sano (Fig. 12), el estudio histológico del órgano tampoco mostró alteraciones, o estas fueron mínimas, caracterizándose por: congestión centrolobulillar o infiltración linfocitaria escasa, **sin células gigantes multinucleadas**. Los animales protegidos "parcialmente" con el zinc, desarrollaron pequeños abscesos en el hígado, los que microscópicamente mostraron zonas de necrosis con trofozoítos en su interior, infiltrado linfoplasmocitario y, ocasionalmente, acúmulos linfoideos alrededor de los microabscesos. Este patrón, magnificado (confluencia de microabscesos, necrosis extensa, numerosos trofozoítos) y acompañando de gran cantidad de polimorfonucleares, se observó en los animales controles que fueron inoculados con E histolytica y no recibieron zinc (Fig. 13).

Se estudiaron especímenes obtenidos de los órganos hepáticos macroscópicamente sanos, provenientes de los controles normales y de los animales que sin haber sido inoculados con el parásito recibieron zinc. En ellos, se observó al tejido hepático de características normales en ambos grupos (dato no mostrado).

Efecto del zinc sobre la respuesta humoral de hámsters inoculados intrahepáticamente con *E. histolytica*.

La cifra promedio de anticuerpos anti-amiba obtenida por ELISA en el plasma de los animales normales fue de 0.245 ± 0.20 , mientras que en los tratados con zinc (II dosis: $\bar{X} = 0.805 \pm 0.47$, I dosis: $\bar{X} = 0.829 \pm 0.28$), la cantidad de anticuerpos fue menor a la que se detectó en los animales con abscesos hepáticos mayores al 40 % del órgano, en ellos los valores fueron de 1.014 ± 0.18 (Tabla 1).

Por otra parte, el análisis por inmunoelectrotransferencia de los anticuerpos anti-amiba presentes en el plasma de los animales en estudio, mostró que, los procedentes de aquellos en los que por efecto del zinc se inhibió el desarrollo del absceso hepático, presentaron un patrón diferente al de los infectados que no recibieron zinc, como se aprecia en la Fig. 14. Las bandas identificadas en el plasma de los animales protegidos que se presentan en la Tabla 2, fueron, en orden de frecuencia, las siguientes: 68 - 54, 44 - 29, 112 - 23 y 51.5 kDa.

Otras proteínas, identificadas tanto en el grupo protegido por el zinc como en los controles sanos fueron: las correspondientes a 88 kDa, muy sutilmente la de 54 kDa y finalmente, la de 208 kDa; ésta última y las de 116, 46 y 29 kDa, principalmente, se observaron en los controles con absceso hepático (Tabla 2).

FALLA DE ORIGEN

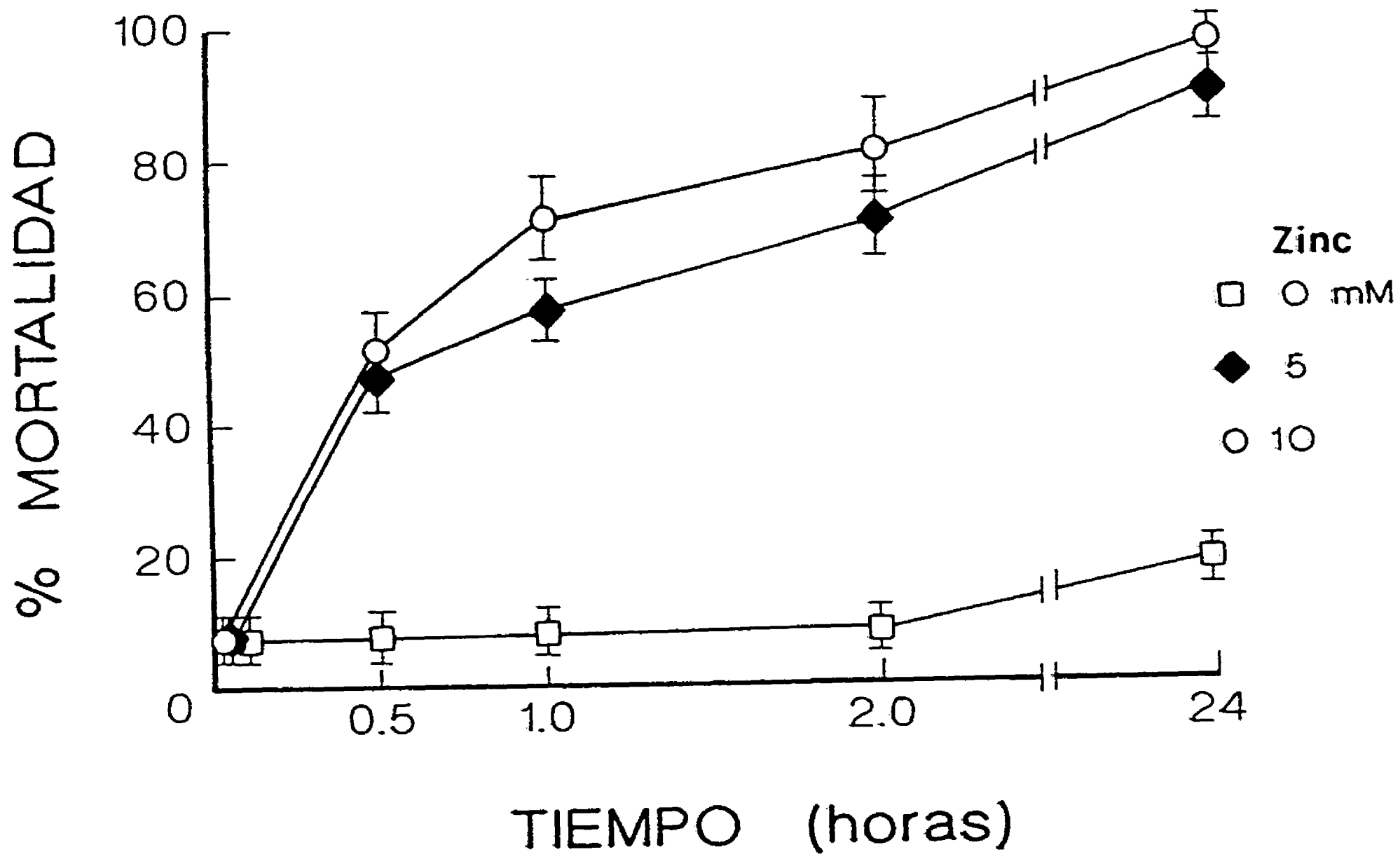


Figura 3. El efecto del zinc sobre la viabilidad de los trofozoitos amebianos incubados con 5 y 10 mM del metal, se determino mediante observación microscópica y recuento de trofozoitos utilizando la técnica de exclusión con el azul tripano. La mortalidad a los 30 minutos fue >50%, a las dos horas > 74% y a las 24 horas > 93.

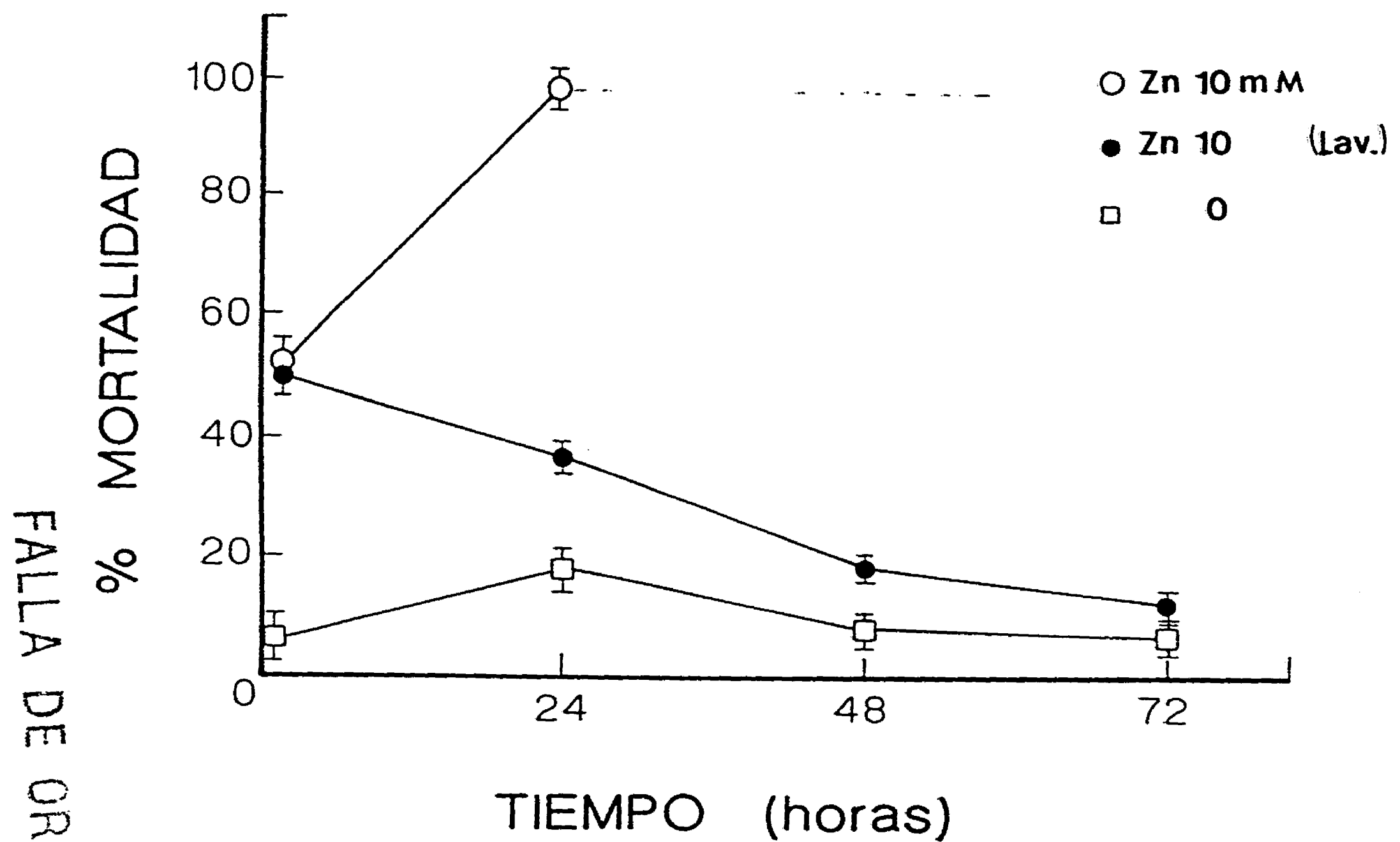


Figura 4. El efecto letal del zinc, que se observó en los trofozoitos amibianos incubados con 10 mM del metal, se inhibió en aquellos que en un lapso de 30 minutos fueron lavados (L.) y reincubados durante 72 horas en medio de cultivo normal.

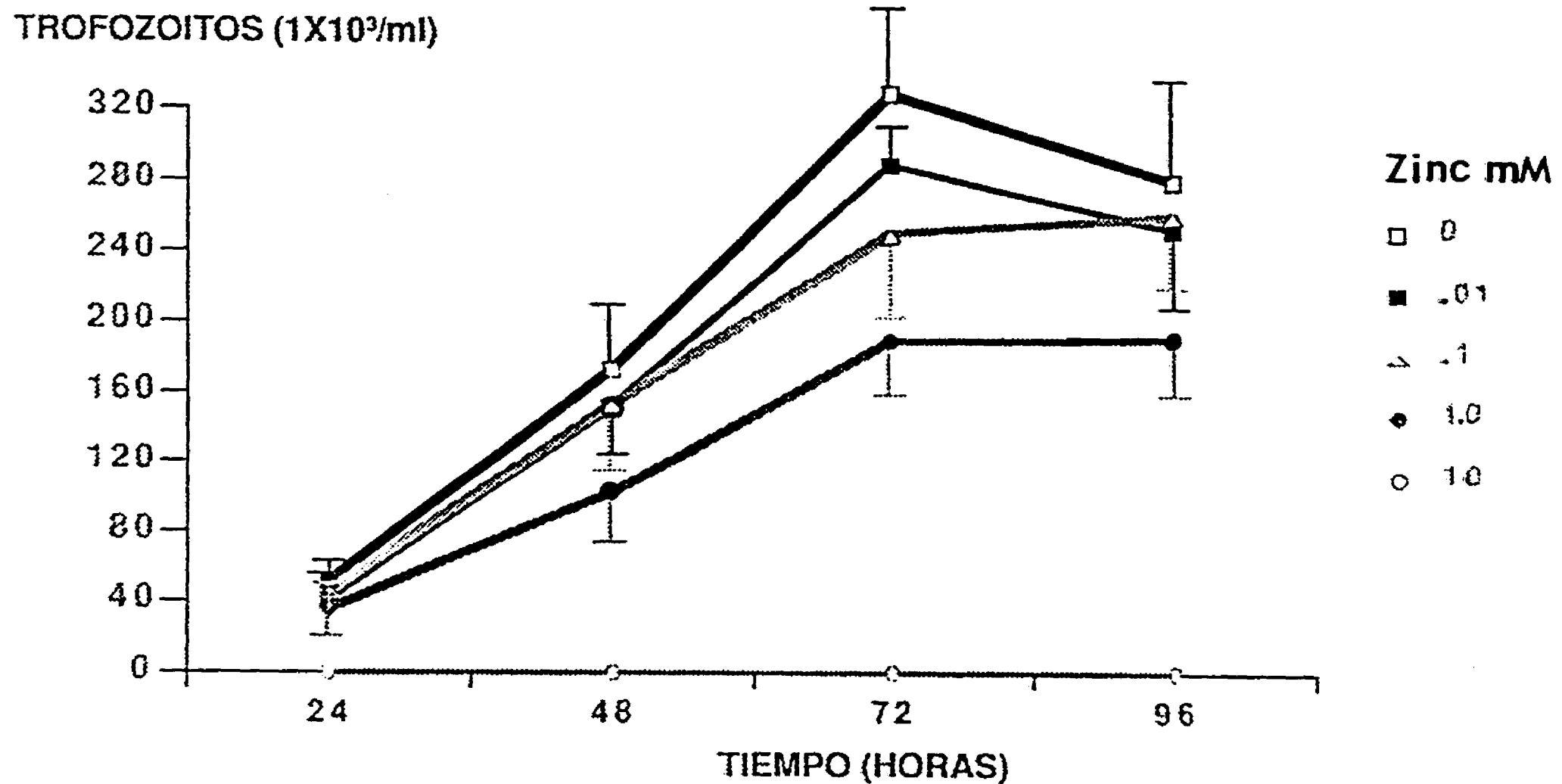


Figura 5. La proliferación de los trofozoitos cultivados en medio axénico solo ó suplementado con diferentes concentraciones de zinc, se determinó con microscopía óptica a las 24, 48, 72 y 96 horas. En los cultivos de 48-96 horas, el numero de los trofozoitos tratados con el metal fue inferior al de los controles; esta observación fue constantemente significativa ($p < .001$) al utilizar 1.0 mM del metal.

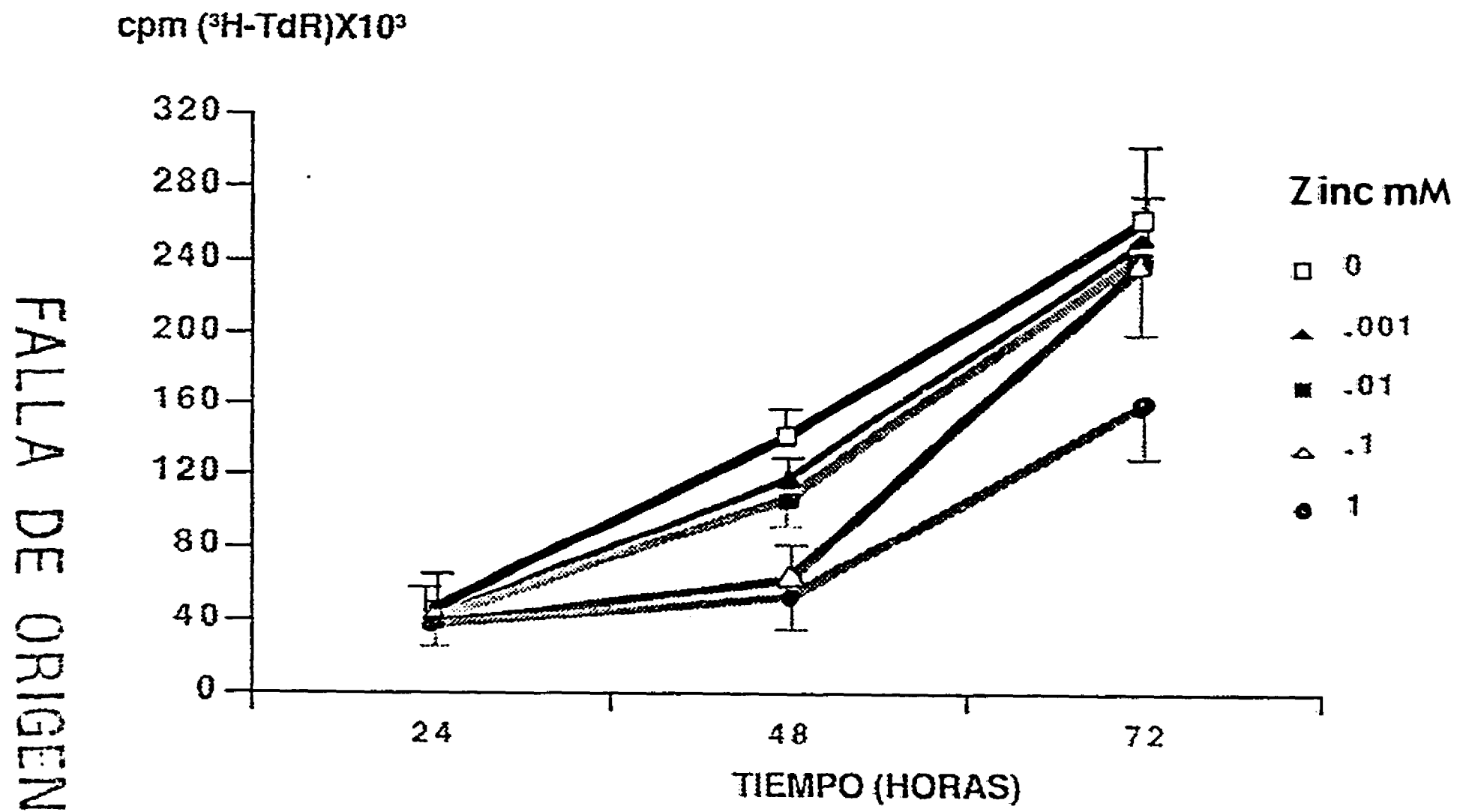
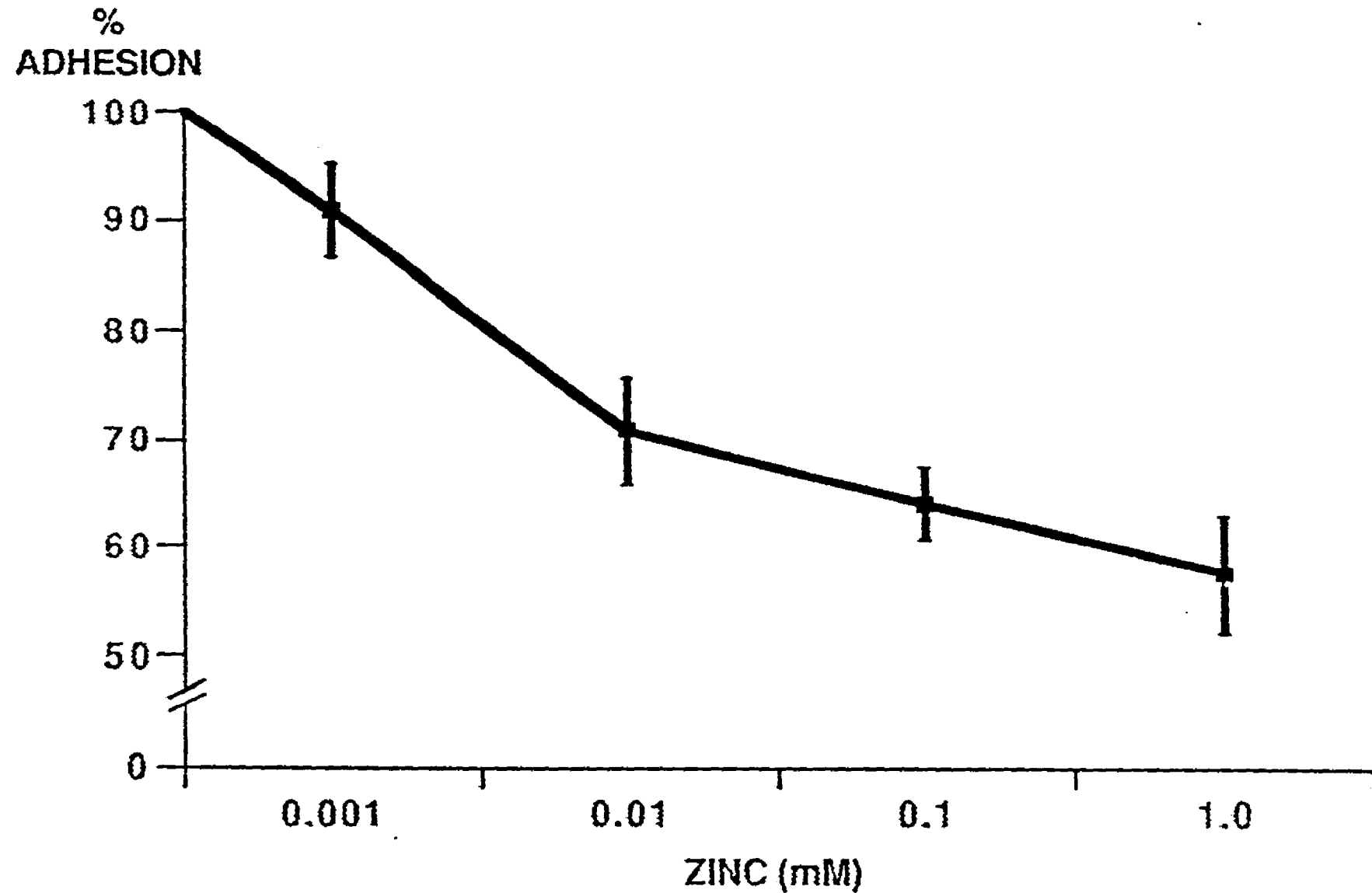


Figura 6. La incorporación de (³H) E timidina en los parásitos incubados con el zinc durante 48 horas, fue inferior ($p < .01$) a la observada en los controles. A las 72 horas, esta disminución persistió de manera significativa ($p < .001$) únicamente, en los parásitos procedentes de cultivos tratados con 1.0 mM del metal.

EFFECTOS DEL ZINC SOBRE LA ADHERENCIA DE TROFOZOITOS AMIBIANOS A CELULAS MDCK



FALLA DE ORIGEN

Figura 7. La adherencia de los trofozoitos amibianos a monocapas de células MDCK, se determinó mediante un microensayo (n=12) basado en la técnica de ELISA, en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal anti *E. histolytica*. En los trofozoitos incubados con 0.01, 0.1 y 1.0 mM de zinc, la adherencia fue de un 30 a un 40 % inferior ($p < .001$) a la de los controles.

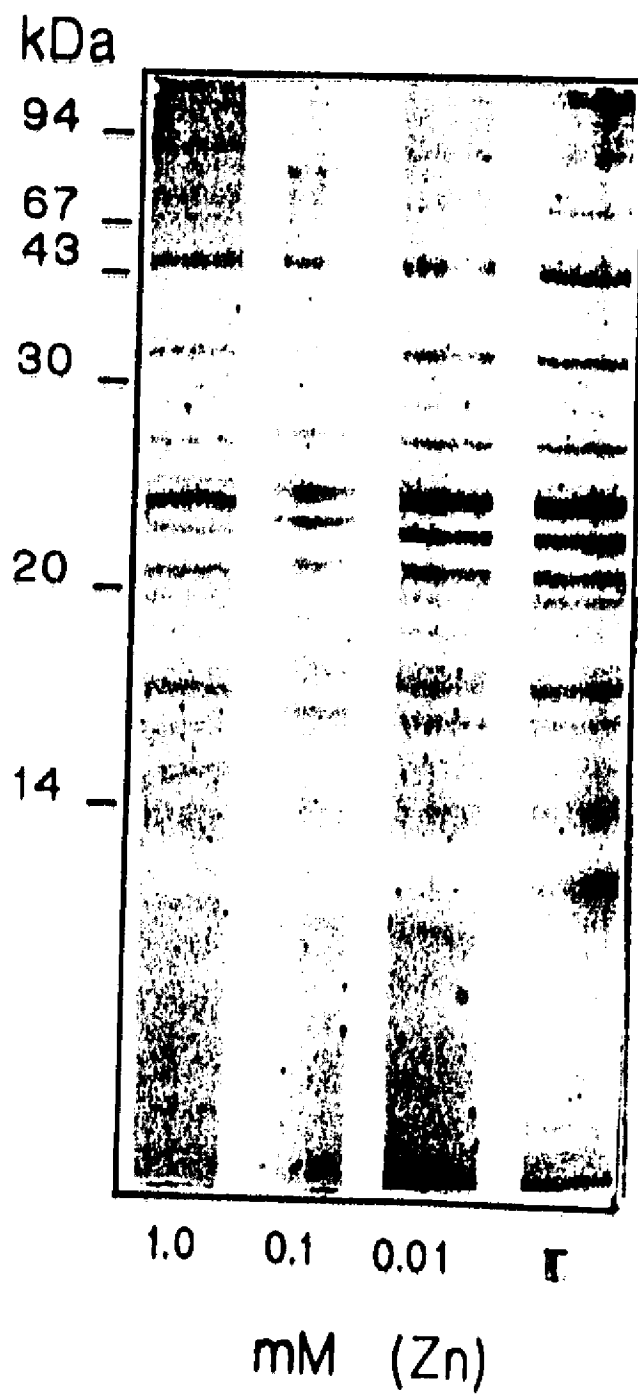


Figura 8. Patrón electroforético de trofozoitos de *E. histolytica* expuestos a diferentes concentraciones de zinc (0.01-1.0mM) y en ausencia del metal (c), durante 72 horas.

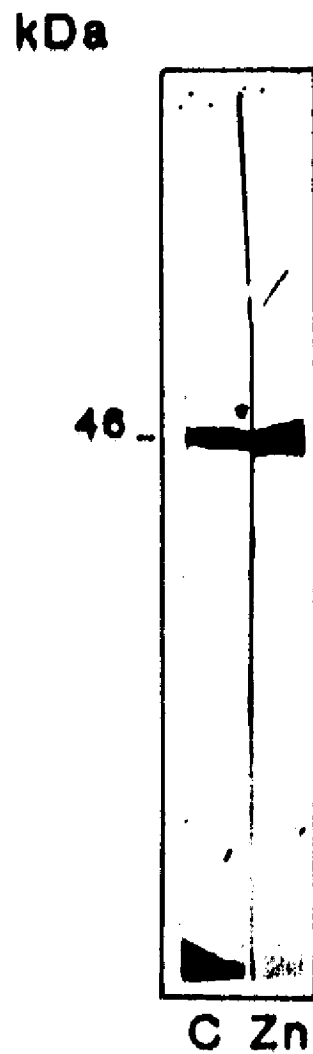


Figura 9. inmunoelectrotransferencia. Tiras de nitrocelulosa transferidas con el antígeno amibiano tratado (Zn) o no tratado (c) con zinc (1.0 mM-72 h), se incubaron con el anticuerpo monoclonal antiactina de IgG murino y posteriormente con anti Ig G de ratón, la reacción se reveló con diaminobenzidina.. En ambas muestras se obtuvo una banda, de aproximadamente 46 kDa, ligeramente mas acentuada en la correspondiente a los trofozoitos tratados con zinc.

FALLA DE ORIGEN

FAJLA DE ORIGEN

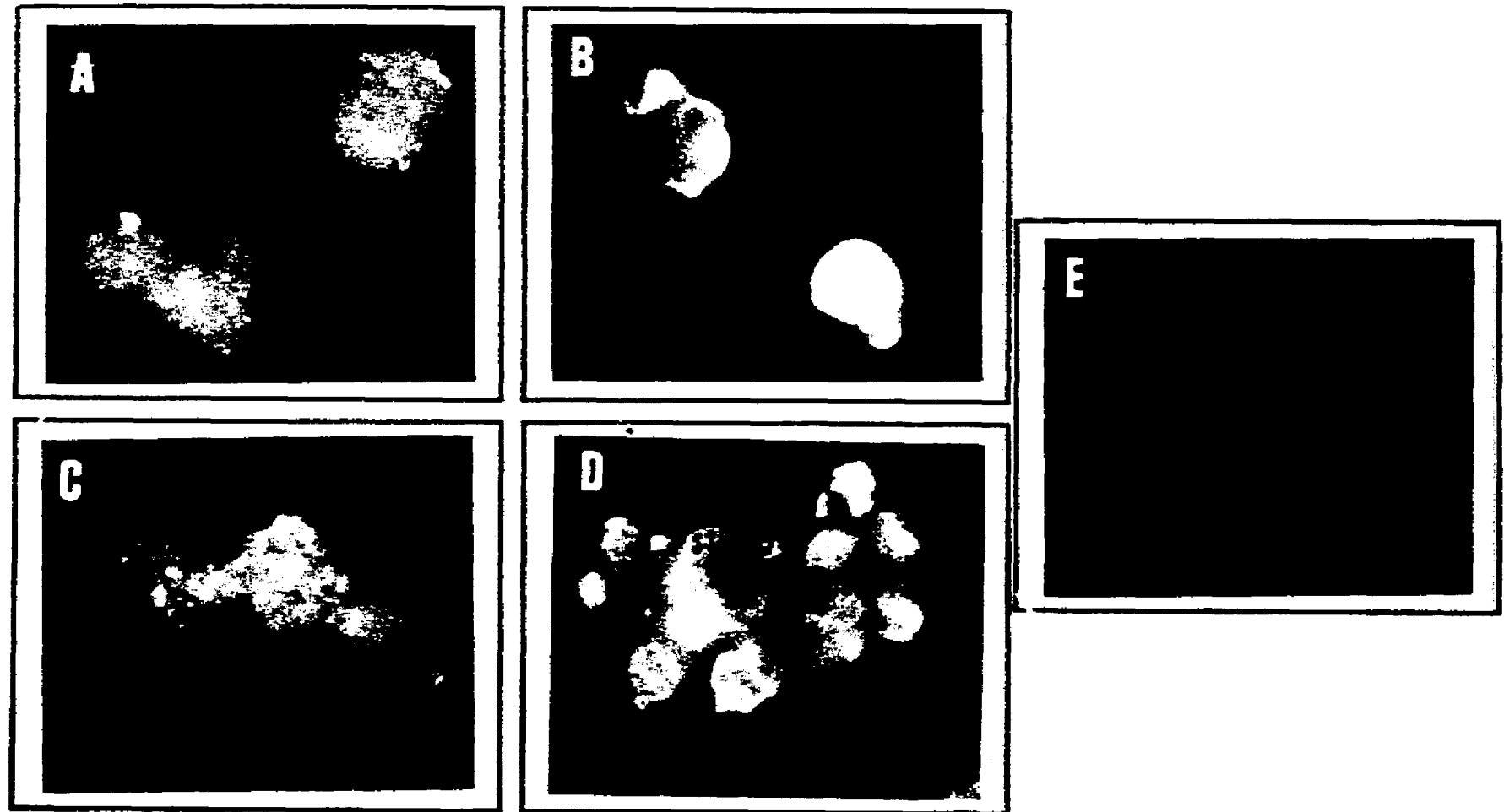


Figura 10. El patrón de inmunofluorescencia obtenido mediante el reconocimiento de anticuerpos anti-tubulina fue de menor intensidad y distribución mas uniforme en los trofozoitos normales.(A,C) En los tratados con zinc (1.0 mM-72 hs) se detectó con mayor frecuencia (70%) y principalmente en la periferia, ocasionalmente se distribuyó en todo el trofozoito con gran intensidad (B, D). Control sin primer anticuerpo (E).

FALLA DE ORIGEN

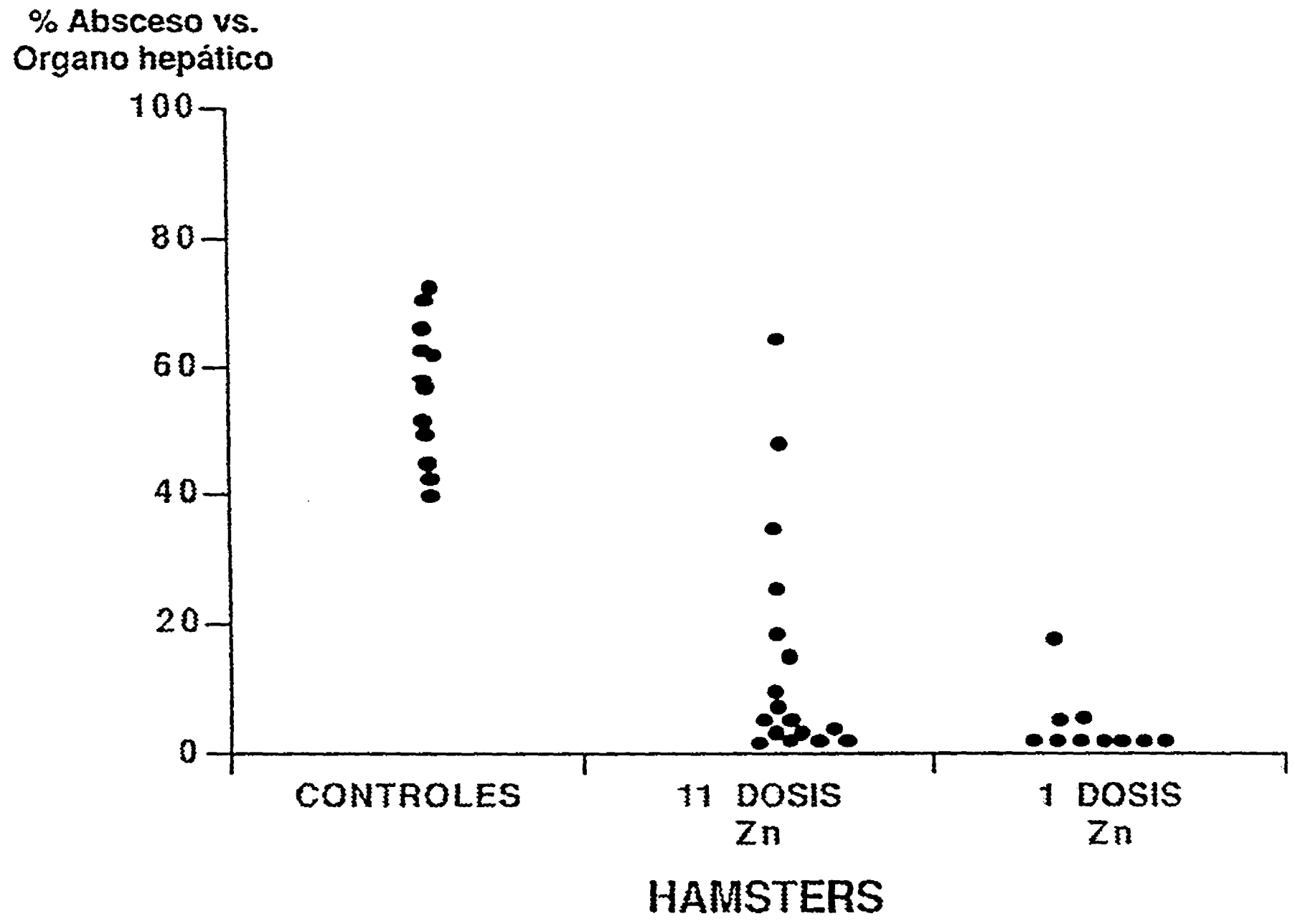


Figura 11. El desarrollo del absceso hepático amibiano, se inhibió significativamente con la administración intraperitoneal de zinc (11 dosis $p < 0.01$, 1 dosis $p < 0.001$), lo que se hizo aparente al comparar el tamaño que alcanzó en los animales inoculados con *E. histolytica*, que no recibieron el metal.

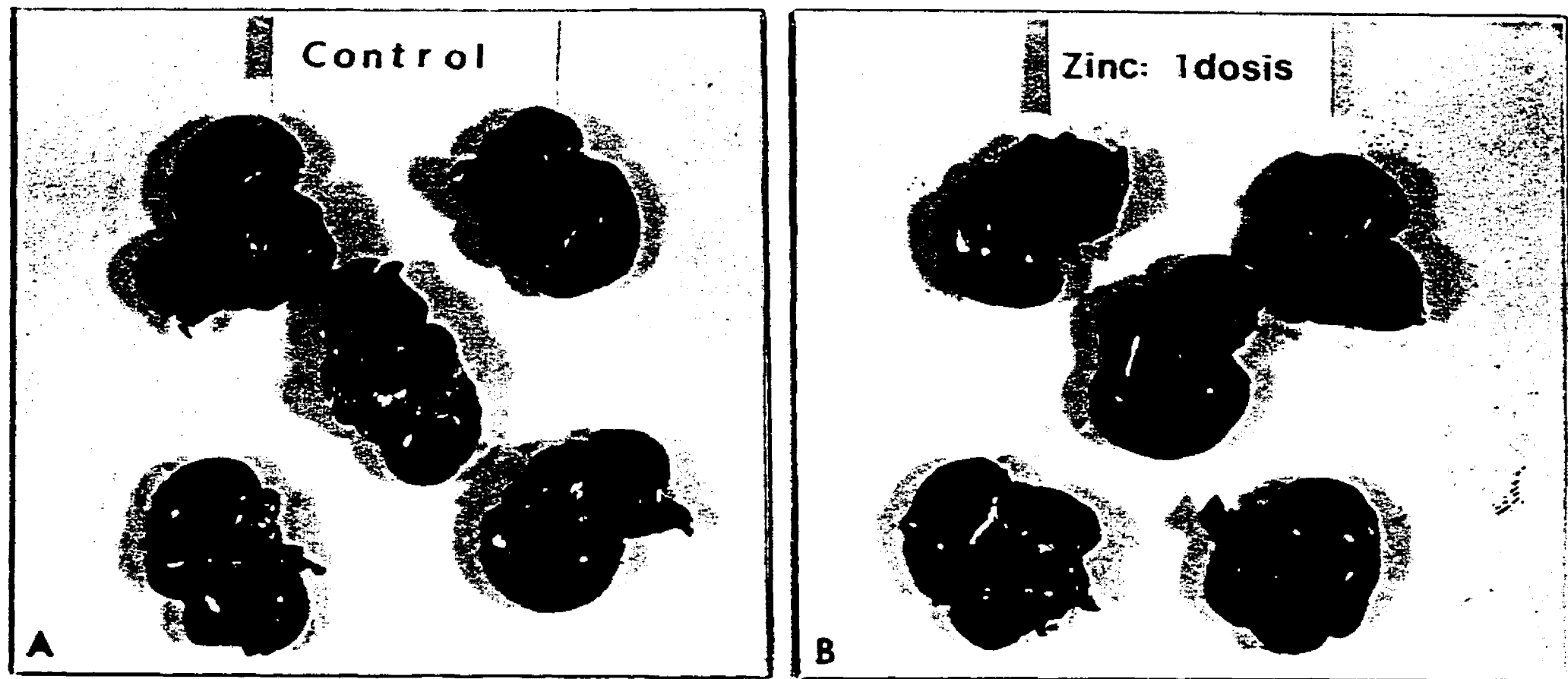


Figura 12. Macroscópicamente se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$) en el tamaño de los abscesos entre los grupos de animales tratados con zinc y los no tratados: A. Grupo control; B. Grupo que recibió una dosis intraperitoneal de zinc.

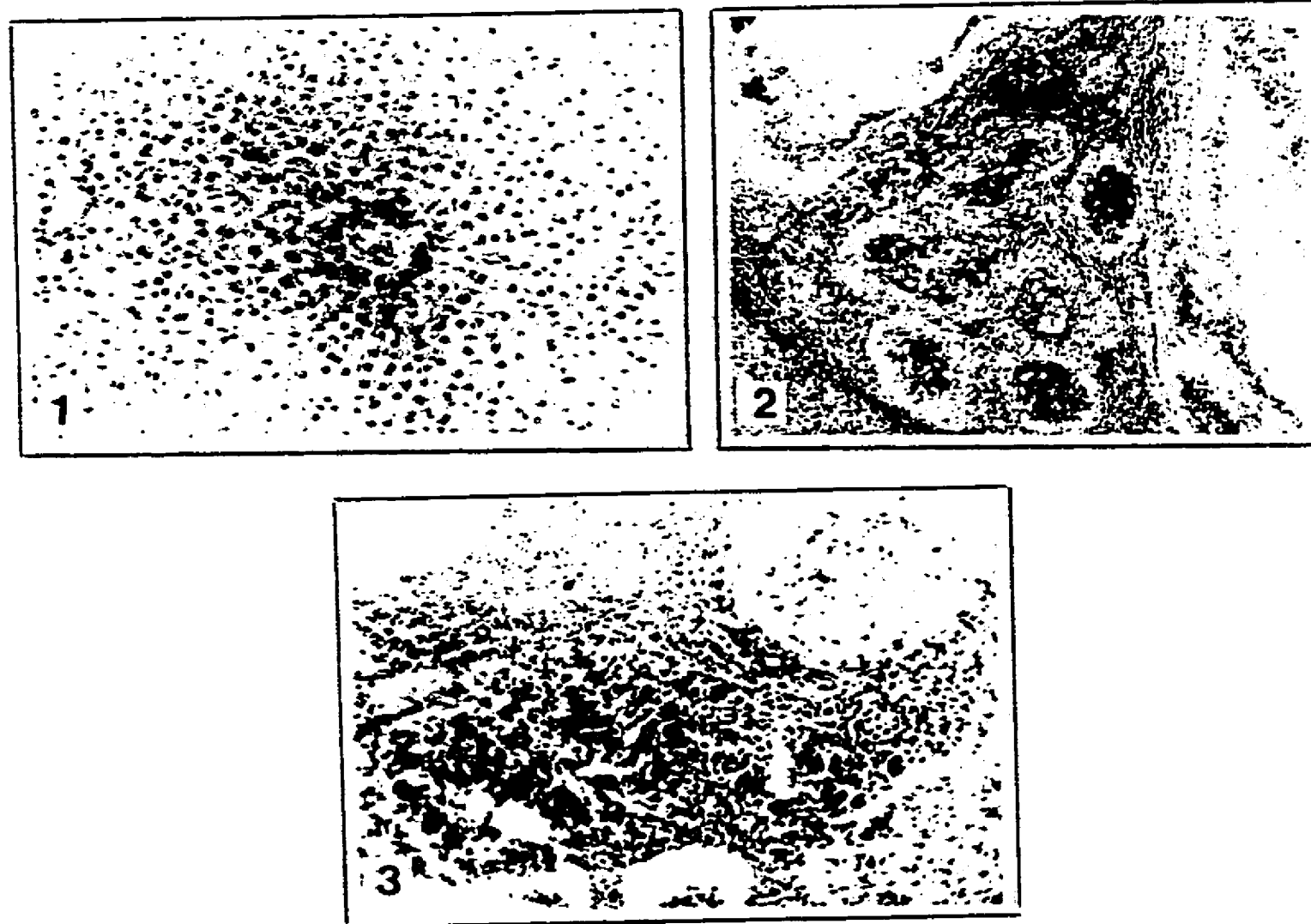


Figura 13. El estudio microscópico del tejido hepático proveniente de los animales, mostró: 1.- en los protegidos "totalmente" (órgano macroscópicamente sano) con la administración de zinc (1 u 11 dosis), sólo ligera congestión centrolobulillar y/o escasa infiltración linfocitaria; 2.- en los protegidos "parcialmente" (con pequeños abscesos), una arquitectura caracterizada por zonas necróticas con infiltración de trofozoitos en el interior e infiltrado linfoplasmocitario circundante; 3. En los controles inoculados con *E. histolytica* que no recibieron zinc, se repitió éste mismo patrón magnificado y con numerosos polimorfonucleares en los sitios de la lesión tisular.

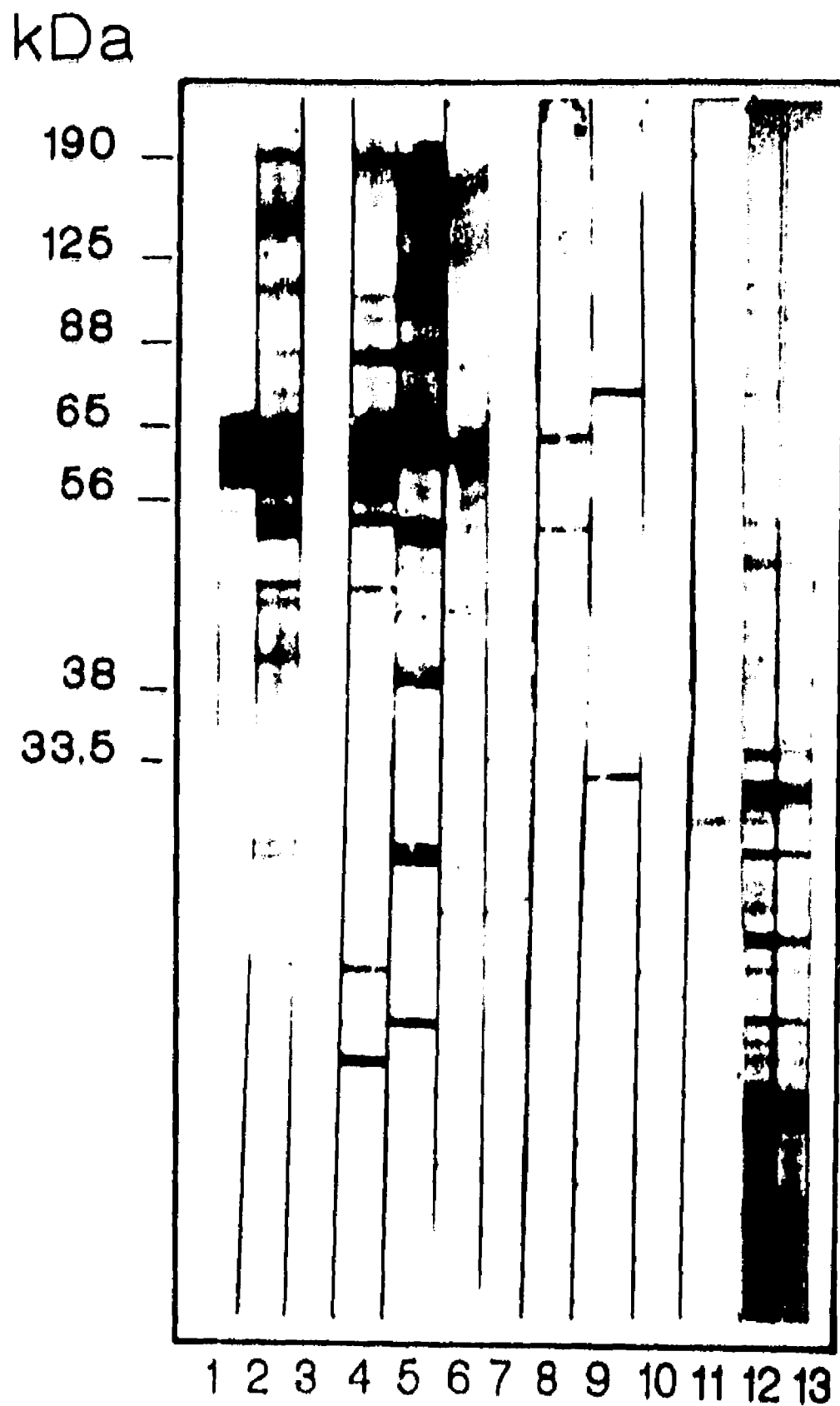


Figura 14. Inmunolectrotransferencia del plasma de hámsters. Se observan las bandas correspondientes a los sitios del antígeno amibiano, identificados por los anticuerpos de los hámsters. Alicuotas de integrantes de los diferentes grupos, fueron analizadas individualmente y los resultados aparecen en el siguiente orden: 1 - 3, "protegido" con una dosis de zinc; 4 - 7, "protegido" con 11 dosis de zinc; 8-10 normales (sanos); 11 - 13, controles con absceso hepático amibiano.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Niveles de anticuerpos anti *E. histolytica*, detectados en el plasma de hámsters, por ELISA.

Grupo	DO (X + ES)
1.- 1 dosis de zinc (protegido)	0.829 ± 0.28
2.- 11 dosis de zinc (protegido)	0.805 ± 0.47
3.- 11 dosis de zinc (no protegido)	1.055 ± 0.20
4.- control con absceso hepático	1.014 ± 0.18
5.- control normal	0.240 ± 0.20

La diferencia entre los grupos : 1 - 4 vs. 5 fue significativa, $p < .01$.
La cifra de densidad óptica, corresponde al valor promedio del estudio realizado por triplicado, \pm el error estándar. La metodología se describe en material y métodos.

Tabla 2 Inmunoelectrotransferencia. Reconocimiento del antígeno amibiano por el plasma de hámsters de los diferentes grupos experimentales.

Antígeno amibiano	hámsters inoculados con <i>E. histolytica</i>				
	kDa	1 dosis Zn	11 dosis Zn	controles c/absceso	normales
		%	%	%	%
208		100	50	100	33
112		33	50	0	0
88		33	75	0	33
68		100	75	0	0
54		100	75	0	33
51.5		33	25	0	0
46		100	25	100	0
44		66	50	0	0
29		66	50	66	0
23		33	50	66	0

El porcentaje señalado en las columnas, corresponde a la frecuencia del reconocimiento que mostraron los anticuerpos de los hámsters por las diferentes fracciones del antígeno amibiano. Las alicuotas colocadas por triplicado, se estudiaron de manera individual, como puede verse en una parte representativa de este estudio, que aparece en la Figura 14.

DISCUSION

Los resultados que aquí se presentan, indican que el zinc ejerce un efecto importante sobre la adherencia y la replicación de *E. histolytica*. El crecimiento de las amibas a las 72 horas con dosis que no afectaron su viabilidad (0.01 - 1.0 mM), fue menor que el observado en cultivos de amibas en ausencia del metal. Con dosis mayores del mismo (5 - 10 mM) la mortalidad fue evidente a los 30 minutos; éste efecto se inhibió cuando dentro del lapso señalado, los trofozoitos lavados se recultivaban en medio de cultivo normal sin zinc.

Posibles mecanismos de acción del zinc sobre los trofozoitos de *E. histolytica*

Dado que el efecto letal se inhibió, podríamos suponer que: existe un recambio constante del metal, la unión del zinc puede ser reversible, o bien, que los sitios de unión del zinc involucrados inicialmente, sean de fácil acceso. Al respecto, sabemos que el zinc tiene una gran afinidad tanto por la histidina (H) como por la cisteína (C) (52-54) y que *E. histolytica*, expresa una proteína de superficie de 29 kDa rica en cisteína, denominada histolisina (13,55). El zinc podría permanecer en la superficie y generar cambios directamente sobre la membrana y/o hacia el interior del trofozoito, a través de señales emitidas. Otra posibilidad es que el zinc difunda sólo o que sea transportado al interior del parásito unido a la cisteína, como sucede en el intestino (56). Ya en el interior tendría la posibilidad de interactuar con los ácidos nucleicos, de una manera indirecta por mantener el contacto entre las proteínas que se unen al DNA, o bien directamente como lo hacen en algunas células (55-57) los dominios llamados "dedos de zinc" (los cuales son secuencias de siete aminoácidos {2H, 2C y 3 aminoácidos hidrofóbicos} que están siempre en idénticas posiciones y que forman una asa

alrededor de un ión de zinc, al que se unen por 2H y 2C). Asimismo, debemos de tener presente el efecto que ejerce el zinc, sobre otras proteínas similares a las del parásito (58 - 59) y sobre el calcio, al que puede antagonizar o desplazar de algunos de sus sitios de unión (44).

En el estudio de inmunoelectrotransferencia, la detección de la banda correspondiente a la actina es clara y coincide con el peso molecular que se le atribuye (46 kDa). Lo anterior se expresa de manera similar tanto en los trofozoítos normales como en los tratados con el metal.

Si bien es cierto, que tanto en el estudio electroforético como en la inmunoelectrotransferencia, no se observaron diferencias entre las proteínas de los trofozoítos tratados con zinc y los normales, es factible que las proteínas estén presentes en ambos y que los cambios inducidos en ellas por el zinc se den principalmente en su conformación y/o en su función (58 - 60). De acuerdo con lo anterior, una alteración en las proteínas que forman los microfilamentos amibianos, V. gr. actina, podría reflejarse en la expresión de receptores (4), o de otros modificadores celulares.

El hecho de que la fluorescencia emitida por la tubulina, sea mayor en las amibas tratadas con zinc que en los controles, refleja un aumento en su polimerización, la que posiblemente esté alterada, dado que la replicación de los trofozoítos tratados con el metal disminuyó. La polimerización ocasionada por el zinc, le puede conferir a la tubulina una estabilidad tal que interfiera con la replicación, proceso dinámico que requiere para su progresión de la polimerización y despolimerización de la proteína. Por otra parte, Larsson (60) observó que la tubulina al polimerizarse en presencia de zinc, forma láminas y no microtúbulos. La

posibilidad de que un fenómeno parecido hubiera ocurrido en los trofozoítos, podría explicar el efecto del zinc sobre las amibas.

La alteración de las estructuras del citoesqueleto, además de su posible efecto sobre la replicación, podría originar modificaciones tanto en la forma y el movimiento, como en la exocitosis y la expresión de receptores en la amiba. Estos últimos factores, son los responsables tanto de la transmisión de señales al interior del parásito, como de la adherencia a la célula blanco; de tal manera, que aún cuando los eventos principalmente afectados por el metal fueran la replicación y la adherencia, esto podría ser suficiente para que se logre limitar la capacidad de penetración tisular del parásito. Sin embargo, es importante realizar estudios más profundos y específicos para precisar la participación del zinc en la estructura y función del citoesqueleto amibiano; así como del efecto que ejerce sobre el calcio, elemento que además de ser esencial para la actividad del amebaporo y la fosfolipasa del parásito, participa en la dinámica de las proteínas del citoesqueleto y en la citotoxicidad y lisis de la célula blanco (9-61).

Al observar el efecto nocivo que el zinc ejerció sobre la amiba *in vitro*, decidimos investigar si esta alteración en las funciones de replicación y adherencia del parásito, podría alterar su virulencia. Para ello, se estudió la utilidad del ión *in vivo*, como un posible inhibidor de la formación del absceso hepático en hámsters inoculados con *E. histolytica*.

La administración de zinc por vía intraperitoneal, inhibió significativamente la formación del absceso hepático, en los animales inoculados intrahepáticamente con 1.5×10^6 trofozoítos amibianos viables. Este efecto se observó en los dos grupos que recibieron el metal, pero definitivamente, los mejores resultados se obtuvieron en los animales a los que se les administró exclusivamente una dosis

de zinc 48 horas después del reto amibiano. El grado de inhibición que se logró en tres de los integrantes de este grupo fue absoluta, en seis el absceso ocupó una superficie menor al 2% del órgano hepático y sólo en uno, el absceso fue de 20%. En ningún caso se detectaron efectos secundarios atribuibles a la administración del zinc (1 y 11 dosis).

Al analizar el plasma de los hámsters por el método de ELISA, no hubo diferencias significativas en los niveles de anticuerpos anti-amibianos entre las cifras de los animales protegidos con una u once dosis de zinc y finalmente, los niveles más elevados de anticuerpos se detectaron en los animales que desarrollaron abscesos que afectaron al órgano hepático en más del 40%, sin importar, si habían recibido (n=2) o no (n=12) el metal.

El aumento de anticuerpos observado en los animales que presentaron un mayor daño hepático, muestra la ineficiencia de estos elementos de la respuesta inmune frente a la invasión amibiana. Podríamos suponer, que la producción de anticuerpos inducida por este estímulo antigénico sostenido, sobre la célula B, resulta:

- Poco oportuna. Mientras las inmunoglobulinas son sintetizadas, el proceso invasivo del parásito progresa.
- Insuficiente. Posiblemente por alteraciones en la función de las células Th, NK y macrófagos, como ya se mencionó anteriormente.
- Ineficiente. Debido a la capacidad de evasión del parásito, ya que entre otros mecanismos, muestra la redistribución de antígenos de superficie o es capaz de formar casquetes (capping) que libera con facilidad. Al respecto, se pensó que el zinc dada su influencia sobre el calcio y los microfilamentos, pudiera inhibir el "capping" amibiano y favorecer de esta manera la acción de los anticuerpos. Sin

embargo, los ensayos que realizamos con tal fin (datos no incluidos) no han sido concluyentes.

Desde el punto de vista cualitativo, el reconocimiento de moléculas de la estructura amibiana obtenido por inmunoelectrotransferencia mostró diferencias entre los dos grupos. Los anticuerpos provenientes del plasma de los animales protegidos con el zinc, reconocieron antígenos amibianos que participan en la destrucción tisular: 29, 68 y 112 kDa (55, 62 - 63), de éstos, los dos primeros son proteasas ricas en cisteína, aminoácido por el cual el zinc tiene gran afinidad (52-54). Algunos de los antígenos identificados, participan también en la adherencia: 51.5 y 112 kDa y las proteínas ricas en serina que corresponden a 52 y 46 kDa; éstas últimas son reconocidas, también en el 82 - 90% de los pacientes con amibiasis invasora (64 - 65). Asimismo, reconocieron una banda de 23 kDa, que corresponde a una hemolisina con actividad de fosfolipasa (64). Si los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos fueran eficientes, podrían controlar la invasión amibiana, al bloquear proteínas de adherencia y penetración tisular.

Una vez planteados los posibles mecanismos, que pudieran explicar el efecto deletéreo que ejerció el zinc sobre los trofozoitos amibianos *in vitro*, y después de haber analizado en el capítulo correspondiente a la introducción, los principales sucesos invasivos y evasivos del parásito en el huésped, trataremos de señalar algunas de las actividades del zinc y su posible participación en la protección de la enfermedad hepática amibiana.

En condiciones normales, el hígado juega un papel importante en el metabolismo del zinc, captándolo rápidamente después de su absorción por el intestino.

En hepatocitos en cultivo, se vió que el zinc puede ser captado aislado, unido a la albúmina ó en mayor proporción a la histidina. Esto se logra por un camino saturable y con alta afinidad (66)

En situaciones de stress (respuesta inflamatoria de fase aguda) IL-1 ayuda a que disminuya el zinc circulante y se redistribuya en el hígado, en donde se utiliza para la síntesis de las proteínas requeridas en ésta situación (67).

El zinc pudo haber favorecido el control de la invasión amibiana, a través de su participación en algunas de las etapas, que intervienen en los siguientes procesos:

- I. Inactivación del parásito.
- II. Inducción de la inmunidad en el huésped.
- III. Protección de la célula blanco.

I. Inactivación del parásito.

En los animales que recibieron 11 dosis de zinc (dos previas al reto amibiano intrahepático), el metal pudo haber ejercido sobre la amiba, al momento de su llegada, alguno de los efectos observados *in vitro* (inhibición de la replicación y de la adherencia, alteraciones del citoesqueleto) los que aislados o en conjunto podrían inactivar al parásito. Sin embargo, ésto no pudo haber sucedido en los que recibieron una dosis de zinc después de la inoculación amibiana, ya que la

inhibición de la adherencia o la replicación a las 48 horas de iniciada la invasión amibiana, podrían ayudar en el mejor de los casos a evitar su extensión, pero no a revertir el proceso. Para lograrlo, debieron haber intervenido mecanismos diferentes.

II. Inducción de la inmunidad en el huésped.

1. Disminución de prostaglandinas y producción de citocinas.

El zinc a través de la inactivación de las fosfolipasas (42, 68 - 69), posiblemente disminuya la actividad citolítica del parásito e impida la generación del sustrato (ácido araquidónico) para la síntesis de prostaglandinas en las células (70).

La deficiencia de zinc se relaciona, con unas cuantas excepciones (71-72), con un aumento de prostaglandinas: en preparaciones tisulares los suplementos de zinc generalmente parecen disminuir la síntesis de PG (73). En ratones NZW/W, la síntesis de PG en el hígado y en el riñón, asociada con enfermedades autoinmunes, se inhibe con 160 mg M/Kg de dieta (74).

El zinc aumenta la producción y la secreción de TNF alfa e IL1 en fagocitos mononucleares (75); revierte así, el efecto supresor que el factor de crecimiento beta (TGFB), las alfa globulinas y la PGE2 ejercen sobre la secreción del TNF alfa. Al descender las PGs podría haber una disminución simultánea de células T supresoras, eventos que favorecerían la secreción de IL-1, IL-2 Y TNF (19 - 22).

2, Activación celular.

Macrófagos. En el párrafo anterior, mencionamos como el zinc puede afectar a las prostaglandinas (42, 68, 69, 70). Al disminuir la PGE2, los niveles tan elevados de AMPc asociados con ella, pueden descender. Al hacerlo, aumenta el GMP que es requerido para la formación del fagosoma y la subsecuente activación del estallido respiratorio. Por otra parte, la generación y liberación de IL-1 y TNF alfa al no existir la inhibición que el aumento tan exagerado de PGE2 y AMPc ejercen en la producción de IL-1 y TNFalfa, estos podrían ser generados y liberados para actuar.

Linfocitos. La IL-1 estimularía la proliferación de las células T ayudadoras (Th) y la liberación de IL-2. El aumento de IL-2 estimula la aparición de receptores para transferrina, que permiten el paso de zinc y fierro al interior de la célula, finaliza el desarrollo de linfocitos Th y puede activar a las células asesinas naturales (NK) (42). Las NK además de poder interactuar con los anticuerpos (citotoxicidad mediada por anticuerpos), secretan interferón gamma (If- γ) que es amebicida (76). El zinc es capaz de actuar como mitógeno, principalmente de linfocitos Th (35, 38, 40, 77 - 78), tarea en la que puede ser auxiliado por IL-1 y timulina (79 - 80).

Timulina. El factor tímico sérico (FTS) debe unirse al zinc para expresar su actividad biológica. La timulina (FTS+Zn) induce la diferenciación intra y extratímica de las células T (79-80), lo que favorecería a los mecanismos de proliferación ya discutidos.

Sabemos que el zinc en bajas concentraciones, es capaz de estimular la actividad de monocitos y linfocitos (35, 38, 75, 77-79), lo que se ha podido observar tanto *in*

vitro, como in vivo. Así, el zinc generará un estímulo en los mononucleares, sólo cuando la disminución del metal esté ligeramente por debajo de su valor sérico normal; como sucede en la respuesta de fase aguda (67). Si la disminución es sostenida por lapsos superiores a dos semanas, o es muy intensa, sucede lo contrario y el metal ejerce un efecto inhibitor. Esto lo pudimos constatar en un estudio previo (80) realizado en pacientes con cirrosis hepática por alcohol; en ellos, los valores circulantes del metal ($50 \pm 3.3 \mu\text{g/dl}$) fueron inferiores hasta en un 40% a los detectados en la población adulta normal ($86 \pm 4.5 \mu\text{g/dl}$) y la respuesta de sus linfocitos al estímulo con diferentes mitógenos, se observó francamente disminuida.

Los niveles de zinc superiores a los normales sostenidos durante un lapso superior a ocho días, pueden tener un efecto depresor en la inmunidad (81 - 83). En intestino y hepatocitos disminuye su captación pues el sistema de transporte es saturable (66), pero si se utiliza otra vía de administración, o la oral continua, el zinc se volverá a absorber en cuanto el intestino y el transportador respectivo queden libres del metal, de ésta manera los niveles en el organismo podrán permanecer elevados.

Así, se ha observado en humanos, que dosis de zinc cinco veces superiores a la ingesta normal durante más de ocho días, produce una disminución en la quimiotaxis y la fagocitosis (81 - 83). Más tardíamente (15 días) disminuye la proliferación de las células T (83). Se ha mencionado que la estimulación crónica del linfocito T da lugar a IL-2Ralfa, la cual disminuye la concentración de IL-2 celular (23).

III. Protección de la célula blanco.

1. Interferencia con el ión calcio.

El zinc puede enlazarse con algunas de las proteínas que unen y/o transportan calcio (84 - 87); éstas, en ocasiones, tienen una afinidad mayor por el metal que por el calcio (39,86) y pueden tener sitios de unión para el zinc (84 - 85).

-Calregulina. En el hígado de bovino, la calregulina se encuentra cinco veces más concentrada que la calmodulina y en ella existen un sitio para unir al calcio y 14 para unir al zinc (85).

-S-100. Al interacción la S-100 a través del calcio o del zinc con proteínas asociadas a microtúbulos, participa en su ensamble y desensamble (87). De esta manera, el bloqueo de algunos sitios para el calcio ó la unión del zinc a receptores de una proteína, puede disminuir ó modificar su actividad. En ocasiones, al impedir que proteínas transportadoras se unan al calcio, se nulificará la actividad que este complejo ejerce en diferentes estructuras de la célula.

-Canales de calcio. A través del amebaporo se induce un aumento del calcio en la célula huésped (9) y se originan corrientes de voltaje (N, L, T), que son activadas por el calcio y pueden ser bloqueadas por el zinc (88 - 89). El metal se une principalmente a las de tipo T, posiblemente porque los sitios de unión son de más fácil acceso y lo hace más fuertemente que el calcio. Así el zinc, podría mantener a los canales de calcio cerrados iónicamente durante más tiempo (como sucede cuando se activan receptores inhibidores), lo que evitaría la lisis celular.

2. Estabilización de membranas,

La lesión celular causada por stress oxidativo, implica un aumento de OH y Ca intracelular, los que al activar nucleasas y proteasas fragmentan al DNA y alteran proteínas del citoesqueleto. Finalmente se induce la peroxidación lipídica, que la mayoría de las veces es un evento tardío acompañante, más que causante, de la muerte celular (90). Chvapil propuso que el zinc reduce la peroxidación lipídica y estabiliza las membranas a través de mecanismos que disminuyen la oxidación de NADPH (91 - 92). La estabilización de la membrana por este mecanismo se ha visto en plaquetas (92 - 93), leucocitos (94) y lisosomas hepáticos (95 - 96).

De acuerdo con el efecto inhibitor del zinc en el desarrollo del absceso hepático que se observó en este estudio, podemos inferir que:

-En los animales que recibieron una dosis de zinc 48 horas después del reto amibiano, al parecer, se logró el estímulo desencadenante de algunos de los mecanismos defensivos, que en condiciones normales no logran frenar al protozoario.

-En los animales que recibieron once dosis de zinc, éste estímulo empezó a resultar excesivo lo que pudo ocasionar la incipiente depresión de la respuesta inmune. Esta a su vez, favorecería la invasividad tisular amibiana lo que suponemos al observar en el grupo de animales que recibieron 11 dosis una mayor formación de miniabscesos y finalmente por la magnitud del absceso que desarrollaron cuatro de los integrantes de este grupo (Fig. 11).

Tenemos ante nosotros varias áreas de interés, que han recibido poca o ninguna atención para su estudio, lo que debería intensificarse. Estas incluyen:

1) A los mediadores inmunológicos que modifica el protozoario para lograr su evasión y que también podrían ser utilizados por otros parásitos V.gr. IL, PG, LT.

2) A los mecanismos que hipotéticamente señalamos como impelidos por el zinc, interacciones, que podrían ser también modificadas por algunos otros factores para lograr el control de la invasión amibiana.

No podemos dejar de pensar de una manera extrapolable y aplicativa, en la utilidad que la administración de una sola dosis de zinc, exenta de efectos colaterales nocivos, pudiera tener para ayudar a controlar la enfermedad en el humano. De no resultar útil como un "antiamibiano" aislado, pudiera actuar como un auxiliar de otros fármacos o como un "adyuvante" en las manipulaciones inmunológicas, encaminadas a conferir protección contra la amiba y posiblemente a evitar algunos otros procesos patológicos en el huésped.

BIBLIOGRAFIA

Petri, W. Invasiye amebiasis and the galactose-Specific lectin of Entamoeba histolytica. Parasitol. Today 57: 299-306, 1991.

2. Ravdin, J., Moreau, F., Sullivan, J., Petri, W., Mandell, G. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 56: 1505-1512, 1988.

3. Petri, W., Smith, R., Schlesinger, P., Ravdin, J. Isolation of the galactose-binding lectin which mediates the in vitro adherence of Entamoeba histolytica. J. Clin. Invest. 80: 1238-1244. 1987.

4. Talamás-Rohana, P., Meza, I. Interactin between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoeskeleton organization. J. Cell. Biol. 106: 1787-1793, 1988.

5. Young, J., Cohn, Z. Cell mediated killing: a common mechanism. Cell 46: 641-657, 1986.

6. Martínez-Palomo, A. The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. England, 1982, p.55.

7. Ravdin, J. Entamoeba histolytica:from adherence to enteropathy, J. Infect. Dis. 158: 420-429, 1989.

8. Udezulu, I.A., Leitch, G. J. A. membrane-associated neuraminidase in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect. Immun.* **55**: 181-186, 1987.
9. Lynch, E., Rosemberg, I., Gitler, C. An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. *EMBO J.* **1**: 801-804, 1982.
10. Salata, R., Martínez-Palomo, A. Patients treated for amebic liver abscess develop cell mediated immune responses effective *in vitro* against E. histolytica. *J. Immunol.* **136**: 2633-2639, 1986.
11. Denis, M., Chadee, K. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage functions in amoebiasis. *Infect. Immun.* **56**: 3126-3131, 1988.
12. Braga, L., Ninomiya, J., Mc Coy, K., Wiedmer, T., Pham, C., Sonis, P., Petri, W. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of Entamoeba histolytica. *Arch. Med. Res.* **23**: 133, 1992.
13. Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez Medina, L., Montfort, I., Becker, I. Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica. *Biochem. Parasitol.* **26**: 87-98.
14. Talamás-Rohana, P., Rosales-Encina, M., Gutiérrez, M., Hernández, V. Identification and partial purification of an Entamoeba histolytica membrane protein that binds fibronectine. *Arch. Med. Res.* **23**: 119-123, 1992.
15. Kretschmer, R., Rico, G., Diaz-Guerra, O. The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by Entamoeba histolytica raises AMPc in human monocytes. *FASEB J.* **4**: 3087-3091, 1990.

16. Wang, W., Chadee, K. *Entamoeba histolytica* alters arachidonic acid metabolism in macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Immunology* 76: 242-245, 1992.
17. Lin, J., Keller, K., Chadee, K. *Entamoeba histolytica* proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages. *Immunology* 78: 291-297, 1993.
18. Bygrave, F., Altin, J., Dieter, P., Karjalainen, A. Action of calcium-mobilizing stimuli in the perfused rat liver. En Heilmann, C. (ed): *Calcium Dependent Processes in the Liver*. MTP Press, Lancaster, 1988, pp 91-104.
19. Endres, S., Fulle, H., Sinha, B. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor and interleukin-1 in human mononuclear cells. *Immunology* 72: 56-60, 1991.
20. Taffet, S., Shurtleff, S. Identification of multiple regulatory regions in the TNF gene. *Cytokine* 1: 96-98, 1989
21. Alford, R. Metal cation requirements for phytohaemagglutinin induced transformation of human peripheral blood lymphocytes, *J. Immunol.* 104: 698-701, 1970.
22. Fradelzi, D., Chouaib, S. Mecanismes regulateurs de la production d'IL-2 chez l'homme In: *Les Interleukines*. Bull. Inf. Soc. Francaise d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, 1983, pp 45-55.

23. Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Co., 2nd ed. USA.1994, p. 252.
24. Ortíz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., Capín, N. Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 127-134, 1975.
25. Ortíz-Ortiz, L. Capín, N., Sepúlveda, B., Zamacona, G. Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34: 10-18, 1978.
26. Ishaq, M., Padma, M. Antigenic variation among strains of Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 74: 373-375, 1980.
27. Aust-Kettis, A., Sundquist, K. Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response I. Capping and endocytosis: influence of inhibiting and accelerating factors; variation of the expression of surface antigens. Scand. J. Immunol. 7: 35-44, 1978.
28. Ravdin, J., Murphy, C., Guerrant, R., Long-Krug, S. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 152: 542-549, 1985.
29. Long-Krug, S., Fischer, K., Hysmith, R., Ravdin, J. Phospholipase A enzymes of Entamoeba histolytica: description and subcellular localization. J. Infect. Dis. 152: 536-541. 1985.

30. Ravdin, J., Croft, B., Guerrant, R. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 377-381, 1980.
31. Agre, P., Virshup, D., Bennett, V. Bepridil and cetiedil: vasodilatadors which inhibit Ca dependent calmodulin interactions with erythrocyte membranes. J. Clin. Invest. 74: 812-820, 1984.
32. Ravdin, J. Sperialakis, N., Guerrant, R. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of E. histolytica. J. Infect. Dis. 146: 335-340, 1982.
33. Prasad, A. Zinc deficiency in man. Am. J. Dis. Child. 130:259-263, 1976.
34. Halsted, J., Smith, J. Plasma zinc in health and disease. Lancet 1: 322-26, 1970.
35. Berger, N., Skinner, A. Characterization of lymphocyte transformation induced by zinc ions. J. Cell. Biol. 61: 45-55, 1974.
36. Dardenne, M. Pleau, J., Lefrancier, P., Bach, J. Role of zinc and other metals in the biological activity of the serum thymic factor. Seances Acad. Sci. 292:793-797, 1981.
37. Allen, J., Perri, R., Mc Clain, C, Kay, N. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte citotoxicity induced by zinc deficiency. J. Lab. Clin. Med. 102: 577-581, 1983.
38. Williams, R., Loeb, L. Zinc requirement for DNA replication in stimulated human lymphocytes. J. Cell. Biol. 58: 594-602, 1973.

39. Serrano, L., Domínguez, E., Avila, J. Identification of zinc binding sites of proteins: zinc binds to the amino-terminal region of tubulin. *Anal. Biochem.* 172:210 - 215, 1988.
40. Krishna, M. Schwartz, S. Zinc modulates mitogenic responses of human lymphocytes by affecting structures influenced by cytochalasin B. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16: 463-467, 1980.
41. Gaskin, F. *In vitro* microtubule assembly regulation by divalent cations and nucleotides. *Biochem.* 20: 1318-322,1981.
42. Wells, M. Spectral perturbations of Crotalus adamanteus phospholipase A2 induced by divalent cation binding. *Biochem* 12: 1081-1087, 1973.
43. Chvapil, M. Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med. Clin. North. Am.* 60: 799-805, 1976.
44. Baudier, J., Gerard, D. Ions binding to S100 proteins: structural changes induced by calcium and zinc on S100 and S100b proteins. *Biochem.* 22: 3360-3369, 1990
45. Diamond, L. Axenic cultivation of Entamoeba histolytica, *Science* 134:336, 1961.
46. Ortiz-Ortiz, L. Ximénez, C., Mendoza, C., Michalek, E., Melendro, E., Oliva, A. Entamoeba histolytica: specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61: 390-397, 1986.

47. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680-684, 1970.
48. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 76: 4350-4355, 1979.
49. Gosset, W., ("Student")." The Probable Error or a Mean", *Biometrika* 6: 1-25, 1908.
50. Mann, H., Whitney, D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18: 50-65, 1947.
51. Wayne, D. Bioestadística. Limusa, (Ed.), Mexico, 1993,p. 188-219.
52. O'Dell, B. Cysteine-rich intestinal protein (CRIP) a new intestinal zinc transport protein. *Nutr. Rev.* 50:232-233, 1992.
53. Berg, J. Zinc fingers and other metal binding domains. *J. Biol. Chem.* 265: 6513-6516,1990.
54. Zhang, Y., Aley, S. Stanley, S., Gillin, F. Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of Giardia lamblia. *Infect. Immun.* 61: 520-524, 1993.
55. Osorio, L. M., Pico, T. Luaces, A. Circulating antibodies to histolysaina, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica, in amoebic liver abscess patients. *Parasitology* 105: 207-210, 1992.

56. Hempe, J., Cousins, R. Cysteine-rich intestinal proteins binds zinc during transmucosal zinc transport. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 88: 9671-9674, 1991.
57. Freemont, P. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. Ann. N. Y. Acad. Sci. 684: 174-192, 1993.
58. Ratka, M Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn⁺⁺. J. Virol. 63: 3954-3958, 1989.
59. Geller, B., Winge, D. Rat liver copper, zinc and superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 257: 8945-8950, 1982.
60. Larsson, H., Wallin, M., Edstrom, A. Induction of a sheet polymer of tubulin by Zn⁺⁺. Exp. Cell. Res. 100: 104-108, 1976.
61. Schanne FAX, Kaune, A., Young, E., Farber, J. Calcium dependence of toxic cell death. Science 206: 700-702, 1979.
62. Luaces, A., Barrett, A. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. Biochem. J. 250: 903 - 907, 1988.
63. Keene, W., Petit, M., Allen, S., MC Kerrow. J. The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. Biochem. J. 250: 903-909, 1988.

64. Espinoza-Cantellanos, M., Martinez-Palomo, A. The plasma membrane of Entamoeba histolytica: structure and dynamics Biol. Cell 72: 189-200, 1985.
65. Ximénez, C., Leyva, O., Morán, P. Ramos, F., Melendro, E., Ramiro, M., Martínez, M., Muñoz, O., Kretschmer, R., Arellano, J. Entamoeba histolytica: antibody response to recent and past invasive events. Ann. Trop. Med. Parasitol. 87: 31-39, 1993.
66. Taylor, J., Simons, T. The mechanism of zinc uptake by cultured rat liver cells. J. Physiol. 474: 55-64, 1994.
67. Andrew, S., Gauldie, J. The acute phase protein response during parasitic infection. Parasitol. Today 7: 7-12, 1991.
68. Coleman, J. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu. Rev. Biochem. 61: 897-946, 1992.
69. Turner, S., Turner, R., Smith, D., Johnson, J. Effects of heavy metal ions on phospholipid metabolism in human neutrophils: Relationship to ionophore-mediated cytotoxicity. Prostaglandins 32: 919-922, 1986.
70. Mapes, C., Bailey, P., Matson, Ch., Hauer, E., Sabocinski, P. In vitro and in vivo actions of zinc ion affecting cellular substances which influence host metabolic responses to inflammation. J. Cell. Physiol. 95: 115-119, 1978.
71. Chanmugan, P., Wheeler, C., Hwang, D. Effects of zinc deficiency on the formation of eicosanoids in rat platelets. Federation Proc. 42: 809-815, 1983.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

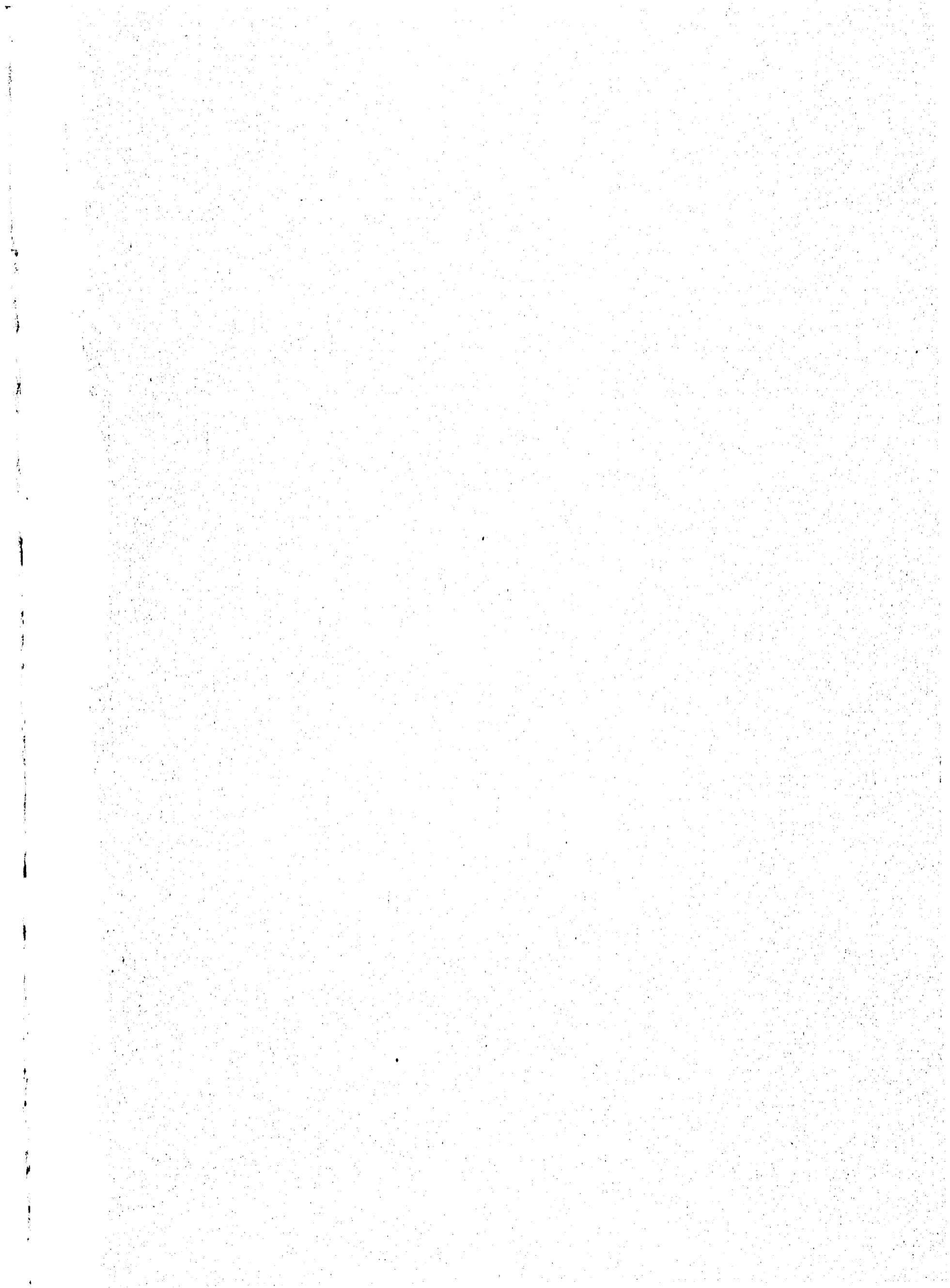
72. Everett, G., Apgar, J. Effect of zinc deficiency on Prostaglandin F2 alpha and E in the rat. In: Bratter, P. Schramel, P. eds. Trace Elements Analytical Chemistry in Medicine and Biology vol. 2, New York, Walter de Gruyter. 1983,219-224.
73. Cunnane, S., Nassar, B., Mc Adoo, K., Horrabin, D. Zinc reduce the release of prostaglandins and polyunsaturated fatty acids from the rat mesenteric vascular bed perfused *in vitro*. Hurley, L.S. ed. Trace Element Metabolism in Man and Animals. Vol. 6 New York: Plenum Press, 1988, pp.60-68..
74. Steinhauser, H. Batsford, S., Schollemeyer, P, Kluthe, R. Studies on tromboxano beta 2 and prostaglandin E2 production in the course of murine autoimmune disease: inhibition by oral histidine and zinc supplementation. Clin. Nephrol. 24: 63-69, 1985.
75. Scuderi, P. Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. Cell. Immunol. 126: 391-405, 1990.
76. Salata, R., Murray, B., Rubin, B., Ravdin, I. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for Entamoeba histolytica trophozoites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 72-78, 1987.
77. Ruhl, H., Kirchner, H., Bochert, G. Kinetics of the Zn⁺⁺ Stimulation of human peripheral lymphocytes *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 1089-1092, 1971.
78. Kirschner, H., Salas, M. Stimulation of lymphocytes with zinc ions. Methods Enzymol. 150: 112-116, 1987.

79. Bach, J., Dardenne, M., Pleau, J., Rose, J. Biochemical characterization of a serum thymic hormone. *Nature (Lond)* 266: 55-56, 1977.
80. Vega Robledo, G., Lifshitz Guinzberg, A., Ramos García, C., Ortiz-Ortiz L. Patients with hepatic cirrhosis: Altered lymphocyte response to mitogens and its relation with plasmatic zinc, albumin and transferrin. *Arch. Med. Res.* 25: 5-9, 1994.
81. Prasad, A., Meftah, S., Abdallah, J., Kaplan, J., Brewer, G., Bach, J., Dardenne, M. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J. Clin. Invest.* 82: 1202-1210, 1988.
82. Blazseck, I., Mathe, G. Zinc and immunity. *Biomed. Pharmacother.* 38: 187-193, 1984.
83. Chandra, R. Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA* 252: 1443-1446, 1984.
84. Picello, E., Damiani, E., Magreth, A. Low affinity Ca^{++} binding sites versus Zn^{++} binding sites in histidine-rich Ca^{++} binding protein of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 659-667, 1992.
85. Csermely, P. Zn^{++} forms complexes with higher kinetical stability than calcium. S-F-BAPTA as a good example. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 833-844, 1989.
86. Waisman, D., Salimath, B., Anderson, J.: Isolation and characterization of CAB-63 a novel calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* 260: 1652-1660, 1986.

87. Donato, R. S-100 proteins. *Cell. Calcium Z*: 123-145, 1986.
88. Winegar, J. Voltage-dependent block by zinc of single calcium channels in mouse myotubules. *J. Physiol. (Lond)* 425: 563-78, 1990.
89. Buselberg, D., Evans, M., Carpenter, D., Haas, H. Zinc (Zn⁺⁺) blocks voltage gated calcium channels in cultured rat dorsal root ganglion cells. *Brain Res.* 593: 77-81, 1992.
90. Halliwell, B., Chirico, S., Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 7155-7255, 1993.
91. Chvapil, M., Ludwig, J., Spies, G., Halladay, S. Inhibition of NADPH oxidation and oxidative metabolism of drugs in liver microsomes by zinc. *Biochem. Pharmacol.* 24: 917-921, 1975.
92. Chvapil, M. Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med. Clin. North. Amer.* 60: 799-806, 1976.
93. Chvapil, M. New aspects in the biological role of zinc: A stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci.* 13: 1041-1044, 1973.
94. Marone, G., Findlay, S., Lichtenstein, L. Modulation of histamine release from human basophils *in vitro* by physiological concentrations of zinc. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 217: 292-296, 1981.

95. Chvapil, M, Ryan, J., Zukoski, C. The effect of zinc and other metals on the stability of lysosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140: 642-645, 1972.

96. Camps, J. Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration. *Clin. Sci.* 83: 6395-700, 1992.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO - DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS
SUBDIRECCION DE SERVICIOS BIBLIOTECARIOS, DEPARTAMENTO DE TESIS
RELACION TESIS DEL AÑO: 1 9 9 5

CLAVE: 11281

UNIVERSIDAD:

Página 1

Facultad: Facultad de Medicina
Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas

A U T O R

T I T U L O

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1.-Becker Fauser, Ingeborg Dorothea | Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal contra la proteínasa amibia |
| 2.-Lascurain Ledesma, Ricardo | Glicosilación de marcadores de superficie de linfocitos T en estados anérgicos |
| 3.-Lopez Ozuna, Marta | Interacción de eosinófilos y Entamoeba histolytica |
| 4.-Quirarte, Gina Lorena | Estudio sobre los efectos de niveles altos y bajos de reforzamiento sobre la amnesia |
| 5.-Rodriguez Maldonado, Emma | Metabolismo de hormonas esteroides en las células de la teca externa de folículos pr |
| 6.-Solana Figueroa, Rafael | Papel del sistema serotoninérgico estriatal en procesos de retención de la conducta |
| 7.-Vega Robledo, Gloria Bertha | Efecto del zinc sobre la patogenicidad de Entamoeba histolytica |