

11281
3
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Interacción de eosinófilos y Entamoeba histolytica

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS,
ÁREA INMUNOLOGÍA
PRESENTA**

MARTA LÓPEZ OZUNA

DIRECTOR DE TESIS : DR. ROBERTO KRETSCHMER

CIUDAD UNIVERSITARIA, 1995

FALLA DE ORIGEN

**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.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTO	5
RESUMEN	6
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN. EL EOSINÓFILO	8
Historia	9
Evolución y filogenia	13
Estructura interna	15
Ciclo celular y vida media	16
Técnicas de identificación y aislamiento	17
Activación de los eosinófilos	20
Eosinófilos normodensos e hipodensos	20
EL EOSINÓFILO Y SU ASOCIACIÓN CON DIVERSAS ENFERMEDADES	21
Asma	21
Eosinofilia pulmonar	27
Síndrome de Churg-Strauss	29
Síndrome hipereosinofílico (SHE)	30
Síndrome de eosinofilia-mialgia	33
Rinitis alérgica	34
Síndromes asociados con urticaria y edema	36
Dermatitis atópica	38
EL EOSINÓFILO Y LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS	40
Infecciones con ectoparásitos	40
Infecciones con endoparásitos	41
LOS LEUCOCITOS Y LA <u>Entamoeba histolytica</u> (<u>E. histolytica</u>)	52
La reacción inflamatoria en la amibiasis	52
Interacción <u>in vitro</u> entre leucocitos y <u>E. histolytica</u>	55

Neutrófilos	55
Basófilos	58
Linfocitos	59
Macrófagos	60
Eosinófilos	63
IL-5 Y LA PRODUCCIÓN DE EOSINÓFILOS	65
Producción de eosinófilos <i>in vitro</i>	65
Producción de eosinófilos <i>in vivo</i>	66
MODELOS ANIMALES DE EOSINOFILIA	68
Conejos, monos, perros, carneros	68
Rata	69
Cobayo	70
Ratón	71
Gerbos	73
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	74
CAPÍTULO III. ARTÍCULO : DESTRUCTION OF NORMAL HUMAN EOSINOPHILS BY <i>E. histolytica</i> . PARASITE IMMUNOL. 1989, 11: 403-411.	
Introducción	76
Resultados y discusión	78
CAPÍTULO IV. ARTÍCULO : THE DESTRUCTION OF VIRULENT <i>E.</i> <i>histolytica</i> BY ACTIVATED HUMAN EOSINOPHILS. PARASITE IMMUNOL. 1992, 14: 579-586.	
Introducción	81
Resultados y discusión	83
CAPÍTULO V. ARTÍCULO : <i>E. histolytica</i> AND EOSINOPHILS. II. TESTICULAR LESIONS PRODUCED BY AMEBAS IN EOSINOPHILIC RATS. ARCH. INVEST. MÉD. (MÉX.) 1986, 17 (S) : 247-249.	
Introducción	86
Resultados y discusión	88

CAPÍTULO VI. ARTÍCULO : ANTIGEN INDUCED EOSINOPHILIA PROTECTS	
GERBILS (<i>Meriones unguiculatus</i>) AGAINST EXPERIMENTAL	
AMEBIC ABSCESS OF THE LIVER. ARCH. MED. RES. VOL.26,	
SUPL. En prensa.	
Introducción	89
Resultados y discusión	92
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	93
ABREVIATURAS	100
REFERENCIAS	103

Este trabajo de tesis produjo cuatro artículos, tres de ellos publicados y uno en proceso de publicación; los cuatro se presentan en capítulos comentándose los resultados y la discusión. Los métodos utilizados se pueden leer en las copias de los sobretiros y en el manuscrito adjunto. Además se envió a publicación un capítulo de libro cuya referencia aparece abajo y cuya parte medular aparece en la introducción.

ARTÍCULOS PUBLICADOS :

- 1. M. López-Osuna and R. Kretschmer. 1989. Destruction of normal human eosinophils by *E. histolytica*. Parasite Immunol. 11:403-411.**
- 2. M. López-Osuna, R. Pérez-Tamayo, P. Frenk and R. Kretschmer. 1990. *E. histolytica* and eosinophils. II. Testicular lesions produced by amebas in eosinophilic rats. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 21:263-265.**
- 3. M. López-Osuna, J. Arellano and R. R. Kretschmer. 1992. The destruction of virulent *E. histolytica* by activated human eosinophils. Parasite Immunol. 14: 579-586.**
- 4. Juan R. Velázquez, Patricia Llaguno, Jorge Fernández-Díez, Martha Pérez, Jorge Arellano, Martha López-Osuna and Roberto R. Kretschmer. Antigen induced eosinophilia protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amebic abscess of the liver. Arch. Med. Res. Vol. 26, Supl. En prensa.**
- 5. López-Osuna, M. 1995. The role of Leucocytes in the control of *Entamoeba histolytica* infection. En: Amoebiasis and Giardiasis. N. L. Pal, ed. Advances of Parasitology. Enviado a publicación.**

AGRADECIMIENTO

La mitad de este trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, donde fuimos generosamente acogidos después del terremoto de 1985, por lo que expreso al Jefe del Departamento, Dr. Ruy Pérez-Tamayo y a sus colaboradores, mi profundo agradecimiento. Esta investigación fue financiada por CONACYT No. PCSABNA 021552 y el Fondo de Apoyo a Programas Institucionales de Investigación Médica, IMSS.

RESUMEN

Los leucocitos humanos, al enfrentarse *in vitro* a una cepa virulenta, de *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS), ponen de manifiesto la capacidad lítica del parásito. Así, en su confrontación con la amiba, los neutrófilos son destruidos igual que los mononucleares y los monocitos no activados; pero si éstos últimos se activan (con citocinas, fMLP. etc.), logran lisar a la amiba aunque al final sucumban en el proceso. Teniendo en cuenta el papel efector de los eosinófilos al enfrentarse con ciertos helmintos, nos propusimos investigar el comportamiento de esta célula en su interacción *in vitro* e *in vivo* con la amiba, a fin de conocer su posible papel durante el proceso. Nuestros resultados señalan que los eosinófilos normales humanos marcados con cromio 51, *in vitro*, en las proporciones de 10:1 y 200:1, eosinófilos: amiba; son lisados por el parásito como se observa con los neutrófilos, aún en presencia de anticuerpos anti-amiba y complemento.

Los eosinófilos activados con fMLP, por el contrario pueden destruir al parásito, como hacen los macrófagos activados, y también como ellos, los eosinófilos activados son eliminados al término de la incubación.

El efecto de los eosinófilos activados se evaluó *in vivo* mediante la producción de animales eosinofílicos enfrentados al parásito. Desarrollamos un modelo de

eosinofilia en gerbos (*Meriones unguiculatus*) a los que inoculamos la *E. histolytica* por vía intraportal. Se hicieron observaciones de una fase temprana del absceso hepático amibiano, esto es a las 6, 24 y 96 h y de una fase tardía, a los 45 días postinoculación. También se hicieron pruebas para detectar la presencia de IL-5 en la circulación. Los datos obtenidos fueron similares tanto en el grupo experimental eosinofílico como en el de testigos a las 6 y 24 h. A partir de las 96 h postinoculación, se observaron diferencias microscópicas en el tamaño y número de los abscesos hepáticos presentes en los diferentes grupos experimentales. En la fase tardía (0-45 días) se pudo observar una mejor y significativa sobrevida en los gerbos eosinofílicos con respecto a los normales. En cuanto a la IL-5 no se encontró una modificación anormal.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

EL EOSINÓFILO

Comparados con el neutrófilo, los basófilos y eosinófilos PMN (polimorfonucleares) han estado un tanto a la zaga de nuestros conocimientos quizás porque para empezar, su número relativo en la sangre es bajo, pero también porque, aparentemente, sus funciones son bastante diferentes a las de su ancestro común, el neutrófilo. Si el neutrófilo puede etiquetarse como el " profesional " de la fagocitosis y el basófilo como un almacén de los más diversos mediadores, el eosinófilo aún busca su nicho preciso en la Inmunobiología. Fagocita como el neutrófilo, libera su propio repertorio de enzimas líticas, modula los procesos alérgicos y sin embargo, su descripción funcional no puede cargarse a ninguno de los dos extremos.

HISTORIA

En 1846, W. T. Jones fue el primero en observar células granuladas en la sangre cuando añadió agua o ácido a la preparación celular para " hinchar las células " y así distinguir su núcleo, diferenciándolas de los eritrocitos en la sangre. Como los microscopios de esa época eran todavía muy simples y las preparaciones no se teñían, no pudo hacer una distinción mejor de las mismas células granuladas (Jones, 1846). Fue Paul Ehrlich quien, al presentar su artículo titulado " Über die spezifischen Granulationen des Blutes " ante la Sociedad Fisiológica de Berlín el 17 de enero de 1879, describió las propiedades tintoriales del eosinófilo (Ehrlich, 1879a), iniciando de este modo los estudios sobre esta célula que hoy es una figura clave en la Inmunoparasitología y que tiene gran importancia en el asma, alergias y otras enfermedades. Ehrlich mostró una visión extraordinaria sobre el eosinófilo sugiriendo, por ejemplo, que estas células tienen su origen en la médula ósea (Ehrlich and Lazarus 1900) y que ejercen su función en los tejidos (Ehrlich, 1879b). Gracias al empleo de la eosina para teñir células pudo determinarse la diferencia entre el neutrófilo y el eosinófilo debido a la característica tinción de los gránulos de este último. Ahora sabemos que la eosina tiñe a los eosinófilos porque éstos poseen gránulos que contienen proteínas marcadamente catiónicas las que se unen con preferencia a colorantes de carga negativa (Spry, 1988).

Los primeros estudios realizados después del descubrimiento del eosinófilo los hizo Gollasch en 1889 al examinar frotis de esputos de pacientes con asma (Gollasch, 1889), más tarde se observaron eosinófilos en frotis de sangre periférica de pacientes con anquilostomiasis (Crosby, 1985), en los de pacientes con enfermedades de la piel (urticaria, psoriasis, pénfigo) (Canon, 1892; Neusser, 1892), con enfermedades malignas (Reinbach, 1893) y con triquinosis (Brown, 1898). Desde entonces ha ido en aumento la literatura sobre la presencia del eosinófilo en éstas y otras enfermedades, pero el inicio del conocimiento de las características, propiedades y funcionamiento de esta célula tuvo su gran comienzo en los años 60's al elaborarse técnicas cada vez más específicas para su aislamiento.

Archer y Hirsch fueron los primeros que aislaron y probaron la actividad enzimática de los gránulos de los eosinófilos de caballo observando la desgranulación de las células y la consecuente liberación de enzimas lisosomales (Archer and Hirsch, 1963a; Archer and Hirsch, 1963b). Posteriormente, el grupo de Palade mediante microscopía electrónica, encontró estructuras cristaloides dentro de los gránulos de eosinófilos de rata y de humanos (Miller, de Harven and Palade, 1966). Los experimentos de Austen ayudaron a definir los constituyentes del eosinófilo presentes en reacciones de hipersensibilidad

inmediata, gracias a su capacidad para interactuar con células cebadas (Goetzi, Wasserman and Austen, 1975).

En Cambridge, Kay y su grupo trabajaron en la producción de factores quimiotácticos específicos para los eosinófilos; y fue durante una estancia en el laboratorio de Austen que Kay informó sobre el ECF-A (factor quimiotáctico de la anafilaxis para eosinófilos) (Kay, Stechschulte and Austen, 1971; Goetzi and Austen, 1977). Estas observaciones incrementaron el interés por las acciones que parece ejercer el eosinófilo en el asma y en las enfermedades alérgicas (Kay, 1990). Mientras tanto, se comenzaron a obtener colonias de eosinófilos humanos *in vitro* (Chervenick and Boggs, 1971; Iscove et al., 1971), y no se tardó en mostrar que los eosinófilos eran diferentes de los neutrófilos en muchos otros aspectos. En 1967 en Oxford, Basten y Beeson comenzaron estudios en ratas con triquinosis experimental para ver el desarrollo de la eosinofilia; estas observaciones los guiaron hacia el descubrimiento de un factor de crecimiento secretado por linfocitos T (Basten and Beeson, 1970) y más tarde caracterizado por Sanderson (Sanderson, Warren and Strath, 1985). Estos trabajos culminaron cuando en 1988 se encontró que este factor era idéntico a la IL-5 (interleucina 5) (Campbell et al., 1988). Spry publicó sus estudios sobre la vida media del eosinófilo en la sangre y la identificación del mismo en los tejidos (Spry, 1971a; Spry, 1971b) y no hay que olvidar las importantes contribuciones de Gleich,

realizadas durante 22 años, e iniciadas con la purificación de la MBP (proteína básica principal) en eosinófilos de cobayo (Gleich, Loegering and Maldonado, 1973) y más tarde de humano (Gleich et al., 1976; Gleich and Adolphson, 1988).

Mientras tanto en Suecia se purificaron las ribonucleasas del eosinófilo y se estandarizó el primer método para detectar las proteínas de los gránulos de los eosinófilos en el suero (Olsson and Venge, 1972). En la clínica, los estudios realizados en pacientes eosinofílicos dieron como resultado la definición del síndrome hipereosinofílico, término propuesto por Hardy y Anderson en 1968 para designar un grupo de enfermedades de causa desconocida y caracterizadas por hipereosinofilia (Hardy and Anderson, 1968). También se ha asociado a la eosinofilia con el angioedema en el humano (Katzen et al. 1988). Butterworth describió sus trabajos sobre la muerte del Schistosoma mansoni como dependiente del eosinófilo, iniciando una serie de hallazgos sobre el tema que sirvieron como base para estudiar el papel de esta célula en la inmunidad parasitaria (Butterworth et al., 1975). Se han propuesto otros papeles importantes para el eosinófilo, incluyendo el de célula pro-inflamatoria que interviene en la defensa del huésped contra organismos dañinos como los nemátodos, y la capacidad de secretar sus compuestos granulares, mediadores lípidos recién formados y productos del metabolismo oxidativo que afectan a células y tejidos adyacentes a la inflamación (Spry, 1988); además, se ha mostrado ex-

perimentalmente que puede inducir cambios en la permeabilidad de los vasos sanguíneos del útero de ratas (Tchermitchin, 1973).

EVOLUCIÓN Y FILOGENIA

En 1988, Spry hizo un análisis exhaustivo sobre la presencia de eosinófilos en diferentes animales, mencionando que no se han descrito eosinófilos o alguna célula similar en los insectos o en los invertebrados en general; mientras que los vertebrados invariablemente parecen poseerlos, incluso los peces cartilaginosos más primitivos (Spry, 1988). Entre los peces, se han reportado eosinófilos en el tiburón nodriza (Hyder, Cayer and Petley, 1983) y en los peces torpedo (*Torpedo marmorata* Risso y *Torpedo ocellata* Rafinisque) (Grimaldi et al., 1983). Curiosamente los eosinófilos parecen estar ausentes en los peces bruja, descendientes directos de los primeros peces y que se cuentan entre los vertebrados más primitivos aún en existencia (Linthicum, 1975). La mayoría de los peces no presentan cristaloides en los gránulos de sus eosinófilos pero sí se observan en los eosinófilos del tenca (Kelenyi and Nemeth, 1969) y el locha (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Ishizeki et al., 1984). Eosinófilos sin cristaloides en sus gránulos pueden observarse en la rana y el tritón (Kelenyi and Nemeth, 1969; Meseguer, Lozano and Agulleiro, 1985). Entre los reptiles, se han descrito eosinófilos en tortugas y lagartos (Kelenyi and Nemeth, 1969) y en el cocodrilo americano

(Mateo, Roberts and Enright, 1984).

Los gránulos de los eosinófilos de pollos y pichones no contienen cristaloides (Keleny and Nemeth, 1969) pero sí se han observado éstos en los eosinófilos de los patos (Maxwell, 1978; Maxwell, 1979).

Entre los mamíferos existen eosinófilos en los bovinos (Chambers et al., 1985), en perros (Garbed, O'Morchoe and O'Morchoe, 1980), gatos (Zinkl, 1981), caballo (Allen, Kane and Powell, 1984), rata (Wolford et al., 1987), ratón (Johnson et al., 1979); en cobayos sobre todo en líquido peritoneal (Lindor et al., 1981), en hamsters (*Crisetidae*) (Eggert and Germain, 1980) y en el gerbo (*Meriones unguiculatus*) (Weeks and Glomski, 1978).

La presencia de eosinófilos en tantas especies aún no prueba que sus funciones sean similares, amén de que hay variantes (i.e. gránulos cristaloides) entre diversas especies; de ahí el interés de establecer una comparación filogenética funcional del eosinófilo. En 1991, Sun y col. hicieron estudios comparativos de eosinófilos en diferentes especies usando cobayos, macacos y humanos. Estos autores encontraron que los eosinófilos de cobayos, después de un estímulo con ionóforo de calcio, liberaban TXB₂ (tromboxano B₂) y LTB₄ (leucotrieno B₄) mientras que los de monos y humanos producían LTB₄, LTC₄ (leucotrieno C₄) y 5-HETE (ác. 5-hidroxi-eicosatetraenoico) (Sun et al., 1991). Se ha reportado también que la MBP del eosinófilo de cobayo tiene una secuencia

homóloga con la del humano (Aoki et al., 1991). Con la aparición de la tecnología molecular, se demostró que algunos antropoides, incluyendo al hombre, tienen dos genes responsables de las proteínas granulares del eosinófilo, la EDN (neurotoxina) y la ECP (proteína catiónica), que probablemente surgieron por duplicación genética hace cerca de 25-40 millones de años (Hamann et al., 1990). En 1956, Undritz publicó que algunos animales como los rinocerontes, hienas y algunos pájaros, no contenían EPO (peroxidasa) y también que algunos eosinófilos en las hienas no se tiñen con eosina (Undritz, Lang and Van Oye, 1956).

ESTRUCTURA INTERNA

Miller en 1966 (Miller, de Harven and Palade, 1966) y más recientemente Sokol (Sokol et al., 1991) publicaron un análisis morfométrico del eosinófilo en microscopía electrónica. Estos autores reportaron un diámetro de 8 μ para el eosinófilo, que tiene un núcleo compuesto por dos lóbulos que aumentan en número en algunas enfermedades, éste ocupa una quinta parte de la célula y los gránulos la quinta parte del citoplasma. Se sabe poco de la organización del citoplasma de los eosinófilos pero se ha visto que contiene cuerpos lípidos. Las proteínas granulares de los eosinófilos humanos se distribuyeron en dos clases: una, peroxidasa positiva que contiene cristaloides formados por la MBP; y la

otra, peroxidasa negativa, quizá debido a la carencia de cristaloides y a su baja densidad (Venge, 1993). Ambas clases de proteínas o gránulos contienen ECP (Olsson et al., 1977) y EPX/EDN (proteína X / neurotoxina) (Slifman et al., 1989) además de EPO. Una proteína extracelular, la CLC (cristales de Charcot-Leyden), se libera cuando hay infiltración eosinofílica en tejidos (Weller, Bach and Austen, 1984). Además de estas proteínas, el eosinófilo humano contiene otras actividades enzimáticas como la colagenolítica, elastasa, histaminasa, fosfolipasa y arilsulfatasa B (Weller and Austen, 1983). Estas actividades pudieran estar relacionadas a un papel regulador en la alergia mientras que la producción de citocinas parece dar base a la noción de sus actividades pro-inflamatorias (Venge, 1993).

CICLO CELULAR Y VIDA MEDIA

Los eosinófilos son células predominantes en los tejidos y una vez alojados en ellos no regresan a la circulación. La médula ósea normal contiene 3.0-3.5% de eosinófilos (Spry, 1993). Se ha calculado que el tiempo de emergencia de los eosinófilos (desde la última división celular) en la sangre periférica de individuos sanos, es de aproximadamente 2.5 días (Spry, 1993), que el tiempo promedio de maduración intramedular y almacenamiento es de 103 h (Steinbach et al., 1979) y que su migración hacia la circulación es de 3.5 días (Parwaresch,

Walle and Ardnt, 1976). En la sangre periférica, la vida media del eosinófilo es de 18 ± 2.1 h comparado con 6-7 h del neutrófilo (Spry, 1993) y tiene un tiempo promedio de tránsito de 26 ± 3 h que es similar al de los neutrófilos (Steinbach et al., 1979). Diversas observaciones han sugerido que en los individuos con eosinofilia la vida media de estas células se prolonga, aunque no se sabe cuánto. También se desconoce el tiempo que los eosinófilos sobreviven en los tejidos pero se supone que permanecen allí por varios días (Spry, 1993). Los histólogos han mostrado que los sitios más comunes de residencia del eosinófilo en los tejidos son los epitelios columnares. Se ha logrado la sobrevivencia de los eosinófilos humanos en cultivo por más de una semana añadiendo factores de crecimiento como GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), IL-3 (interleucina 3) e IL-5 (Tai, Sun and Spry, 1991) o en presencia de un medio acondicionado de células epiteliales (Rothenberg et al., 1987).

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS EOSINÓFILOS

Entre las técnicas de tinción debe mencionarse la técnica de Romanowsky para identificar eosinófilos en la sangre (Horobin and Walter, 1987), mientras que el método de hematoxilina y eosina se usa preferentemente para teñir secciones

de tejido. Otro colorante es el de Hansen que se prefiere para la tinción de eosinófilos en orina y esputo (Nolan, Anger and Kelleher, 1986).

En realidad, la tinción más usada en frotis de sangre periférica para la identificación de eosinófilos, muy efectiva en nuestra propia experiencia, es la modificación de Wright-Giemsa (Ring, 1975). La forma correcta de contar células debe hacerse determinando el número absoluto de eosinófilos teñidos con una solución acuosa de eosina en una cámara de Neubauer en el microscopio (Spry, 1988). Los métodos automatizados para la cuenta de estas células son bastante precisos y actualmente muy usados.

La viabilidad de los eosinófilos y los leucocitos en general pueden determinarse por la exclusión del tripán azul, un colorante vital que tiñe las células muertas (Metcalf et al., 1986). También puede usarse la citometría de flujo que cuenta las células teñidas con bromuro de etidio (Crosby, 1985).

Desde que en 1962 se publicó el primer método de aislamiento de los eosinófilos en sangre humana por centrifugación en gradientes de densidad de albúmina (Alexander and Spriggs, 1962), han sido numerosas y cada vez más sofisticadas las técnicas empleadas con este fin. De ellas pueden citarse:

la técnica del metrizoato de sodio (Day, 1970)

del diatrizoato de sodio (Mahmoud, Kellermeyer and Warren, 1974)

la técnica de la Metrizamida hipertónica (Vadas et al., 1979)

la técnica del Nycodenz (Brattig, Medina-De la Garza and Tischendorf, 1987)

las técnicas del Percoll (Gärtner, 1980; Shult et al., 1985; Yazdanbakhsh et al., 1987; Marshall, Shult and Busse, 1988)

y entre los métodos que no dependen de la densidad sino de la remoción de los neutrófilos contamos con:

la técnica de fagocitosis del hierro carbonilo (Sher and Glover, 1976)

la técnica de fase sólida de IgG (Tai and Spry, 1977)

la técnica de lana de vidrio (Parrillo and Fauci, 1978)

el sorteador celular (Weil and Chused, 1981)

el uso de fMLP 1 μm (Roberts and Gallin, 1985) y 10 nm (Koenderman et al., 1988)

el sistema separador magnético (MACS) (Hansel et al., 1989; Bach, Brashler and Sanders, 1990; Hansel et al., 1991).

De todas estas técnicas las más usadas actualmente son las que utilizan la centrifugación en gradientes de densidad con Metrizamida o Percoll y el aislamiento de eosinófilos por medio del MACS.

ACTIVACIÓN DE LOS EOSINÓFILOS

Los estímulos que se usan *in vivo* para activar eosinófilos actúan generalmente sobre receptores de superficie para inmunoglobulinas, complemento, mediadores inflamatorios, proteínas de adhesión y citocinas. Entre los estímulos usados *in vitro* con este propósito se pueden citar el ionóforo de calcio A23187, el forbol ester, el fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina), el zimosán opsonizado, las esferas de Sefarosa cubiertas con IgG o C3b, células endoteliales activadas, mediadores lípidos como PAF (factor activador de plaquetas) y LTB₄, citocinas recombinantes y proteínas de matrices extracelulares (Hansel and Walker, 1993).

EOSINÓFILOS NORMODENSOS E HIPODENSOS

De acuerdo con su comportamiento en gradientes de densidad, se ha clasificado a los eosinófilos en normodensos o hipodensos.

En los pacientes con eosinofilia, los eosinófilos se encuentran " activados " y la mayoría son hipodensos. En individuos normales también se encuentran eosinófilos hipodensos pero en un porcentaje menor que en los individuos eosinofílicos [i.e. 10% en normales contra 30-60% que se encontraron en

pacientes con asma (Fukuda et al., 1985) y rinitis alérgica (Frick, Sedgwick and Busse, 1988).

EL EOSINÓFILO Y SU ASOCIACIÓN CON DIVERSAS ENFERMEDADES

Como en otros campos biomédicos se ha aprendido mucho de las funciones del eosinófilo observando su participación en ciertas enfermedades. A continuación se presenta un resumen de algunos ejemplos ilustrativos. La información que se ha obtenido del estudio de los eosinófilos en estas enfermedades, ha sido invaluable para la comprensión del papel biológico del eosinófilo en general.

ASMA

Desde principios del siglo se especuló sobre la asociación de la eosinofilia sanguínea y pulmonar con el asma. Revisando autopsias de casos de asma Ellis notó la presencia de eosinófilos o CLC en la composición de lavados broncoalveolares (LBA) (Ellis, 1908); y otros autores reconocieron la eosinofilia en el esputo y la sangre de pacientes con asma (Huber and Koessler, 1922). En la revisión de autopsias realizadas en casos de ataques fatales de asma bronquial, se encontró que las características sobresalientes de estos casos

eran una eosinofilia esplénica, hipertrofia del ventrículo derecho y timo persistente. En algunos casos no se observaron eosinófilos, o muy pocos, en los tejidos, mientras que en otros se encontró infiltración eosinofílica de las paredes bronquiales y el epitelio (Earle, 1953).

Otro autor encontró eosinofilia en las paredes bronquiales de pacientes con asma fatal, señalando también una relación entre la infiltración eosinofílica pulmonar, el infiltrado y el contenido de células cebadas de las paredes bronquiales, sugiriendo que los mediadores liberados por las células cebadas podrían ser quimiotácticos para los eosinófilos (Connell, 1971).

Existen diferencias entre lo encontrado en el asma y los hallazgos de bronquitis crónica. Así, se mostró que los asmáticos presentaban infiltrado de eosinófilos dentro del epitelio, sobre la membrana basal, en la lamina propia, en los capilares, en el tejido conectivo y alrededor de glándulas profundas; además de un infiltrado diverso de células plasmáticas, eosinófilos desintegrados y numerosos gránulos. La presencia de eosinófilos en la lamina propia fue un hallazgo más sólido en el asma que la eosinofilia de sangre periférica o de esputo y eso distinguió a los asmáticos de los pacientes con bronquitis crónica (Glynn and Michaels, 1990). Gough por su parte notó que los pulmones de los asmáticos pueden distinguirse de los de pacientes con bronquitis crónica; los pulmones de pacientes asmáticos no mostraron evidencia de un enfisema destructor sino más

bien una infiltración eosinofílica y moco firmemente adherido al epitelio (Gough, 1961). Salvato estudió biopsias bronquiales de 24 asmáticos y 24 pacientes con bronquitis crónica y señaló que las principales características en los asmáticos eran:

- a) infiltración eosinofílica en la lamina propria
 - b) eosinofilia más frecuente en tejidos que en sangre o esputo sin relación entre los números de células en los tres sitios
 - c) relación entre la presencia de eosinófilos y alguna evidencia de alergia
- (Salvato, 1968).

Estos trabajos señalan al eosinófilo como un participante importante en el proceso inflamatorio en el asma y aunque no se ha demostrado una relación más cercana entre la eosinofilia sanguínea, la de esputo y la de los tejidos, se sabe que la presencia de eosinofilia pulmonar, sobre todo en la lamina propria y en el epitelio, son características sobresalientes del asma. Se sugirió también una posible desgranulación de los eosinófilos manifestada por la presencia de sus restos y de sus proteínas granulares en el tejido pulmonar (Butterfield and Leiferman, 1993).

En 1985 se publicó que la distribución de los eosinófilos circulantes en pacientes asmáticos, contenía una mayor proporción de eosinófilos hipodensos

(densidad <1.082 g/ml). También se demostró una correlación entre el nivel plasmático de la MBP derivada del eosinófilo, el número absoluto de eosinófilos y el de eosinófilos hipodensos (Fukuda et al., 1985). Otros autores han confirmado este dato, Kloprogge por ejemplo, encontró que 60-70% de los eosinófilos circulantes en pacientes con asma atópica eran hipodensos y producían grandes cantidades de peroxidasa eosinofílica (Kloprogge et al., 1989). En cuanto a los leucotrienos, se sabe que los eosinófilos hipodensos de sujetos normales y de pacientes asmáticos, producen mayor cantidad de LTC₄ que los eosinófilos normodensos de los mismos individuos, y que los eosinófilos hipodensos de los pacientes asmáticos producen menos cantidad de LTC₄, que los eosinófilos hipodensos de individuos normales (Hodges et al., 1988). Los eosinófilos de sujetos asmáticos generan más LTC₄ que los de pacientes con rinitis alérgica (Kohi et al., 1990) o que los eosinófilos de individuos normales (Aizawa et al., 1990). El LTC₄ se metaboliza a LTD₄ (leucotrieno D₄) y LTE₄ (leucotrieno E₄) y los tres leucotrienos conforman la llamada SRS-A (substancia de reacción lenta de la anafilaxis) (Samuelsson, 1983) que es un potente espasmógeno para las vías respiratorias humanas (Weiss et al., 1982), estimula la secreción de moco (Marom et al., 1982) y produce cambios en la permeabilidad vascular (Camp et al., 1983). Los eosinófilos que provienen de los llamados asmáticos extrínsecos tienen

cantidades similares de LTC₄ a las de los asmáticos intrínsecos y ambos tienen más LTC₄ que los de individuos normales (Taniguchi et al., 1985).

Los eosinófilos de pacientes asmáticos comparados con los de los individuos normales, presentan una quimiotaxis vigorosa en respuesta al reto del alérgeno, al suero activado con zimozán y al fMLP (Hökansson et al., 1990). La generación de superóxido, después de 60 min de iniciado el estímulo, en eosinófilos hipodensos o normodensos de pacientes asmáticos, es comparable a la de los eosinófilos de sujetos normales (Sedgwick, Geiger and Busse, 1990). De esto se infiere que la presencia de gran número de eosinófilos hipodensos en la sangre de pacientes asmáticos no implica por sí misma un aumento de la actividad funcional que pudiera contribuir a la reacción inflamatoria en los pulmones de estos pacientes (Butterfield and Leiferman, 1993).

La MBP contribuye indirectamente a la inflamación en pacientes asmáticos al inducir la desgranulación de basófilos y células cebadas; se ha visto que los eosinófilos no sólo causan la muerte y descamación de células epiteliales respiratorias sino que sus proteínas pueden interferir con el funcionamiento normal de una membrana epitelial intacta (Butterfield and Leiferman, 1993). Este prolongado ataque sobre el epitelio bronquial podría inducir una serie de efectos nocivos en el pulmón, incluyendo un aumento del tránsito de antígenos a través de la barrera epitelial, la exposición de nervios sensores bajo ésta

(Nadel, 1983), la alteración de la osmolaridad de la superficie mucosa (Hogg and Eggleston, 1984) y probablemente interferencia con la producción o acción de un factor relajante derivado del epitelio (Flavahan et al., 1988). Otros estudios mostraron la evidencia de un papel funcional para la MBP, al detectar a esta proteína con un anticuerpo policlonal, en los tejidos pulmonares de pacientes con asma por medio de inmunofluorescencia. Se demostró la presencia de elevadas concentraciones de MBP extracelular en moco, superficies epiteliales y áreas de necrosis en la membrana basal, sugiriendo que había ocurrido una desgranulación de los eosinófilos (Filley et al., 1982); también se encontraron altos niveles de MBP en el esputo de pacientes asmáticos (Frigas et al., 1981). En cuanto a la toxicidad de las otras proteínas de los gránulos del eosinófilo, se sabe que la EDN, la ECP al igual que la MBP séricas están elevadas en pacientes con asma y que la EPO se encuentra reducida (Durham et al., 1989). El papel de la EPO sería muy similar al de la MBP, es decir, se cree que podría aumentar la inflamación indirectamente a través de un efecto sobre las células cebadas. No se ha aclarado el papel de la EDN en esta enfermedad y en cuanto a la ECP se cree que interviene en la producción y composición del moco pulmonar (Butterfield and Leiferman, 1993).

Otro producto del eosinófilo que interviene en el proceso inflamatorio es el PAF, que estimula la adherencia de los eosinófilos a células endoteliales vasculares

humanas, sugiriendo así su importancia en las etapas iniciales del tránsito del eosinófilo al pulmón y otros tejidos (Kimani, Tonnesen and Henson, 1988), también se sabe que induce una respuesta quimioluminiscente de estas células y aumenta la concentración de LTC₄ producido por eosinófilos estimulados con zimozán opsonizado, con lo que puede asumirse que el PAF refuerza la intervención del eosinófilo en el proceso (Bruijnzeel et al., 1986).

EOSINOFILIA PULMONAR

De las eosinofias pulmonares idiopáticas que incluyen un componente asmático además de la eosinofilia, se pueden mencionar la neumonía por eosinofilia crónica y la aspergilosis broncopulmonar alérgica.

Descrita por Carrington y su grupo en 1969, la neumonía por eosinofilia crónica se presenta en mujeres de edad mediana y se caracteriza por fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso y disnea. Esta enfermedad puede iniciarse con asma y los síntomas continúan después del tratamiento. Ni el asma ni la eosinofilia son hallazgos invariables de esta enfermedad (Carrington et al., 1969). En estos pacientes la microscopía electrónica mostró la presencia de eosinófilos como infiltración pulmonar (Quinones, Simon and Kay, 1986) y hay evidencia de su desgranulación en varias publicaciones (Carrington et al., 1969; Kanner and Hammar, 1977; Fox and Seed, 1980; Grantham, Meadows and Gleich, 1986). También se

encontraron niveles elevados de la MBP (Grantham, Meadows and Gleich, 1986) y el PAF (Oda et al., 1990) en los líquidos pleurales de los enfermos. El hallazgo de eosinofilia en LBA (Ogushi et al., 1987) en donde un alto porcentaje constaba de eosinófilos hipodensos (Prin et al., 1986) contrastó con el hecho de que los eosinófilos en la sangre periférica de los mismos pacientes eran normodensos. La neumonía por eosinofilia crónica, tratada con glucocorticoides, responde con la desaparición de la infiltración eosinofílica y mejorando notablemente las funciones pulmonares (Rogers et al., 1975), también se normalizan los eosinófilos en los LBA (Ogushi et al., 1987). No se conoce la razón de la variación de los síntomas clínicos entre esta neumonía y el asma ya que las dos enfermedades presentan eosinofilia pulmonar; en ambos casos la terapia de glucocorticoides induce una rápida mejoría, disminuyendo la eosinofilia (Butterfield and Leiferman, 1993).

La aspergilosis broncopulmonar alérgica descrita por Hinson y col. (Hinson, Moon and Plummer, 1952), ha sido caracterizada por otros autores quienes la dividieron en cinco etapas : I) aguda, II) remisión, III) exacerbación, IV) asma dependiente de corticosteroides y V) fibrótica (Patterson et al., 1982; Halwig, Greenberger and Patterson, 1984). En las etapas I y III se encuentra eosinofilia en sangre periférica (Greenberger and Patterson, 1988); esta aspergilosis puede presentarse en familias con individuos asmáticos, en pacientes con fibrosis quística (Voss et al., 1982;

Laufer et al., 1984) y se asocia con aspergilomas pulmonares bilaterales (Anderson, Craig and Bardann, 1980). Esta enfermedad difiere del asma y de la neumonía por eosinofilia crónica, pero ambas tienen en común el predominio de los eosinófilos como célula inflamatoria; su presencia en LBA de estos pacientes, aunque elevada en comparación con los normales, es mucho menor que en los afectados de neumonía. Los eosinófilos en la aspergilosis parecen estar muy activados, quizá como consecuencia de la respuesta inmune a Aspergillus fumigatus. También aquí los glucocorticoides constituyen la terapia principal aunque pueden enmascarar la eosinofilia (Greenberger, 1984) y más aún, se puede llegar a desarrollar aspergilosis durante el tratamiento del asma severa con glucocorticoides (Clayton and Busse, 1981).

SÍNDROME DE CHURG-STRAUSS

Aunque todavía se desconoce su etiología, el síndrome lleva el nombre de quienes describieron por una parte la granulomatosis alérgica y por otra la angitis que lo conforman. El asma puede preceder o presentarse al inicio del síndrome; otros síntomas son fiebre, debilidad, pérdida de peso, neuropatía periférica, anemia, velocidad de sedimentación elevada y eosinofilia (Churg and Strauss, 1951). El tratamiento prolongado también es con glucocorticoides. Lo característico de este síndrome es su eosinofilia en sangre periférica asociada

con infiltración tisular. Los niveles de eosinofilia son mayores que los encontrados en el asma (Lanham et al., 1984). Morfológicamente los eosinófilos son normales, sin signos de desgranulación; pudiendo presentarse también gastroenteritis eosinofílica (Modigliani et al., 1981), y en los LBA su número sobrepasa al encontrado en la neumonía por eosinofilia crónica y se correlaciona con el señalado en sangre periférica (Olivieri, Pesci and Bertorelli, 1990).

Las lesiones arteriales del síndrome de Churg-Strauss son similares a las de la poliarteritis nodosa que presenta también lesiones necrosantes pero con una respuesta inflamatoria compuesta de eosinófilos en lugar de neutrófilos y con presencia de granulomas (Specks and DeRemee, 1990). También se han encontrado depósitos de MBP y CLC en áreas de intensa infiltración eosinofílica (Fischer et al., 1988).

SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO (SHE)

Los criterios para definir el SHE incluyen :

- a) eosinofilia persistente (>1500 eosinófilos / mm^3)
- b) ausencia de causas parasitarias o alérgicas de la eosinofilia

c) signos o síntomas de la participación de un sistema orgánico o una disfunción relacionada con la eosinofilia o sin explicación en el cuadro clínico (Fauci et al., 1982).

El síndrome se presenta en la infancia y en la adolescencia y tiene repercusiones hematológicas. Los pacientes con SHE presentan además otras características clínicas como una enfermedad eosinofílica endomiocárdica, lesiones cutáneas, anorexia y pérdida de peso, una enfermedad tromboembólica, desórdenes del sistema nervioso central, mialgias, arritmias, etc. (Spry, 1982; Chilcote et al., 1982). También hay una leucocitosis que parece secundaria a la eosinofilia en la sangre, los eosinófilos tienen una vida media más prolongada que la normal (Date, Hubert and Fauci, 1976). Los estudios morfológicos de estas células mostraron un aumento en su tamaño y en la superficie de las mitocondrias, pero el volumen total de los gránulos está reducido (Sokol et al., 1988; Henderson et al., 1988). No es extraño que los eosinófilos de estos pacientes sean hipodensos en su mayoría (Owen et al., 1989) y el que la MBP esté disminuída podría deberse a la reducción de sus gránulos. Los estudios realizados *in vitro* en eosinófilos de pacientes con SHE mostraron que después de estimularlos con zimozán o ionóforo de calcio A23187, se produjo una desgranulación no citotóxica y la liberación extracelular de la EPO (Henderson et al., 1988). Los eosinófilos hipodensos de pacientes con SHE aumentan su

helmintotoxicidad hacia *S. mansoni*. Los eosinófilos normodensos y los hipodensos de estos pacientes, mostraron un aumento de la generación de LTC₄ después de estimular con ionóforo de calcio (Owen et al., 1989), pero los hipodensos presentaron defectos en la movilidad al azar y la quimiotaxis, con quimioattractantes que son efectivos para los eosinófilos normales (Gosset et al., 1986).

Las proteínas de los gránulos del eosinófilo pueden afectar la cascada de la coagulación. Por ejemplo, la MBP, neutraliza el efecto de la heparina en la coagulación pero al mismo tiempo prolonga el tiempo de coagulación de 3 a 5 veces (Gleich et al., 1974). La ECP acorta el tiempo de coagulación del plasma normal y también aumenta la activación del plasminógeno inducida por uroquinasa (Dahl, Venge and Olsson, 1978). Un aumento de la actividad del PAF en los eosinófilos de pacientes con SHE puede incrementar la agregabilidad de las plaquetas y por lo tanto, la formación de trombos (Chamine, Fujimara and Jamura, 1986); sin embargo, también se observó un aumento mínimo de la actividad promotora de la coagulación. Debido a estos datos conflictivos, todavía se discute el significado clínico de estos efectos en los procesos de coagulación y fibrinólisis (Fauci et al., 1982).

El tratamiento para este síndrome varía continuamente y su primer objetivo es la normalización de la cuenta de eosinófilos en la sangre. Se han usado los glucocorticoides con éxito en los pacientes que presentan IgE elevada o angioedema episódico severo (Butterfield and Leiferman, 1993). Recientemente el IFN α (interferón alfa) ha tenido éxito en pacientes resistentes al tratamiento convencional de prednisona e hidroxiurea (Busch, Schmidt and Steinke, 1991). Otros autores han usado ciclosporina (Zabel and Schlaak, 1991), vincristina y mercaptopurina (Chilcote et al., 1982; Marshall and White, 1989).

SÍNDROME DE EOSINOFILIA MIALGIA

El síndrome de eosinofilia-mialgia, que llegó a proporciones epidémicas en los Estados Unidos en 1989, se asoció con la ingestión del L-triptofano, un aminoácido muy común como remedio natural para el tratamiento del síndrome premenstrual, insomnio, obesidad, etc. (Shulman, 1990). Caracterizado por mialgias y una eosinofilia $\geq 1 \times 10^9$ eosinófilos / L, llegó en 1990 a un total de 1500 casos en ese país incluyendo 27 muertes. Otras características clínicas incluían artralgia, comezón, tos, edema periférico, niveles elevados de aldolasas y pruebas de funcionamiento hepático aumentadas (Swygert et al., 1990; CDC

Report, 1990). Algunos casos se reportaron de Francia (Lacour et al., 1990; Bourée, Nguyen Khoa and Bisaro, 1991) y de Inglaterra en ese período (Waller, et al., 1990). El uso del L-triptofano en Estados Unidos era muy popular hasta que se descubrió su asociación con esta enfermedad por lo que desde entonces se retiró del mercado estadounidense; el surgimiento de este síndrome es una advertencia contra el uso indebido de sustancias consideradas como no tóxicas (Silver, 1991).

RINITIS ALÉRGICA

La determinación de eosinofilia nasal ayuda a distinguir entre la rinitis alérgica y la gripe viral (Williams and Gwaltney, 1972) y es más útil que la eosinofilia de sangre periférica en el diagnóstico de alergia nasal (Bhandari and Baldwa, 1976); pero esta eosinofilia nasal rara vez se encuentra en la rinitis alérgica causada por alimentos (Murray, 1970). Varios autores encontraron un aumento en el número de eosinófilos procedentes de secreciones nasales en la rinitis alérgica estacional (Murray, 1971; Sasaki, Araki and Koga, 1977; Malmberg and Holopainen, 1979). También está elevado el porcentaje de eosinófilos hipodensos, en la circulación, en pacientes con rinitis alérgica, al inicio de los síntomas alérgicos (Frick, Sedgwick and Busse, 1988).

La eosinofilia nasal también se presenta en condiciones no alérgicas, como en la rinitis no alérgica con síndrome eosinofílico. Las pruebas nasales de provocación con el alérgeno son negativas y no aumentan la eosinofilia nasal. Los eosinófilos en las secreciones nasales morfológicamente son normales, no están desgranulados y no se observan CLC (Moneret-Vautrin et al., 1990).

En cuanto a las biopsias nasales, en las que se ha examinado ultraestructuralmente al tejido nasal, los eosinófilos aparecen normales, o con vacuolas en el citoplasma, con disminución de los gránulos específicos e hinchamiento mitocondrial (Topozada and Talaat, 1975); estos cambios parecen relacionarse con la hipodensidad de los eosinófilos en la secreción nasal (Masuyama, Samejima and Ishihawa, 1988).

Después del reto con el alérgeno, la MBP aumenta su concentración en las secreciones nasales al inicio del proceso, elevando aún más sus niveles durante la fase tardía del mismo; también aumenta la EDN pero los niveles de ambas proteínas no se relacionaron con la magnitud de los síntomas de las fases aguda, o tardía.

Otros estudios sugieren que la reacción inflamatoria nasal es compleja y sólo depende, en parte, de los eosinófilos. Después de una reacción positiva al reto del alérgeno se encontró que la concentración de la ECP en el lavado nasal es paralela a la magnitud de la respuesta al reto (Linder, Venge and Denschl, 1987) y

que existe una relación entre los niveles de la ECP y el número de eosinófilos en el lavado nasal (Klementsson et al., 1990). También se presenta un aumento del LTC₄ en las secreciones nasales de estos pacientes, pero no se ha identificado el origen de la secreción del leucotrieno aunque se sugiere que proviene de eosinófilos infiltrados o células epiteliales (Butterfield and Leiferman, 1993; Volovitz et al., 1988).

SÍNDROMES ASOCIADOS CON URTICARIA Y EDEMA

Las proteínas MBP, EPO, ECP y EDN producen reacciones de induración y enrojecimiento cuando se inyectan en la piel humana, por lo que se ha sugerido la participación de los eosinófilos en reacciones edematosas (Leiferman, Peters and Gleich, 1986). En el síndrome del angioedema episódico la IL-5 se eleva y se presenta eosinofilia y edema (Butterfield et al., 1992). En las biopsias de piel con lesiones de urticaria es común observar eosinófilos y, en ausencia de éstos, se encuentran depósitos extracelulares de proteínas de los gránulos del eosinófilo, en el 45-50% de las mismas (Tai et al., 1984). Observaciones de este tipo sugieren que la ausencia de eosinófilos en una determinada reacción tisular no puede utilizarse como argumento de que los eosinófilos no participaron o participarán en dicha reacción. En tal sentido, es definitiva la ausencia de

eosinófilos y de las proteínas específicas de los mismos (MBP, EPO, ECP y EDN).

El angioedema episódico, asociado con eosinofilia, se caracteriza por edema recurrente, urticaria y fiebre; además de niveles elevados de IgM. Durante los ataques, la leucocitosis puede llegar hasta los 100 000 / mm³ de los cuales >90% son eosinófilos (Gleich et al., 1984). Por medio de la inmunofluorescencia se observaron depósitos de MBP alrededor de fibras de colágena y vasos sanguíneos. La microscopía electrónica mostró alteraciones en los gránulos de los eosinófilos de sangre periférica y anomalías en los eosinófilos de la dermis (desde alteraciones en los gránulos hasta un completo estallamiento de células con la pérdida de organelos celulares). En un paciente con angioedema episódico y eosinofilia, el análisis de células T colaboradoras (Th) mostró un número elevado de células Th HLA-DR positivas (Katzen et al., 1986).

El edema facial recurrente asociado con eosinofilia parece ser una variedad del angioedema episódico, en esta enfermedad hay eosinofilia en la sangre periférica durante los ataques, junto con un aumento de la MBP y de CLC, también en sangre periférica (Songsiridej et al., 1985).

Otra enfermedad, acompañada de urticaria a veces y con eosinofilia, es el síndrome de Wells o celulitis eosinofílica, que se caracteriza por hinchazón cutánea recurrente que comienza con comezón, luego enrojecimiento e

hinchazón y después de unos días se advierten grandes áreas de edema con límites violáceos (Wells and Smith, 1979). Las lesiones pueden ser solitarias o múltiples y desarrollan ampollas en la superficie de la piel. Histológicamente, las placas infiltradas y edematosas del síndrome de Wells presentan focos de material dérmico, amorfo y eosinofílico conocidos como " figuras en llamas " (o granulomas en flama). Cuando se examinaron por inmunofluorescencia para localizar la MBP, estas figuras brillaban con tinción extracelular sugiriendo, de acuerdo al autor, que se habrían producido extensas desgranulaciones en los eosinófilos (Peters, Schroeter and Gleich, 1983).

Otra prueba de la participación del eosinófilo en la formación de las " figuras en llamas " se obtuvo de datos proporcionados por microscopía electrónica, como la presencia de gránulos libres de eosinófilos cubriendo fibras de colágena como " figuras en llamas " (Stern, Sobel and Rotchford, 1984).

DERMATITIS ATÓPICA

La eosinofilia en la dermatitis atópica, muestra una gran proporción de células hipodensas que se normalizan al mejorar el individuo (Miyasato et al., 1988). El número de estos eosinófilos hipodensos está relacionado con la actividad de la enfermedad. Además, los eosinófilos hipodensos mostraron cambios morfológicos, como señales de activación (Tsuda et al., 1989). También au-

mentaron la MBP y la ECP en la sangre periférica, indicando una activación de los eosinófilos (Miyasato et al., 1988; Kapp et al., 1991). En las reacciones eccematosas producidas con pruebas del parche por 48 h usando aeroalergenos en pacientes de dermatitis atópica, se ha encontrado que el infiltrado celular tiene un flujo de eosinófilos hacia la dermis que comienza 2-6 h después de poner el parche, con lo que se concluye que estos eosinófilos estaban activados y perdieron su contenido granular. A las 24 h estas células se encontraron en la epidermis, junto a las células de Langerhans (Bruijnzeel-Koomen et al., 1988). Estos datos sugieren un papel activo del eosinófilo en estas reacciones.

En el " prurigo nodularis " (Leiferman, 1991), una enfermedad caracterizada por nódulos severos pruríticos asociados con elevación de IgE y atopia, se encontró un patrón de depósito extracelular de proteínas de los gránulos del eosinófilo similar a los de la dermatitis atópica (Perez et al., 1990). El hecho de encontrar depósitos de estas proteínas y su potente efecto biológico, sugiere que los eosinófilos se han desgranulado y depositado sus mediadores biológicos en los tejidos con lo que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Butterfield and Leiferman, 1993).

EL EOSINÓFILO Y LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS

Junto con la alergia, el otro campo clásico de intervención de los eosinófilos han sido las enfermedades parasitarias. Es obvio que esta idea restringida - alergia y parásitos- ya no es válida a la luz de nuevos conocimientos que por otra parte no invalidan la enorme importancia de este leucocito en los fenómenos citados.

INFECCIONES CON ECTOPARÁSITOS

En el grupo de reacciones asociadas con eosinófilos y causadas por ciertos ectoparásitos como las garrapatas, se ha visto infiltración local de eosinófilos en el sitio de adherencia y alimentación de algunos de estos organismos como la *Hyalomma anatolicum* (Gill and Luckins, 1987), *Amblyomma americanum* (Latif et al., 1990) y *Rhipicephalus appendiculatus* (Fivaz, 1990). El infiltrado celular está compuesto por una acumulación y desgranulación de basófilos que forman una reacción conocida como hipersensibilidad cutánea basofílica (Jones-Motes); la ablación de esta reacción con suero anti-basofílico resulta en la ausencia de eosinófilos y la pérdida de inmunidad a la infestación (Brown et al., 1982). Es evidente que el infiltrado se asocia con la inmunidad y con el rechazo a la garrapata impidiendo su alimentación (Butterworth and Thorne, 1993).

INFECCIONES CON ENDOPARÁSITOS

La eosinofilia circulante, no suele presentarse en enfermedades causadas por endoparásitos con excepción de los helmintos, por lo que tradicionalmente se pretendió descartar un papel importante del eosinófilo en el control de dichas enfermedades (Butterworth and Thorne, 1993). Este concepto ha entrado en una fase revisionista, ya que como bien lo señala Weller, la ausencia de eosinofilia circulante y/o tisular no bastan para exonerar al eosinófilo de una posible participación en ciertos fenómenos (Weller, 1991).

Entre las infecciones causadas por protozoarios, los eosinófilos tienen un papel importante en la reacción inmune contra *Trypanosoma cruzi* pues estas células pueden fagocitar y matar los amastigotos, lo que se atribuye a la desgranulación y liberación de sus proteínas tóxicas (Kiezerbaum, Villalta and Tai, 1986). Las proteínas de los gránulos dañan a los merozoitos del *Plasmodium in vitro* y se cree que los eosinófilos intervienen en la eliminación de la malaria de la corriente sanguínea (Waters et al., 1987).

Entre las enfermedades causadas por helmintos tres categorías son las más comunes entre los mamíferos: los tremátodos, los céstodos y los nemátodos. Se trata de parásitos grandes, multicelulares, no fagocitables y rodeados a menudo

de una cutícula. De las infecciones asociadas con eosinofilia en el humano y causadas por tremátodos, se pueden citar las provocadas por el S. mansoni (Butterworth et al., 1984; Harries et al., 1986; Evengard, 1990; Hamadto et al., 1990) el Schistosoma haematobium (Hagan et al., 1985) y Fasciola hepatica (Milbourne and Howell, 1990); por céstodos como el Echinococcus granulosos (Carmalt-Jones, 1929) y la Taenia solium (Dixon and Hargreaves, 1944); y una gran variedad de nemátodos como en la oncocercosis (Connor, George and Gibson, 1985) y las infecciones por Toxocara canis (Zinkham, 1978). Una elevada eosinofilia también se ha detectado en infecciones con Loa loa (Carme et al., 1989).

Un tema al que se ha dedicado especial atención debido a su importancia geoeconómica, son las infestaciones causadas por helmintos en animales domésticos. Entre las infecciones más estudiadas en diversos animales por su asociación con eosinofilia, están las causadas por Strongylus vulgaris en el caballo (Bailey, Martin and Lloyd, 1989), Ostertagia ostertagi y T. spiralis en el ganado (Wlgin and Gibbs, 1990; Smith et al., 1990), en los borregos con Trichonstrongylus colubriformis (Douch, 1989) y con Schistosoma bovis en los carneros (Kassuku et al., 1986).

En cuanto a las infecciones en humanos es bien conocida la existencia de eosinofilia en las causadas por Strongyloides stercolaris (Faust, 1936), Trichuris

trichuria (Otto, 1935), y recientemente con Nanophyetes salmincola (parásito del salmón) (Harrell and Deardorff, 1990).

Para estudiar los mecanismos implicados en este tipo de infecciones se han usado ratas, ratones, cobayos y hamsters (cricetos) como modelos animales experimentales, los que han proporcionado datos valiosos acerca de estos procesos. Las ratas se infectaron con T. spiralis (Basten, Boyer and Beeson, 1970; Spry, Tai and Ogilvie, 1980; Ogilvie, Askenase and Rose, 1980; Riedlinger, Grecis and Wakelin, 1986), en los ratones se ha usado S. mansoni (Greene and Colley, 1976; Colley, 1980), Mesocostoides corti (Lammas, Mitchell and Wakelin, 1990) y Onchocerca linealis (Carlow, Dobinson and Bianco, 1988) en los hamsters Ancylostoma ceylanicum (Garside, Behnke and Rose, 1989) y en los cobayos T. colubriformis (Gleich, Olson and Herlich, 1979). Además del aumento de eosinófilos circulantes, en estas infecciones existe eosinofilia local, o tisular, en el sitio de la invasión o migración de la larva. Otro lugar donde se presenta eosinofilia es en la mucosa intestinal, en las infecciones por T. colubriformis en borregos (Douch et al., 1986); también hay reportes de eosinofilia en el hígado por infecciones con S. mansoni, Taenia taeniaeformis y Taenia hydatigena (Borojevic, El-Cheikh and Nicola, 1986; Letonja and Hammemberg, 1987; Meeusen et al., 1989), en el ojo con T. canis (Dernouchamps, Verougstraete and Demolder, 1990) o

Ascaris suum (Rockey et al., 1979); en la piel, por invasión de la larva del S. mansoni (Ward and McLaren, 1989), etc.

De los estudios realizados con la larva del S. mansoni se obtuvieron importantes datos de observaciones *in vitro* e *in vivo*. De los experimentos *in vitro* se sabe que aunque la larva puede eliminarse simplemente con anticuerpos y complemento (Clegg and Smithers, 1972); el efecto de estos componentes es débil y para ello se requiere de un largo período de incubación de la larva en presencia de elevadas concentraciones de anticuerpo y complemento. En contraste, se encontró que las reacciones empleando poblaciones purificadas de eosinófilos en presencia del anticuerpo eran mucho más efectivas para causar la muerte de la larva (Butterworth and Richardson, 1985). También se mostró que los neutrófilos no son tan efectivos para destruir los parásitos sobre todo si se usan las larvas intactas y sanas (Vadas et al., 1980). Esto condujo a la investigación del mecanismo responsable de la efectividad de los eosinófilos contra estos parásitos. Se observó por microscopía electrónica que los eosinófilos se adhieren íntimamente a los gusanos cubiertos con anticuerpos y que liberan sus gránulos sobre la superficie del organismo (McLaren et al., 1981). Esto daña al parásito en la región donde se adhieren estas células, aparecen vacuolas en su tegumento y sobreviene luego un desprendimiento de su membrana exponiendo las capas musculares. Los

neutrófilos por el contrario, no liberan gránulos sino que muestran grandes áreas de adhesión al gusano y hasta puede ocurrir una fusión entre la membrana plasmática del neutrófilo y las capas externas del esquistosómula, después de lo cual el neutrófilo muere dejando parte de su membrana integrada a la superficie del gusano (Butterworth and Thorne, 1993). Se piensa que este fenómeno pudiera facilitarse en parte por los lisofosfolípidos producidos por el gusano (Golan et al., 1986) y el eosinófilo en este caso parece resistente a ello debido a su membrana de lisofosfolipasa (Caulfield and Chiang, 1990). Cuando se probaron los gránulos del eosinófilo para determinar el grado de daño que causaban al esquistosómula, se encontró que la MBP y la ECP eran muy activas y producían un efecto nocivo en él, similar al que le causan las células completas durante la incubación (McLaren, Peterson and Venge, 1984). Además de dañarlos directamente, la liberación de estos gránulos puede contribuir a la adherencia del mismo eosinófilo permitiendo la adhesión de más células, amplificando así la reacción dependiente de anticuerpo (Butterworth and Thorne, 1993).

Un mecanismo alternativo del daño mediado por eosinófilos, es la generación de metabolitos tóxicos del oxígeno por el estallido respiratorio. Aunque se ha visto que los eosinófilos pueden dañar la larva del S. mansoni aún en condiciones anaeróbicas (Pincus et al., 1981), las reacciones oxidativas amplifican el daño.

Durante las reacciones que dependen de IgE y que son mediadas por eosinófilos de baja densidad, hay liberación selectiva de EPO (Capron et al., 1989) que en presencia del peróxido de hidrógeno y un aceptor de electrones apropiado, interviene eficazmente en la muerte de la larva (esto se ha visto con EPO de caballo y de cobayo) (Klebanoff et al., 1989). Otro posible mecanismo de daño incluye la síntesis de novo y la liberación de mediadores lípidos tóxicos como LTB₄ y LTC₄ (Moqbel et al., 1990) y PAF (Cromwell et al., 1990); aunque sobre éste último las evidencias no son tan claras. Para los estudios in vivo se usaron diferentes animales y tipos de experimentos, en algunos de éstos se estudió histológicamente el daño que causaban los parásitos en la piel y el tipo de infiltrado celular observado. En monos Rhesus inmunes al Schistosoma japonicum (Hsu et al., 1975) y en algunos modelos murinos inmunes al S. mansoni (Ward and McLaren, 1988), las reacciones de la piel presentaban abundantes infiltrados eosinofílicos.

Al probar el efecto de la depleción de eosinófilos en la inmunidad a helmintos utilizando suero anti-eosinofílico polivalente en ratones o cobayos, se produjo una reducción en el número de los eosinófilos y en la inmunidad a S. mansoni, T. spiralis y T. colubriformis (Mahmoud, Kellermeyer and Warren, 1977; Gleich, Olson and Herlich, 1979). Recientemente al estudiarse las respuestas de células Th₁ y Th₂ en ratones inmunes a infecciones por helmintos y tratados con anti-IL-5, o con

anticuerpos monoclonales anti-eosinofílicos para reducir los eosinófilos (Coffman et al., 1989), los datos resultantes proporcionaron un panorama distinto al que se pensaba surgiendo la idea de que el eosinófilo generalmente no se compromete en el caso del S. *mansoni*, sino que parece que la célula efectora es el macrófago activado. Se inmunizaron ratones con cercarias irradiadas (lo que les impide madurar a gusanos adultos y producir huevos, pero sí pueden desarrollar inmunidad) (James and Sher, 1990). En este modelo, predomina la respuesta de células Th₁ con producción de IFN γ en los animales que recibieron sólo una inmunización y en los que recibieron varias predominan las células Th₂ (Caulada-Benedetti et al., 1991). Las respuestas de células Th₁ se dirigen sobre todo contra antígenos larvarios y desaparecen durante la infección crónica una vez que comienza el depósito de huevos; entonces predominan las respuestas de células Th₂ principalmente contra los antígenos de los huevos del parásito (Pearce et al., 1991).

Estos hallazgos sugirieron que, al menos en estas condiciones, los eosinófilos no intervienen en la expresión de inmunidad lo cual contrasta con lo encontrado en la rata. En este modelo experimental de ratones con cercarias irradiadas, los gusanos adultos del S. *mansoni* no maduran hasta la etapa de producción de los huevos por lo que no hay una resistencia específica atribuida a la patología de esa etapa y por lo tanto no se confunde como en el modelo de ratón, los

experimentos de inmunidad pueden seguirse después de una sola infección y del subsecuente rechazo de los gusanos adultos con lo que los animales permanecen inmunes a la reinfección. Esta inmunidad puede transferirse con suero y se reduce si se depleta de IgE o IgG2a (Capron et al., 1982). También puede transferirse pasivamente con anticuerpos monoclonales IgE o IgG2a; *in vitro*, ambos anticuerpos intervienen en la muerte de la larva dependiente de eosinófilos (Capron et al., 1981; Grzych et al., 1982).

La glutatión S transferasa recombinante del *S. mansoni* (Sm28) induce protección contra el reto con esquistosoma en ratas y ratones (Balloul et al., 1987). La inmunización de ratones con esta Sm28 produce una respuesta protectora que puede transferirse con células T, pero sólo en ciertas circunstancias; las células T cultivadas por 2 meses no indujeron la producción de anticuerpos pero produjeron INF γ y transfirieron la protección. En contraste, en las ratas, la inmunización con este antígeno dió como resultado una respuesta en la cual la protección pudo transferirse con células T, pero en este caso asociada con la formación de anticuerpos que intervienen en la muerte de la larva dependiente de eosinófilos (Auriault et al., 1990). Todo indica que el eosinófilo interviene en la inmunidad contra los helmintos, al menos en algunos modelos animales, pero todavía se discute cómo correlacionar estos datos con lo que ocurre en el humano (Butterworth and Thorne, 1993). Siguiendo el modelo del *S. mansoni* en el

murino, podemos asumir que la inmunidad puede atribuirse a efectos producidos por las células Th₁ y que la muerte del parásito es independiente del anticuerpo y mediada por macrófagos activados, aunque hay un modelo murino en el que el eosinófilo no mata a la larva (Butterworth and Thome, 1993). En la rata no hay evidencia de esta función atribuida a los macrófagos. En lugar de ello las reacciones mediadas por anticuerpos IgE e IgG2a se adjudican a varias células efectoras, encabezadas por el eosinófilo (Dessaint and Capron, 1990).

Por razones éticas los estudios en humanos no pueden realizarse experimentalmente, pero se ha tratado de correlacionar los datos clínicos con los obtenidos en los modelos experimentales. Un estudio en niños infectados con *S. mansoni* demostró que había una relación entre los números elevados de eosinófilos y la ausencia de una reinfección subsecuente (Sturrock et al., 1983); esto no se confirmó en un estudio más amplio, pero se obtuvo evidencia de una resistencia a la reinfección después del tratamiento, debido a un desarrollo muy lento de la inmunidad con el crecimiento del niño (Butterworth et al., 1985).

Existe una relación entre el desarrollo lento de la inmunidad a *S. mansoni* con la edad y la producción de anticuerpos IgE contra antígenos del gusano adulto (Dunne et al., 1992). No se conoce el " blanco " exacto de estas respuestas protectoras de IgE, aunque no parecen ser las larvas, sino los gusanos adultos. Sin embargo, otros estudios mostraron que la expresión de la inmunidad se

asocian con la presencia de anticuerpos IgG contra una deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato de 37 kDa, que se encuentra en la superficie de la larva y que podría constituir un " blanco " del ataque de los eosinófilos (Goudot-Crozel et al., 1989).

En conclusión, puede decirse que el eosinófilo actúa de forma benéfica y dañina a la vez; si una reacción inmune provoca la muerte del parásito invasor, esto puede ser ventajoso para el huésped. Así, en la esquistosomiasis, donde la enfermedad se atribuye al depósito de los huevos dentro de los tejidos, cualquier proceso como el de la muerte de la larva inducida por el eosinófilo, limita el desarrollo de la misma. Las consecuencias patológicas de una reacción mediada por el eosinófilo, como la dermatitis por cercaria, son menos severas que las atribuidas a la producción de huevos y en este caso la reacción podría ser protectora.

En otras circunstancias, la muerte del parásito podría no ser ventajosa para el huésped, ya que el efecto de la reacción causa daño tisular. Un ejemplo de esto puede ser la oncocercosis. En este caso, la presencia de la microfilaria en la piel no tiene significado patológico y un individuo puede alojar gran número de parásitos en la piel con muy pocos síntomas. Sin embargo, la muerte del parásito, trae como consecuencia un infiltrado eosinofílico, que se asocia con lesiones severas y persistentes de la piel que pudieran exacerbarse después de

destruir la larva mediante la quimioterapia (Butterworth and Thorne, 1993). De manera que la reacción mediada por eosinófilos puede proteger al huésped contra ciertas infecciones helmínticas pero también puede causar daño a los tejidos. Para colmo ambas cosas pueden ocurrir simultáneamente y el balance habrá que verlo en términos de capacidad adaptativa global de esa especie animal, o expresado de otra forma, el daño tisular -circunscrito, aunque importante- puede ser un precio razonable a pagar por la ventaja de sobrevivir como individuo-especie (Butterworth and Thorne, 1993).

LOS LEUCOCITOS Y LA Entamoeba histolytica (E. histolytica)

LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LA AMIBIASIS

Sabemos que la E. histolytica virulenta invade tejidos de humanos y de animales de experimentación causando una reacción inflamatoria mínima poco común (Pérez-Tamayo and Brandt, 1971). Councilman y Lafleur fueron los primeros en llamar la atención sobre la débil respuesta inflamatoria observada en los tejidos invadidos por la amiba, en particular en el hígado. Desde entonces surgió el concepto de que la E. histolytica causaba poca inflamación, aunque eso sí, una extensa necrosis (Councilman and Lafleur, 1891). Este concepto se consolidó más tarde por observaciones de material postmortem (Harries, 1982). Sin embargo, nuestro conocimiento actual de la patología de la amibiasis se ha enriquecido por los estudios con microscopía de luz y electrónica de biopsias de pacientes y de animales experimentales, realizados en diferentes etapas de lesiones inducidas experimentalmente (Pérez-Tamayo et al., 1990). La inflamación en las primeras etapas de la amibiasis intestinal y extraintestinal, consta de una reacción aguda intensa, de corta duración, en la que predominan los leucocitos PMN (neutrófilos y algunos eosinófilos), probablemente actuando o intentando actuar como células efectoras. Estas células desaparecen pronto, sobre todo

como resultado de la lisis por parte de la amiba como lo sugieren los estudios de Tsutsumi utilizando hamsters y que armonizan con la confirmada inefectividad del PMN neutrófilo de lisar *E. histolytica in vitro*. En la siguiente etapa, se presenta una reacción tardía, débil, compuesta sobre todo de células mononucleares (MN) (linfocitos y monocitos) que apenas logra resaltar de la extensa necrosis tisular (Tsutsumi et al., 1984; Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988). Se cree que esta pobreza inflamatoria tardía podría resultar de una débil quimiotaxis de los fagocitos mononucleares (FM) hacia el área crítica (Pérez-Tamayo and Brandt, 1971; Kretschmer, 1986) y/o como consecuencia de lisis secundaria de estas células en su interacción con el parásito (Salata, Cox and Ravdin, 1985). Un corolario interesante de esta escasez de leucocitos durante las etapas avanzadas de la amibiasis invasora es que podría contribuir a la conocida ausencia de cicatrización y en consecuencia, regeneración perfecta del órgano afectado (intestino pero sobre todo piel e hígado) en los casos tratados exitosamente (Pérez-Tamayo, 1986). En este fenómeno podría intervenir la disminución de macrófagos y en consecuencia la escasa producción de IL-1 (el enlace fundamental entre la inflamación tardía, la conjuración de fibroblastos y el depósito de tejido fibroso) (Dinarello, 1984).

Prathap y Gilman describieron los tipos de lesiones que se encuentran en la amibiasis intestinal humana (Prathap and Gilman, 1970). Sus hallazgos se en-

riquecen hoy con datos obtenidos de la amibiasis experimental estudiada en gatos, perros, monos, conejos, cobayos, ratas, ratones, hamsters (cricetos) y gerbos (Chadee and Meerovitch, 1984; Meerovitch and Chadee, 1988; Shibayama-Salas et al., 1992).

No es posible aceptar universalmente la extrapolación de estos hallazgos a los humanos, particularmente respecto a los eventos inflamatorios iniciales, ya que tan sólo en los roedores la formación de granulomas es un rasgo característico de las lesiones hepáticas amibianas y esto no ocurre en los primates (Kretschmer, y López-Osuna, 1994). Los experimentos con amibas usando primates son costosos y complicados y por lo tanto, escasos en la literatura.

En resumen, todos los datos obtenidos hasta ahora en animales de experimentación confirman la presencia de una intensa, aunque efímera, reacción inflamatoria temprana en el absceso hepático amibiano (AHA), sugiriendo además que la destrucción de los PMN y más tarde de los MN por la *E. histolytica* (Jarumilinta and Kradolfer, 1964; Artigas, Otto and Kawada, 1966; Guerrant et al., 1981; López-Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986; Salata and Ravdin, 1988), podría contribuir a la escasez inflamatoria observada en las etapas más avanzadas de la enfermedad.

La inmunidad celular sistémica en la amibiasis invasora [medida por reacciones de hipersensibilidad tardía en la piel (Kretschmer et al., 1972; Ortiz-Ortiz et al., 1975),

proliferación de linfocitos T (Harris and Bray, 1976; Savanat, Viriyonond and Nimitmongkol, 1978; Ganguly et al., 1979a; Ganguly et al., 1979b; Ganguly et al., 1981; Aust-Kettis and Sunqvist, 1982) y la producción del factor de inhibición de macrófagos (Ortiz-Ortiz et al., 1975)], persiste después de una etapa transitoria de anergia en casi todos los pacientes que se han recuperado del AHA (Kretschmer, 1993). Esto sugiere que algún tipo de supresión de células T acompaña y quizá facilita la invasión tisular por la *E. histolytica*. Estos datos sirven de base a la relativa importancia de la inmunidad celular sobre la inmunidad humoral en la amibiasis extraintestinal (Salata and Ravdin, 1986).

INTERACCIÓN *in vitro* ENTRE LOS LEUCOCITOS Y LA *E. histolytica*

Neutrófilos

Los estudios histológicos realizados después de la inoculación intraportal de amibas en hamsters (cricetos), revelaron infiltrados celulares compuestos sobre todo de trofozoitos de *E. histolytica* rodeados de PMN y en la periferia de las lesiones se encontraron restos de histiocitos u otros leucocitos (Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988). Estas observaciones, también hechas en pacientes con colitis (Griffin, 1972; Pittman, El-Hashimi and Pittman, 1973; Pittman, Pittman and El-Hashimi, 1976), motivaron el estudio *in vitro* de la confrontación entre leucocitos

humanos y este parásito. La locomoción (quimiotaxis), adherencia, citólisis y fagocitosis son funciones celulares presentes tanto en la amiba como en los neutrófilos, por lo que se considera bien balanceado su enfrentamiento. Los leucocitos podrían tener una ventaja marginal al aumentar sus funciones a través de anticuerpos y complemento o a través de una activación específica (eosinófilos y macrófagos).

Por lo tanto, el resultado de esta confrontación entre la amiba y los leucocitos, depende de la virulencia del parásito y del tipo y estado de activación del leucocito.

Se demostró quimiotaxis de neutrófilos hacia la *E. histolytica in vitro* empleando trofozoitos amibianos enteros, homogenados de amiba, fracciones de membrana plasmática o sobrenadantes (Artigas, Otto and Kawada, 1966; Salata, Ahmed and Ravdin, 1989). También se estudió la actividad atrayente de la amiba *in vivo*, con neutrófilos de gerbo y se encontró que las membranas amibianas atraían a los neutrófilos (Chadee, Moreau and Meerovitch, 1987). Cuando las células se adhieren al parásito, su morfología cambia y se produce la desgranulación. La adherencia entre la *E. histolytica* y los neutrófilos es más intensa que la que ocurre entre este parásito y los macrófagos, ya que la N-acetil-D-galactosamina promueve esta adherencia haciéndola más fuerte en cepas virulentas que en las menos virulentas (Salata, Cox and Ravdin, 1985).

Los neutrófilos sólo pueden destruir amibas no virulentas, o aquellas atenuadas o dañadas por calentamiento (Janumilinta and Kradolfer, 1964; Artigas, Otto and Kawada, 1966; Guerrant et al., 1981). Esta lisis se lleva a cabo por medio de un proceso que depende de contacto, no oxidativo, extracelular e independiente de anticuerpo (Salata and Ravdin, 1988). En cambio, la confrontación *in vitro* de una amiba virulenta y neutrófilos humanos da como resultado la lisis de los neutrófilos sin causar daño a la amiba aún adicionando anticuerpos anti-amiba y complemento (Guerrant et al., 1981; López-Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986).

Estos datos establecieron la capacidad *in vitro* de la amiba virulenta para destruir neutrófilos humanos y de otros mamíferos. Asimismo sugieren que la lisis de los neutrófilos y la liberación de radicales de oxígeno y productos no oxidativos podrían contribuir al daño de los tejidos del huésped (Tsutsumi et al., 1984; Salata and Ravdin, 1986).

Pérez-Tamayo y col. concluyeron que la amiba virulenta es capaz de producir necrosis en el tejido por medio de dos mecanismos: uno, mediado por su capacidad para atraer y destruir neutrófilos; y el otro dependiente de los efectos de sus propios productos tóxicos en el tejido. Para tener evidencia de la inducción de necrosis en ausencia de neutrófilos, los autores hicieron ratas leucopénicas exponiéndolas a rayos-X y a una inyección i.v. de mostaza nitrogenada, e inocularon las amibas en forma subcutánea y en los testículos. A

pesar de la ausencia de neutrófilos, las ratas presentaron necrosis temprana y hemorragia de modo similar a lo observado en los testigos. Como base para el segundo mecanismo, los autores citan, entre otros, a los componentes citotóxicos y productos presentes en la amiba virulenta (Pérez-Tamayo et al., 1990).

Basófilos

No se han reportado estudios de confrontación *in vitro* entre basófilos humanos o de animales y la amiba. Sin embargo, sabemos que poblaciones de leucocitos conteniendo basófilos de pacientes con AHA activo son más sensibles que los de testigos sanos para liberar su contenido de histamina cuando se exponen a un antígeno crudo amibiano (Gil-R. et al., 1984). Como también se liberan otras sustancias en la reacción (prostaglandinas, serotonina, factor quimiotáctico del eosinófilo, etc.) se especula que esto podría contribuir a la inflamación, especialmente en los inicios de la amibiasis. La reacción es mediada por IgE, por lo que se sugirió que estas reagentes anti-amibianas pueden adquirirse durante previas exposiciones a la amiba. En la amibiasis invasora suelen existir reacciones de hipersensibilidad inmediata en la piel a antígenos amibianos (Kretschmer et al., 1972).

Linfocitos

El enfrentamiento *in vitro* de la amiba virulenta y leucocitos mononucleares (mezcla de linfocitos, monocitos y macrófagos) (MN), es relevante debido a la importancia de la inmunidad celular en la amibiasis.

La interacción de MN provenientes de pacientes recuperados de AHA y la amiba virulenta, resultó en lisis del parásito; mientras que MN de testigos normales y de pacientes con inicio de amibiasis aguda, no lisaron a la amiba (Landa, Capin y Guerrero, 1976; Guerrero, Ríos y Landa, 1976).

Por desgracia, en estos estudios no se usó un método cuantitativo ni se emplearon poblaciones celulares puras (mencionan linfocitos pero se asume la contaminación con monocitos) por lo que no hubo datos concluyentes al respecto. Sin embargo, estos trabajos condujeron a una serie de experimentos que evaluaron de forma más precisa la actuación de las células MN en la amibiasis.

Los linfocitos T humanos, purificados, no inmunes y estimulados con PHA (fito-hemaglutinina), destruyen a la amiba virulenta, mientras que el parásito destruye los linfocitos T no estimulados. La adición de suero inmune no impide la lisis de los linfocitos no estimulados (Salata, Cox and Ravdin, 1987). Se dice que el mecanismo amebicida empleado por los linfocitos T estimulados, depende del

contacto y es independiente del anticuerpo, exigiendo la presencia de la PHA durante la reacción (Salata, Cox and Ravdin, 1987). Luego se mostró que los linfocitos T amebicidas pertenecían a la subclase de linfocitos T8 citotóxicos (Salata, Pearson and Ravdin, 1985). Finalmente, parece que la citotoxicidad dependiente de anticuerpos no participa en la amibiasis (Weidemann et al., 1984).

Macrófagos

Los monocitos circulantes de pacientes con AHA tienen disminuída su actividad bactericida *in vitro* contra el *Staphylococcus aureus* (Gill et al., 1982), también las actividades fagocíticas y bactericidas de los monocitos de cobayo con AHA se encontraron deprimidas. Lo contrario ocurrió en los monocitos obtenidos de animales con amibiasis intestinal (Ghadirian and Meerovitch, 1982). Se detectó un efecto citolítico de amibas en su confrontación con monocitos humanos (no activados) obtenidos de pacientes con AHA; pero cuando esos mismos monocitos se activaron, antes de su interacción, con linfocinas obtenidas de lectinas, los monocitos activados destruyeron a las amibas (con proporciones hasta de 10:1, monocitos:amiba). Así, se requiere una cantidad menor de monocitos para lisar al parásito en contraste con el número de neutrófilos (200:1) que se requieren para el mismo efecto pero con amibas no virulentas (Salata, Cox and Ravdin, 1985).

El AHA experimentalmente inducido en hamsters (cricetos) y cobayos, aumenta su tamaño y se disemina a otros tejidos cuando se elimina a los macrófagos presentes con sílice, o suero anti-macrófago (Ghadirian and Meerovitch, 1982; Ghadirian, Meerovitch and Kongshavn, 1983; Ghadirian and Kongshavn, 1984). La resistencia del huésped a la amibiasis en ratones nu/nu depende de los macrófagos (Stern, Graybill and Drutz, 1984) y no de los linfocitos, como se demuestra por el efecto que tiene la esplenectomía en la susceptibilidad de estos ratones a la infección amibiana (Ghadirian and Kongshavn, 1985).

Parece que en la lisis de la amiba, producida por macrófagos humanos o murinos, intervienen tanto los mecanismos oxidativos como los no oxidativos (Salata, Cox and Ravdin, 1985; Denis and Chadee, 1989; Lin and Chadee, 1993). También se ha reportado la susceptibilidad de la amiba a los radicales oxigenados (Murray, Aley and Scott, 1981). Recientemente se mostró que proteínas crudas y purificadas de amibas virulentas pueden sensibilizar macrófagos peritoneales murinos, aumentando la liberación del ión superóxido y el peróxido de hidrógeno en respuesta a PMA (acetato de forbol miristato). Se cree que algunos productos de la amiba son capaces de modular el estallido respiratorio en los macrófagos (Lin, Keller and Chadee, 1993).

Algunos microorganismos y parásitos, incluyendo a la amiba, son susceptibles a la acción tóxica del óxido nitroso (NO). Los macrófagos murinos utilizan el NO

para matar o inhibir la replicación de parásitos intracelulares y el NO participa en la destrucción de amibas realizada por el macrófago activado (Lin, Keller and Chadee, 1993). También se ha demostrado la participación de metabolitos oxidativos (O_2 , OH., H_2O_2) en la lisis de este parásito (Denis and Ghadirian, 1992). Entre los parásitos extracelulares que inducen la producción del $TNF\alpha$ (factor de necrosis tumoral alfa) en los macrófagos de gerbos, se incluye a la *E. histolytica* (Wang, Keller and Chadee, 1992). Es importante la presencia de este factor en los procesos infecciosos ya que se considera como una segunda señal para la activación de las funciones citotóxicas del macrófago.

En una fase temprana de la inmunidad a una variedad de patógenos, el $TNF\alpha$ está considerado como esencial para el inicio de la secreción del $IFN\gamma$ por células NK. El $TNF\alpha$ también interviene en la activación del macrófago mediada por contacto con células T CD_4+ estimuladas. Debe mencionarse que mientras que un poco de $TNF\alpha$ activa a los macrófagos, un exceso puede resultar en lesiones tisulares extensas (Green and Nacy, 1994). Se ha visto que los macrófagos derivados de AHA en gerbos producen $TNF\alpha$ y esta producción aumenta estimulando con lipopolisacárido (Wang, Keller and Chadee, 1992).

El $IFN\gamma$ está considerado como activador universal de las funciones anti-microbianas y anti-parasitarias en los monocitos (James and Nacy, 1993), y la amiba puede incluirse en este esquema, ya que el tratamiento *in vitro* de

macrófagos peritoneales murinos no activados con IFN γ recombinante, causó la destrucción de los trofozoitos amibianos (Ghadirian and Denis, 1992).

Por lo tanto, el macrófago activado emerge en principio como una célula efectora capaz de eliminar la amiba virulenta, un papel que puede ser crítico en el control final de la invasión amibiana (Kretschmer and López-Osuna, 1990).

Eosinófilos

En contraste con las bien conocidas funciones efectoras del eosinófilo en las enfermedades helmínticas (Butterworth and Thorne, 1993) donde la eosinofilia sanguínea es una característica sobresaliente, el papel que pudiera tener el eosinófilo en la amibiasis no ha sido investigado suficientemente. No existe eosinofilia en la amibiasis extraintestinal (Reed and Braude, 1988). La ausencia de eosinófilos circulantes en la amibiasis seguramente fue responsable de la falta de interés de los investigadores por este leucocito en esta enfermedad, a pesar de que en la inflamación temprana, casi regularmente, se han encontrado eosinófilos (Griffin, 1972; Pittman, El-Hashimi and Pittman, 1973; Tsutsumi et al., 1984; Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988). Ya se señaló que Weller insiste que no es válido negarle al eosinófilo un posible papel en un determinado fenómeno biológico sólo por la ausencia de eosinofilia en sangre o en tejidos (Weller, 1991).

Con el fin de aclarar la posible intervención del eosinófilo en la amibiasis, estudiamos la interacción *in vitro* de una cepa virulenta de *E. histolytica*, la HM1-IMSS y una población enriquecida con eosinófilos humanos normales marcados ($\geq 95\%$ de pureza). Posteriormente realizamos esta confrontación pero con eosinófilos activados. Por último, se estudió la interacción eosinófilos:amiba *in vivo*. Los resultados obtenidos constituyen los datos presentados en esta tesis.

En resumen, los neutrófilos y los eosinófilos, leucocitos predominantes en la inflamación, son ineficientes en su lucha contra la *E. histolytica* virulenta, pero si los eosinófilos son activados y apoyados por factores humorales, pudieran representar la célula efectora inicial líder contra la amibiasis invasora y quizá la responsable de invasiones amibianas " abortadas ", que por razones obvias las estadísticas no registran en la literatura. Los estudios *in vivo* como la inducción de AHA en gerbos eosinofílicos podrían ayudar a esclarecer este problema. La confrontación de amibas con macrófagos y eosinófilos activados, ha mostrado un comportamiento semejante entre ambas células, realzándose la importancia del papel que pudiera desempeñar el eosinófilo en las fases tempranas de la invasión amibiana (López-Osuna, 1995).

IL-5 Y LA PRODUCCIÓN DE EOSINÓFILOS

Tres características importantes de la eosinofilia han proporcionado información sobre los mecanismos de control en la producción de eosinófilos. Primero, la eosinofilia está bajo el control de linfocitos T (Sanderson, 1993); segundo, el aumento en el número de eosinófilos se observa independientemente de los aumentos en otros leucocitos; y tercero, la eosinofilia se restringe a un número determinado de enfermedades, lo que indica que el sistema inmune puede distinguir entre tipos de estímulos que inducen eosinofilia de los que no la inducen. Aunque la producción *in vitro* de eosinófilos puede inducirse con IL-3, GM-CSF e IL-5 sólo esta última citocina es específica (y quizá la única) para el linaje eosinofílico *in vivo* (Sanderson, 1993).

PRODUCCIÓN DE EOSINÓFILOS *in vitro*

Metcalf y col. informaron de la producción de eosinófilos *in vitro* utilizando medio acondicionado en cultivos de agar semi-sólido y células de médula ósea de ratón (Metcalf et al., 1974). Más adelante extendieron esta observación a la médula ósea humana (Metcalf, Cutler and Nicola 1983). Como la obtención de colonias eosinofílicas en cultivo usando médula ósea de ratón era de muy baja

eficiencia, otros autores, buscando mejores sistemas de cultivo, encontraron y caracterizaron la IL-5 (Sanderson, Warren and Strath, 1985; Campbell et al., 1988), a la que se atribuye la inducción específica del linaje eosinofílico y que constituye un factor tardío de la eosinofilo-poyesis (Sanderson, 1993). En contraste con los cultivos en ratón, los de médula humana produjeron más colonias de eosinófilos en presencia de IL-5. Sin embargo, los resultados eran distintos si se cultivaba en agar semi-sólido que en cultivo líquido, observándose mejor el efecto de la IL-5 sobre los progenitores de eosinófilos en cultivos líquidos (Clutterbuck and Sanderson, 1990). La IL-3 por su parte actúa en etapas tempranas y tardías de las vías de diferenciación del eosinófilo pero también del neutrófilo y el macrófago, en tanto que la IL-5 actúa sólo en la última etapa de la diferenciación eosinofílica (Ema et al., 1990).

PRODUCCIÓN DE EOSINÓFILOS *in vivo*

Existen actualmente varias formas de producir eosinofilia en animales:

a) la administración intraperitoneal (i.p.) de IL-5 humana (Fattah et al., 1990) o murina a ratones produjo eosinofilia en sangre, bazo, médula ósea y peritoneo pero en experimentos de corta duración. Esta eosinofilia posiblemente represente una maduración de precursores ya existentes (Hitoshi et al., 1991). Ratones inyectados con IL-2 (interleucina 2) desarrollaron eosinofilia por corto

tiempo, pero una vez eliminado el tratamiento, los niveles de eosinófilos regresaron a lo normal. Esta eosinofilia pudo suprimirse inyectando anticuerpo anti-IL-5, lo que sugiere una regulación por parte de la IL-5 (Yamaguchi et al., 1990).

Por otro lado, ratones irradiados a los que se trasplantaron células de médula ósea transfectadas con un retrovirus recombinante portando la secuencia codificadora de IL-5, desarrollaron eosinofilia en sangre y tejidos que se prolongó por dos semanas. En la sangre se mantuvieron niveles elevados de eosinófilos hasta por 6 meses (Vaux et al., 1990).

b) la administración de antígenos parasitarios (vivo o inertes) en ratas y ratones, ha sido utilizada con éxito para la inducción de una prolongada eosinofilia y por ello ha rendido valiosos servicios en el estudio de la Inmunoparasitología (Cook, Smith and Spicer, 1993). (Ver adelante).

c) por administración intravenosa de partículas como Sephadex (Walls and Beeson, 1972) y látex (Schriber and Zucker-Franklin, 1974) en ratas

d) por inhalación de endotoxina, PAF y otras sustancias (Cook, Smith and Spicer, 1993)

e) por producción de animales transgénicos (con el gen IL-5) (Cook, Smith and Spicer, 1993).

MODELOS ANIMALES DE EOSINOFILIA

El aumento y la depleción experimental de una determinada función, constituyen una estrategia muy útil en la investigación biomédica. El eosinófilo no ha sido una excepción. Diversos modelos experimentales han sido usados para tal fin, lo que ha establecido una advertencia de que los hallazgos no deben extrapolarse a otras especies animales en forma indiscriminada. A continuación algunos ejemplos de los modelos más utilizados.

Conejos, Monos, Perros, Carneros

Administrando PAF en aerosol a conejos se produjo una elevación de neutrófilos y eosinófilos en los LBA (Spina et al., 1991), pero desconocemos si es posible producir una eosinofilia en la sangre periférica en estos animales.

En monos se han empleado dos métodos para obtener eosinofilia en pulmón: uno por administración repetida de antígeno de *Ascaris* unido a esferas de Sefarosa (Gundel, Gerritsen and Wegner, 1989) y el otro por la inhalación repetida del antígeno sólo (Gundel et al., 1990). También se ha obtenido eosinofilia en LBA administrando PAF inhalado (Wegner et al., 1989).

En los perros la inhalación de un antígeno de A. suum, después de tratarlos con metirapona para bloquear la liberación de esteroides endógenos, produjo una reacción inmediata seguida de una respuesta tardía donde hubo un aumento de eosinófilos en LBA y en tejido bronquial 10 h después de administrar el antígeno (Cook, Smith and Spicer, 1993).

En los carneros la administración intratraqueal del antígeno A. suum provoca un aumento significativo de eosinófilos en LBA (Bosse et al., 1987), también existen publicaciones de un aumento de eosinófilos en LBA por medio de la administración de LTD₄ (Abraham et al., 1985) pero no en sangre periférica.

Rata

Para desarrollar eosinofilia en ratas, sobre todo en la cavidad peritoneal, se ha usado la larva de M. corti (Chernin and McLaren, 1983), y para la producción de eosinofilia en sangre periférica se ha utilizado la larva de T. spiralis desarrollándose una eosinofilia que llegó a su máximo a los 14 días de administración oral o intravenosa (Basten, Boyer and Beeson, 1970). Se observó que esta eosinofilia no dependía de la infección causada por la larva ya que la administración de larvas muertas también produjo eosinofilia. Se sugirió entonces que la eosinofilia pudiera depender de la embolización pulmonar y que

la misma era muy efectiva por vía intravenosa (i.v.) por lo que se intentó la inyección i.v. de partículas como el Sephadex (Walls and Beeson, 1972) o látex (Schriber and Zucker-Franklin, 1974) de varios tamaños y se vió que los resultados eran similares o mejores que los logrados con los parásitos. La inyección i.v. o i.p. de IL-2 recombinante humana produjo una infiltración tisular de linfocitos y eosinófilos y una marcada eosinofilopoyesis en la médula ósea de la rata (Anderson and Hayes, 1989); el PAF inyectado en la cavidad pleural de las ratas también eleva el número de eosinófilos junto con el de células mononucleares y neutrófilos, si bien en 24 h todas las células excepto los eosinófilos, regresan a la normalidad (Silva et al., 1989).

También se ha usado la instilación i.p. de complejos protamina-heparina (Archer, 1973), de quistes de *Echinococcus granulosus* (Archer, Robson and Thompson, 1977) y preparaciones de *A. suum* (Archer et al., 1985) que provocaron eosinofilia en la cavidad peritoneal.

Cobayo

Desde principios de siglo se demostró que la anafilaxis, producida por la administración repetida de una proteína extraña en el cobayo, aumentaba los eosinófilos en la sangre, bazo, pulmón y el estómago por lo que no es difícil obtener estas células en grandes cantidades en este animal (Schlecht and

Schwenker, 1912; Hajos, 1928). El aumento de eosinófilos en la sangre de cobayos 24-30 h después de inyecciones sucesivas de suero de caballo, puede impedirse con glucocorticoides que también reducen la salida de eosinófilos de la médula ósea y deprimen la eosinofilopoyesis (Dustin and de Harven, 1954). La administración intratraqueal de IL-5 recombinante de ratón a cobayos produjo eosinofilia en LBA y en pulmones alcanzando un pico máximo a las 24 h. Esta respuesta se redujo con un inhibidor de síntesis de leucotrienos administrado antes de la IL-5 (Sekizawa et al., 1991). La IL-4 recombinante humana inyectada i.p. o i.v. en el cobayo produce eosinofilia de sangre periférica muy rápidamente: una hora después de la inyección i.v. de IL-4 comienza a elevarse el número de eosinófilos con duración de hasta 24 h (Sanjar, McCabe and Reynolds, 1991).

Ratón

Para la obtención de eosinofilia en sangre periférica de ratón, se empleó un inmunodepresor, la ciclofosfamida y un antígeno, el KLH (hemocianina de la lapa de mar) en adyuvante completo de Freund (Vadas, 1981). También se usó una combinación de ciclofosfamida y huevos de *T. canis* con lo cual se obtiene una infección en ratones de la cepa SJC con una pronunciada eosinofilia en sangre periférica (Sugane and Oshima, 1985). Cabe señalar que existen cepas de ratones que son excelentes respondedoras y producen una eosinofilia mucho

más abundante al mismo estimulador, que otras cepas menos eficientes (Lammas, Mitchell and Wakelin, 1989).

Otros parásitos usados para desarrollar eosinofilia en sangre de ratón son el A. suum (Sugane, 1988), Nippostrongylus brasiliensis (Watanabe et al., 1988) y Strongyloides venezuelensis (Korenaga et al., 1991). Ya se mencionó antes que la inyección i.p. con IL-5 humana (Fattah et al., 1990) y murina (Hitoshi et al., 1991) en ratones provoca eosinofilia lo que también se logra con IL-2 (Yamaguchi et al., 1990). El uso de ratones irradiados y trasplantados con células de médula ósea transfectadas con un virus recombinante portador de la secuencia codificadora de IL-5 dió como resultado un aumento de eosinófilos en la sangre y tejidos (Vaux et al., 1990). También se produjeron ratones transgénicos CBA/CaxC57B1/6 F1 con gen IL-5 y con niveles de eosinófilos mucho más elevados que los animales testigos (Dent et al., 1990).

La eosinofilia peritoneal se obtuvo con antígenos de parásitos, larvas de *Toxocara* o *Anisakis* (Sugane and Oshima, 1980), antígeno soluble de *Ascaris* (Walls, 1976) o con huevos de A. suum (Kano, Kasuya and Ohtomo, 1989) y recientemente se reportaron varios trabajos utilizando el M. corti (Johnson et al., 1979; Mitchell, 1979; Barton et al., 1984). Los eosinófilos pueden aumentar su número en los tejidos como en la esquistosomiasis crónica murina (El- Cheikh, Dutra and Borojevic, 1991).

Gerbos

El gerbo (*Meriones unguiculatus*) es un modelo estándar para el estudio del AHA (Meerovitch and Chadee, 1988; Zhang, Cieslak and Stanley, 1994). Como nuestra línea primordial de investigación es el estudio del eosinófilo y su posible participación en la amibiasis hepática, decidimos establecer el modelo de eosinofilia en gerbos lo que se logró utilizando un antígeno del parásito *T. canis*, obteniendo una elevación máxima de eosinófilos a los 21 días postinoculación (ver adelante Capítulo VI). Debemos mencionar que también se probaron grupos de animales inoculados con el antígeno parasitario y adyuvante de Titer-Max, pero los resultados no fueron mejores que usando el antígeno sólo (Velázquez et al., 1993).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Los leucocitos neutrófilos humanos al enfrentarse a una cepa virulenta de *E. histolytica in vitro*, son destruidos sin que el parásito sufra algún daño (López-Osuna, Contreras y Kretschmer, 1986). También se sabe que los macrófagos humanos no activados son destruidos por cepas virulentas de *E. histolytica*, pero que si las células se activan (con citocinas, fMLP, PMA, etc.) adquieren la capacidad de lisar a la amiba aunque finalmente ellas también sucumban en el proceso (Salata, Cox & Ravdin, 1985). Tomando en cuenta el papel efector que tienen los leucocitos eosinófilos en su confrontación con ciertos helmintos (Butterworth & Thome, 1993), nos propusimos investigar la efectividad de los eosinófilos humanos normales (i.e. no activados) en su confrontación con la *E. histolytica* virulenta (López-Osuna and Kretschmer, 1989), pero también el comportamiento de eosinófilos activados con fMLP, para ver si se asemejan a los macrófagos activados en su confrontación con este parásito (López-Osuna, Arellano and Kretschmer, 1992).

Una vez estudiada la interacción in vitro de los eosinófilos (normales y activados) y la *E. histolytica*, el siguiente paso sería la evaluación de esta con-

frontación (i. e. *E. histolytica* y eosinófilos) *in vivo* para lo cual estudiamos animales de experimentación en los que se indujo eosinofilia y a los que se inoculó intraportalmente con una cepa virulenta de *E. histolytica* para inducir AHA (Velázquez et al., 1995). Esperamos que las observaciones de estos experimentos en conjunto contribuyan al esclarecimiento del papel del eosinófilo como posible célula efectora en la amibiasis invasora.

CAPÍTULO III

Artículo : Destruction of normal human eosinophils by E. histolytica.

Parasite Immunol. 1989, 11: 403-411.

INTRODUCCIÓN

Entre las principales investigaciones sobre amibiasis, se cuentan varios estudios *in vitro* para determinar los eventos que se producen durante la interacción entre leucocitos (humanos y de animales) y la E. histolytica (Chévez y Segura, 1974; Knight, 1977; McCaul, Poston and Bird, 1977; Bos, Leijendekker and van den Eijk, 1980). Nosotros investigamos la confrontación de una cepa virulenta de E. histolytica (HM1-IMSS) y neutrófilos PMN humanos confirmándose que la cepa virulenta destruye a estos leucocitos, capacidad que no poseen cepas menos virulentas o avirulentas del parásito (Jarumilinta and Kradolfer, 1964; Artigas, Otto and

Kawada, 1966; Guerrant et al., 1981; Ravdin et al., 1985; López-Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986).

Teniendo en cuenta la bien establecida virtud del eosinófilo como célula efectora en enfermedades por helmintos (Butterworth and Thorne, 1993) decidimos estudiar el enfrentamiento *in vitro* entre eosinófilos y una cepa virulenta de *E. histolytica*, ya que el papel del eosinófilo en la amibiasis invasora prácticamente no ha sido explorado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enfrentamiento *in vitro* de eosinófilos humanos normales y la cepa virulenta de *E. histolytica*, HM1-IMSS, culminó con la lisis de los eosinófilos sin que se observara destrucción de la amiba. Esto sucedió aún añadiendo anticuerpos anti-amiba y complemento lo que se suma al concepto de obsolescencia de los anticuerpos humorales en la amibiasis humana (Kretschmer, 1993). La acción lítica de la *E. histolytica* se estudió usando eosinófilos marcados con cromio 51 determinando la destrucción celular por la liberación de la marca y por la exclusión del colorante vital azul tripano en las células lisadas observada al microscopio. Ambos métodos fueron confirmatorios, con resultados similares en las mezclas con proporciones eosinófilos:amiba 10:1; en tanto que en las mezclas con la proporción 200:1, la liberación de la marca ocurrió sensiblemente antes que la exclusión del colorante, quizás debido a diferencias en la sensibilidad de las técnicas (Fig. 1, 2 y 3; artículo pp. 405-407). El proceso citolítico ejercido por el parásito sobre los eosinófilos resultó similar al descrito en los estudios con los neutrófilos (Guerrant et al., 1981; Ravdin, 1986; López-Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986). En estos estudios, por cierto, la clara sobrevivencia de la amiba al incubarse sola en un suero inmune fresco parece contradecir publicaciones previas donde se señala un efecto nocivo de estos factores (anticuerpos anti-amiba y complemento) sobre la *E. histolytica in vitro*

(Chévez et al., 1973; Huidt et al., 1979, Calderón and Schreiber, 1985) pero por otro lado coincide con observaciones donde la *E. histolytica* - sobre todo la cepa virulenta - , no sufre daño en presencia de anticuerpos anti-amiba y complemento (Huidt et al., 1979; Calderón and Tovar-Gallegos, 1980; Aust-Kettis, Thorstensson and Sundqvist, 1981; Reed et al., 1986); posiblemente por la desactivación del complejo terminal C8-C9 que logra la subunidad de 170 kDa de la lectina adhesina Gal/GalNAc inhibible, patrimonio de las *E. histolytica* virulentas (McCoy, Mann and Petri, 1994).

La lisis de eosinófilos humanos realizada por la *E. histolytica* se suma al conocido efecto destructor de ésta sobre los neutrófilos humanos normales (Guerrant et al., 1981; Ravdin et al., 1985; López Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986) y sobre los monocitos no activados (Salata, Pearson and Ravdin, 1985). Por otra parte si se utilizan cepas mucho menos virulentas, o cepas termoatenuadas de la amiba, es posible demostrar que los neutrófilos son capaces de destruir al parásito por medio de mecanismos no oxidativos e independientes de suero (Salata and Ravdin, 1988). Debe recordarse que los macrófagos activados lisan amibas virulentas por medio de mecanismos oxidativos y mecanismos no oxidativos (Salata, Cox and Ravdin, 1985; Denis and Chadee, 1989; Lin and Chadee, 1992). Debido a esta capacidad de los macrófagos de lisar la *E. histolytica* virulenta, siempre y cuando se activen previamente, queda por estudiar si eosinófilos obtenidos de individuos hipereosinofílicos (Silberstein and David, 1987) o

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

eosinófilos que se activen con linfocinas u otros factores (Spry, 1985) se comportan de manera diferente a su contraparte normal en su confrontación in vitro con la amiba.

Por lo pronto pudimos concluir que los eosinófilos humanos normales, aún en presencia de anticuerpos anti-amiba y complemento son destruidos por la E. histolytica virulenta de manera comparable a lo que ocurre con neutrófilos y con macrófagos no activados (López-Osuna and Kretschmer, 1989).

Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*

MARTHA LÓPEZ-OSUNA & ROBERTO R. KRETSCHMER
*Division of Immunology, Unidad de Investigación Biomédica del Centro
Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social and Unidad de
Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México, México, DF*

Accepted for publication 1 February 1989

Summary We evaluated the in-vitro interaction of normal human eosinophil leucocytes and a virulent strain of *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS) in the presence of immune serum. At a 10:1 (eosinophil:amoeba) ratio a significant time-dependent destruction of eosinophils was found from the first hour onward, and a similar, albeit weaker, cytopathic effect was found in the 200:1 ratio mixtures, with some delay in the microscopic evidence of such effect. Results were unaffected by serum factors, and amoebae emerged virtually unharmed throughout these experiments, again regardless of the presence of serum factors. These results indicate that, as with neutrophil leucocytes, virulent *E. histolytica* is capable of destroying normal human eosinophils *in vitro*.

Keywords: eosinophil, *Entamoeba histolytica*

Introduction

The interaction of *Entamoeba histolytica* with mammalian cells has been extensively studied *in vitro* using both human and animal cells (Chávez & Segura 1974, Knight 1977, McCaul, Poston & Bird 1977, Bos, Leijendekker & van den Eijk 1980). Such studies have revealed, *inter alia*, the capacity of virulent strains of *E. histolytica* effectively to destroy human polymorphonuclear neutrophils (PMN) (Jarumilinta & Kradolfer 1964, Artigas, Otto & Kawada 1966), although the reverse effect may be observed when using less virulent or avirulent strains of the parasite (Guerrant *et al.* 1981, Ravdin *et al.* 1985, López-Osuna, Contreras & Kretschmer 1986). On the other hand, and contrasting with the well-established effector prowess of the eosinophil PMN in helminthic diseases (Butterworth *et al.* 1975, Kazura & Grove 1978, Greene, Taylor & Aikawa 1981), where blood eosinophilia constitutes a clinical feature (Beeson & Bass 1977), the role played by this leucocyte in amoebiasis remains basically unexplored. This, notwithstanding the fact that a few eosinophils are regularly found in the inflammatory reaction occurring in early

Correspondence: Dr Roberto R. Kretschmer, Division of Immunology, Unidad de Investigación, Biomédica, CMN-IMSS, Apartado Postal 73-032, CP 03020, México, DF, México.

CO-INCUBATION OF EOSINOPHILS AND AMOEBAE

Labelled eosinophils ($1-2 \times 10^6$) and amoebae were mixed in duplicate in 12×75 mm sterile plastic tubes (Falcon, 2003, Oxnard, CA, USA) in 10:1 and 200:1 eosinophil: amoeba ratios (Guerrant *et al.* 1981) in a final volume of 1 ml in TYI-S-33 medium with 10% fresh anti-amoeba immune human AB/Rh⁺ serum (IHA titre = $1:10^5$) or 10% heat-inactivated ($56^\circ\text{C}/30$ min) normal human AB/Rh⁺ serum (negative IHA titre) (i.e. control serum) that had been kept frozen in aliquots at -70°C until used. The relative shortage of eosinophils dictated this type of overall control for both antibodies and complement. Eosinophils or amoebae incubated alone with fresh immune serum, control serum, TYI-S-33 or RPMI-1640 were used as controls. The tubes were rotated end-over-end at 37°C and aliquots were sampled at 0, 60, 120 and 180 min incubation time, centrifuged at $100g$ for 5 min at 4°C and the radioactivity present in the supernatant fluid was measured in a gamma counter (Packard PRIAS, Packard Ins. Co., Downers Grove, IL, USA). Specific eosinophil lysis was calculated by the following formula (Salata, Pearson & Ravdin 1985):

$$\text{Per cent lysis} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{total release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

where spontaneous release is the radioactivity present in the supernatant of eosinophils incubated alone in RPMI-1640 or TYI-S-33 medium ($\leq 10\%$ in our experiments) and total release is the radioactivity obtained after freezing and thawing this eosinophil suspension three times.

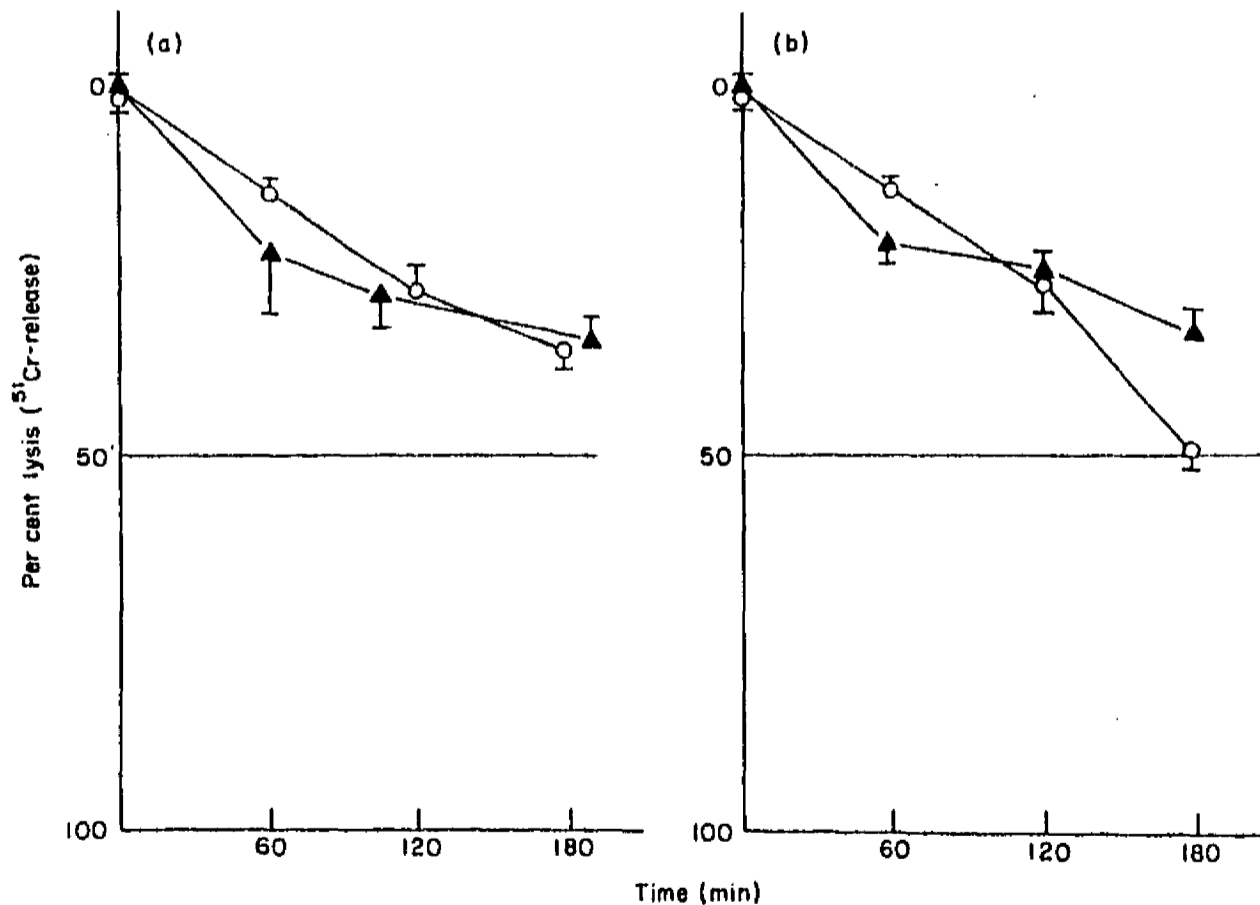


Figure 1. Eosinophil lysis, measured as ^{51}Cr release, in the presence of *E. histolytica* and fresh immune serum (a) or heat-inactivated control serum (b). ▲, 200:1; ○, 10:1.

Viability of both amoebae and eosinophils was also assessed in the pellets by trypan blue exclusion. Here results were expressed as per cent of viable cells (amoebae or eosinophils) calculated by the following formula:

$$\text{Per cent viable cells} = \frac{\text{viable cells/ml at 'n' min}}{\text{viable cells/ml at 0 min}} \times 100.$$

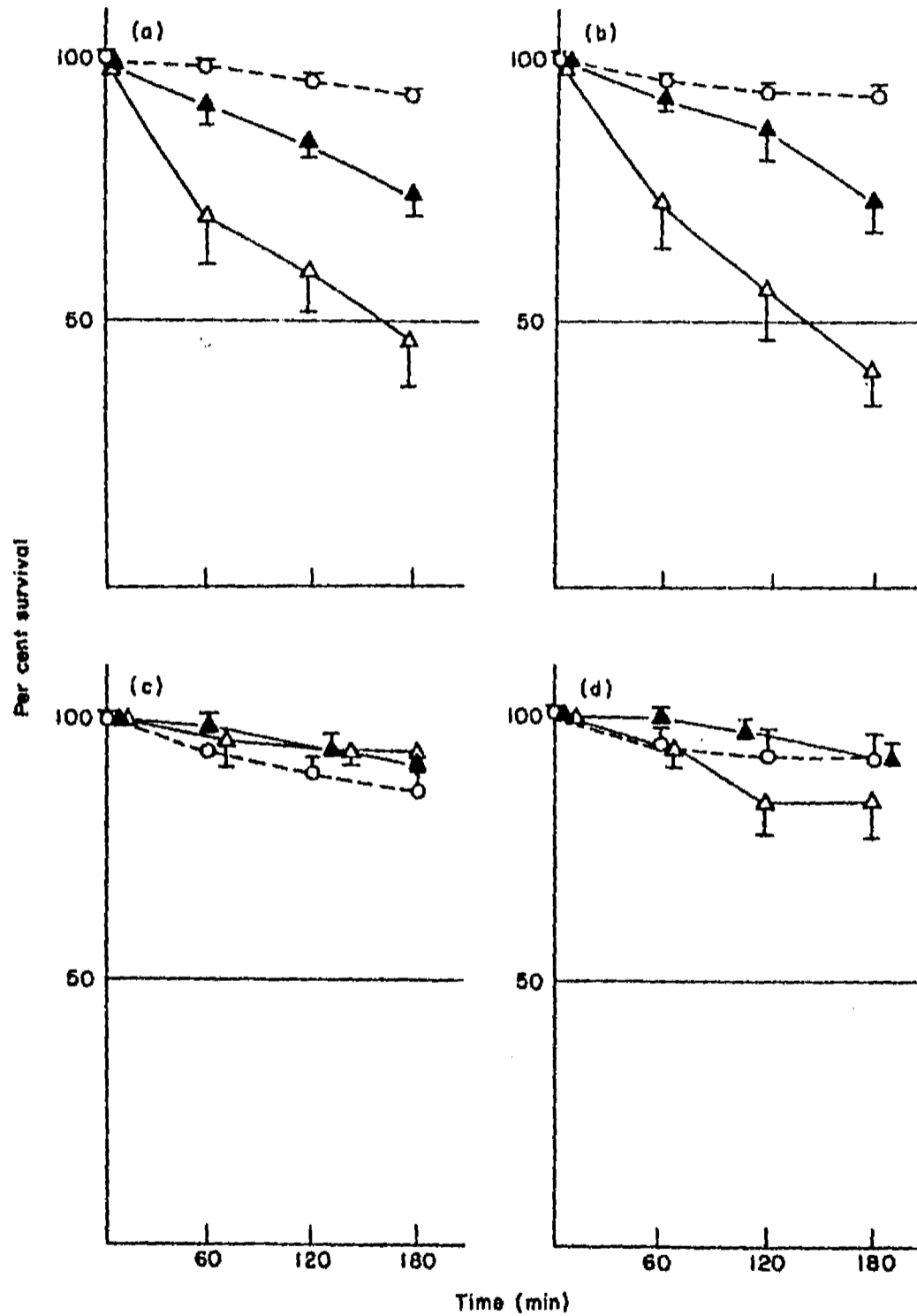


Figure 2. Eosinophil (a & b) and *E. histolytica* (c & d) survival, measured by trypan blue dye exclusion, in the presence of fresh immune serum (a & c) or heat-inactivated control serum (b & d). O, Control; ▲, 200:1; △, 10:1.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analysed by the non-parametric Mann-Whitney test (Siegel 1956).

Results

Mixtures containing eosinophils and amoebae in the 10:1 ratio with either immune or control serum disclosed a significant ($P < 0.001$) and comparable liberation of radioactivity from the first hour onward (Figure 1). This coincided chronologically with the

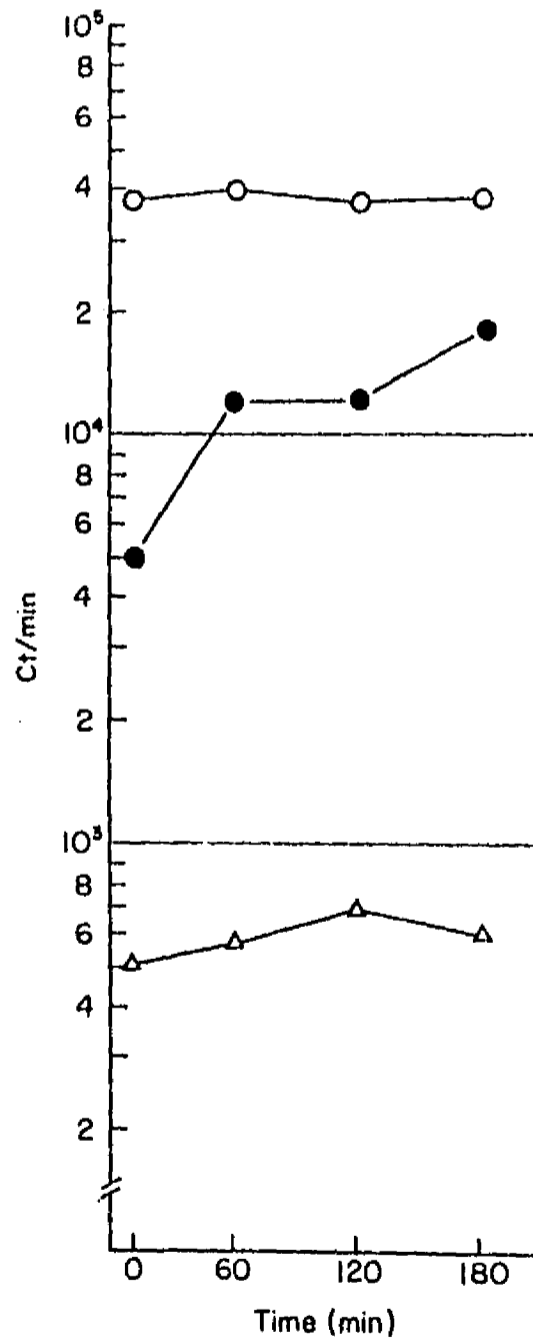


Figure 3. Representative experiment of ⁵¹Cr release (absolute counts, ct/min) from eosinophils exposed to virulent *E. histolytica*. O, Total release; ●, experimental release; Δ, spontaneous release.

Table 2. Eosinophil and *E. histolytica* survival in control serum

Cell	Incubation time (min)			
	0	60	120	180
Eosinophils	99 ± 1*	98 ± 1	98 ± 1	95 ± 1
<i>E. histolytica</i> (HMI-IMSS)	98 ± 1	95 ± 3	97 ± 2	94 ± 3

* Per cent, mean ± s.e. ($n=6$).

significant ($P < 0.001$) decrease in microscopic viability of eosinophils (Figure 2 a & b). A representative experiment expressing radioactive counts is shown in Figure 3. In contrast, the viability of amoebae did not change significantly over these incubation times when compared to their controls (Table 2), irrespective of the presence of fresh immune or control serum (Figure 2c & d).

Radioactivity release in the 200:1 ratio mixtures, in the presence of either immune or control serum, was significant ($P < 0.001$) and comparable from the first hour of incubation onward (Figure 1) but was not weaker than that found in the 10:1 ratio mixtures. The microscopic viability of eosinophils, however, began to decrease significantly ($P < 0.01$) only at 120 min incubation time (Figure 2a & b) and was thus weaker than that found in the 10:1 ratio mixtures ($P < 0.01$). Again the viability of amoebae remained essentially unchanged throughout these experiments, unaffected by the presence of immune or control serum (Figure 2c & d). Survival of eosinophils or *E. histolytica* incubated in immune serum, control serum or culture media (RPMI and TYI-S-33) alone was without significant change over 180 min incubation time (Figure 2a, b, c & d, Table 2). No clumping of eosinophils was observed, but rosetting of eosinophils (10–30 per amoeba) around amoebae was seen regularly from 1 h onward as well as ingestion of presumably killed eosinophils (trypan blue positive) by the parasites, in experiments using both eosinophil:amoeba ratios.

Discussion

The in-vitro confrontation of normal eosinophil PMN with a virulent strain of *E. histolytica* led to a dose- and time-related destruction of the former with no apparent effect on the viability of the latter. Since this occurred even in the presence of anti-amoeba antibodies and fresh serum factors (i.e. complement), it appears that such humoral factors failed to confer so much of a protection to the embattled eosinophil (Guerrant *et al.* 1981). These results are in accordance with the well-known cytolethal effect virulent *E. histolytica* exerts on human neutrophils (Guerrant *et al.* 1981, Ravdin *et al.* 1985, López-Osuna *et al.* 1986) and non-activated monocytes (Salata *et al.* 1985), although certain modifications in the conditions of such leucocyte-parasite confrontations can lead to

different outcomes: i.e. neutrophils are able to destroy less virulent strains of amoeba using a non-oxidative, serum-independent mechanism (Guerrant *et al.* 1981, Ravdin *et al.* 1985), and macrophages, for their part, can kill even virulent amoebae, also in the absence of serum factors, when activated by lymphokines (Salata *et al.* 1985). It remains to be seen whether eosinophils obtained either from individuals with hypereosinophilia (Silberstein & David 1987) (which incidentally does *not* occur in clinical amoebiasis (Kampmeier & Hinman 1937, Beeson & Bass 1977)) or those non-specifically activated with mitogen-elicited lymphokines or other factors (Spry 1985), perform differently when confronted with amoebae *in vitro*. Such 'activated' eosinophils are different from 'normal' eosinophils in more than one way and have been shown to possess heightened cytolytic properties towards helminths (i.e. *Schistosoma mansoni*) (David *et al.* 1980).

The destructive effect of *E. histolytica* was corroborated by studies using ^{51}Cr -labelled eosinophils. Trypan blue dye exclusion and radiolabel release from eosinophils ran virtually parallel from the first hour onward in the 10:1 (eosinophil:amoeba) mixtures; dye exclusion began at 120 min incubation time, while ^{51}Cr release was already present from the first hour onward but was not weaker than that found in the 10:1 ratio mixtures. This suggests not only differences in sensitivity between the two methods employed in this study, but also a stepwise cytolethal process exercised by the amoeba, similar to that described for the destruction of neutrophil PMN by the same parasite (Ravdin 1986). No effort was made to clarify the actual mechanism of destruction of eosinophils by amoebae, but the dynamics of the phenomenon and the microscopic observations (rosetting, ingestion) suggest a similar mechanism to that operating against neutrophils (Ravdin 1986).

The normal and comparable survival of amoebae incubated in fresh immune serum or heat-inactivated control serum alone appears to contradict previous reports on the deleterious effect of fresh normal and immune serum upon *E. histolytica in vitro* (Chévez *et al.* 1973, Huldt *et al.* 1979, Calderón & Schreiber 1985), but coincides with other observations, where *E. histolytica*—especially the virulent strains—under certain experimental conditions can evade the lytic effect of antibodies and complement (Huldt *et al.* 1979, Calderón & Tovar-Gallegos 1980, Aust-Kettis, Thorstensson & Sundqvist 1981, Reed *et al.* 1986). It seems reasonable to assume that the virulent strain of *E. histolytica* used in our experiments possessed such evasive properties.

In conclusion, the normal human eosinophil, even assisted by anti-amoebic antibodies and complement, appears to be as vulnerable to the lytic effects of *E. histolytica* as the neutrophil PMN. In fact, eosinophils present in the inflammatory reaction of early invasive amoebiasis are frequently seen to undergo destruction and even engulfment by the parasite (Griffin 1972). The few eosinophils present in the early lesions of invasive amoebiasis may thus not be playing a critical role in the host defence against this extracellular invader.

Acknowledgements

We wish to thank M.A. Barrientos for his advice in the statistical analysis of our results, L. Flores for her skillful technical help, the Central Blood Bank, IMSS, for providing the blood donors, and Mrs Aida Guerrero for patient secretarial assistance. This work was supported by a research grant PCSABNA-021552 from the National Council for Science and Technology of Mexico (CONACYT).

References

- ARTIGAS J., OTTO I. & KAWADA M.E. (1966) Acción de *Entamoeba histolytica* sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. *Boletín Chileno de Parasitología* **21**, 114
- AUST-KETTIS A., THORSTENSSON R. & SUNDQVIST K-G. (1981) Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. III. Fate of antibodies after binding to the cell surface. *Scandinavian Journal of Immunology* **13**, 473
- BEESON P.B. & BASS D.A. (1977) The eosinophil. In *Major Problems in Internal Medicine*, ed. L.H. Smith, Vol. 14, p. 1, W.B. Saunders, Philadelphia
- BOS H.J., LEIJENDEKKER W.J. & VAN DEN EIJK A.A. (1980) *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. *Experimental Parasitology* **50**, 342
- BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA V., MAHMOUD A.A.F., SHER A. & REES P.H. (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* **256**, 727
- CALDERON J. & TOVAR-GALLEGOS R. (1980) Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (México)* **11**, 241
- CALDERON J. & SCHREIBER R.D. (1985) Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* **50**, 560
- CHEVEZ A., ITURBE-ALESSIO I., SEPULVEDA B., SEGURA M. & ORTIZ-ORTIZ L. (1973) Respuesta morfodinámica de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a la acción del suero humano inmune correspondiente. *Archivos de Investigación Médica (México)* **4**, s71
- CHEVEZ A. & SEGURA M. (1974) Interacción entre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y los leucocitos de varias especies animales. *Archivos de Investigación Médica (México)* **5**, 373
- DAVID J.R., VADAS M.A., BUTTERWORTH A.E., AZEVEDO DE BRITO P., CARVALHO E.M., DAVID R.A., BINA J.C. & ANDRADE S.A. (1980) Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *New England Journal of Medicine* **303**, 1147
- DIAMOND L.S., HARLOW D.R. & CUNNICK C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 431
- GALLIN J.I., CLARK R.A. & KIMBALL H.R. (1973) Granulocyte chemotaxis: an improved *in vitro* assay employing ⁵¹Cr-labeled granulocytes. *Journal of Immunology* **110**, 233
- GALLIN J.I., CLARK R.A. & GOETZL E.J. (1978) Radioassay of leukocyte locomotion: A sensitive technique for clinical studies. In *Leukocyte Chemotaxis*, eds J.I. Gallin & P.G. Quie, p. 79, Raven Press, New York
- GLEICH G.J. & ADOLPHSON CH.R. (1986) The eosinophil leukocyte: structure and function. In *Advances of Immunology*, ed. F.J. Dixon, Vol. 39, p. 177, Academic Press, New York
- GREENE B.M., TAYLOR H.R. & AIKAWA M. (1981) Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus* eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *Journal of Immunology* **127**, 1611
- GRIFFIN J.L. (1972) Human amebic dysentery. Electron microscopy of *Entamoeba histolytica* contacting, ingesting, and digesting inflammatory cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **21**, 895
- GUERRANT R.L., BRUSH J., RAVDIN J.I., SULLIVAN J.A. & MANDELL G.L. (1981) Interaction between *Entamoeba histolytica* and human PMN neutrophils. *Journal of Infectious Diseases* **143**, 83
- HULDT G., DAVIES P., ALLISON A.C. & SCHORLEMMER H.U. (1979) Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature* **277**, 214
- JARUMILINTA R. & KRADOLFER F. (1964) The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leucocytes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **58**, 385
- KAGAN I.G. (1973) The immunology of amebiasis. *Archivos de Investigación Médica (México)* **4**, s169

- KAMPMEIER R.H. & HINMAN E.H. (1937) Amebic dysentery. An analysis of the laboratory data from 400 cases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **22**, 985
- KNIGHT R. (1977) An *in vitro* model for measuring the cytopathic effect of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology* **63**, 388
- KAZURA J.W. & GROVE D.I. (1978) Stage-specific antibody dependent eosinophil mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature* **274**, 588
- KRETSCHMER R.R., SEPULVEDA B., ALMAZAN A. & GAMBOA F. (1972) Intradermal reactions to an antigen (histolyticin) obtained from axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Tropical and Geographic Medicine* **24**, 275
- LOPEZ-OSUNA M., CONTRERAS B.A. & KRETSCHMER R. (1986) *In vitro* interaction of PMN leukocytes and *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (México)* **17**, 247
- MCCAUL T.F., POSTON R.N. & BIRD R.G. (1977) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: chromium release from labeled human liver cells in culture. *Experimental Parasitology* **43**, 342
- MADDISON S.E., KAGAN I.G. & ELSDON-DEW R. (1968) Comparison of intradermal and serologic tests for the diagnosis of amebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **17**, 540
- PITTMAN F.E., PITTMAN J.C. & EL-HASHIMI W.K. (1976) Human amebiasis: light and electron microscopic findings in colonic mucosal biopsies from patients with acute amebic colitis. In *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*, eds B. Sepúlveda & L.S. Diamond, p. 398, IMSS, México
- RAVDIN J.I. (1986) Pathogenesis of diseases caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytotoxicity. *Reviews of Infectious Diseases* **8**, 247
- RAVDIN J.I., MURPHY C.F., SALATA R.A., GUERRANT R.L. & HEWLETT E.L. (1985) *N*-acetyl- β -galactosamine-inhibitable adherence lectin to *E. histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence *in vitro*. *Journal of Infectious Diseases* **151**, 804
- REED L.S., CURD G.J., GIGLI I., GILLIN F.D. & BRAUDE A.I. (1986) Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology* **136**, 2265
- SALATA A.R., PEARSON R.D. & RAVDIN J.I. (1985) Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 491
- SIEGEL S. (1956) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, p. 116, McGraw-Hill Company, London
- SILBERSTEIN D.S. & DAVID J.R. (1987) The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunology Today* **8**, 380
- SPRY C.J.F. (1985) Synthesis and secretion of eosinophil granule substances. *Immunology Today* **6**, 332
- TSUTSUMI V. & MARTINEZ-PALOMO A. (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology* **130**, 112
- VADAS M.A., DAVID J.R., BUTTERWORTH A., PISANI N.T. & SIONGOK T.A. (1979) A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **122**, 1228

CAPÍTULO IV

Artículo : The destruction of E. histolytica by activated human eosinophils.

Parasite Immunol. 1992, 14: 579-586.

INTRODUCCIÓN

Nuestros estudios (Capítulo III) sobre la interacción *in vitro* de la E. histolytica virulenta y eosinófilos normales revelaron la destrucción de éstos últimos aún en presencia de factores humorales, (i.e. anticuerpos anti-amiba y complemento). Estos resultados establecieron la superioridad lítica de la amiba sobre los eosinófilos de manera similar a lo que ocurre con los neutrófilos (Guerrant, 1981, Ravdin et al., 1985, López-Osuna, Contreras and Kretschmer, 1986), los monocitos no activados (Salata, Pearson and Ravdin, 1985) y de hecho con leucocitos no fagocíticos como los linfocitos (Salata, Cox and Ravdin, 1987). Por otra parte y ya que los macrófagos una vez activados destruyen la E. histolytica (Salata, Pearson

and Ravdin, 1985), consideramos de interés estudiar al eosinófilo en las mismas condiciones. La activación confiere nuevas propiedades y funciones al eosinófilo, y lo hace parecerse en más de un aspecto al macrófago activado (Weller, 1991). Así, activamos eosinófilos normales incubándolos con fMLP, determinamos su estado de activación por medio de la emisión de quimioluminiscencia (Yazdanbakhsh et al., 1987), y por último los enfrentamos *in vitro* a trofozoitos de una amiba virulenta, la HM1-IMSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 (p. 582 del artículo)(López-Osuna, Arellano and Kretschmer, 1992) se puede observar que el fMLP activa a los eosinófilos, lográndose la máxima emisión de luz a los 11 min.

Al incubarse con eosinófilos activados, la *E. histolytica* virulenta es destruída ($p < 0.001$ comparando con los testigos) (i. e. amibas incubadas sólo en su medio y amibas incubadas con eosinófilos normales como se muestra en la Fig. 2a, Tabla 1)(pp. 581 y 583 del artículo).

Además, y a diferencia de lo que ocurre con los macrófagos activados (Salata, Pearson and Ravdin, 1985), aumentó la destrucción de la amiba por parte de los eosinófilos activados al añadirse suero inmune fresco a las mezclas (Fig. 2a, Tabla 1, $p < 0.01$).

Igual que los macrófagos activados, los eosinófilos activados también sucumben eventualmente en este proceso, aunque esta lisis es un poco más lenta que la de la *E. histolytica* (60 min vs 180 min), (Fig. 2b, Tabla 1).

El mecanismo a través del cual los eosinófilos normales y los eosinófilos activados son eventualmente destruídos por la amiba pudiera no ser el mismo. La destrucción secundaria y tardía de los eosinófilos activados es similar a la ya descrita para los macrófagos activados, donde existe una clara correlación entre el número de amibas muertas y la destrucción subsecuente de macrófagos

(Salata, Pearson and Ravdin, 1985). La destrucción de eosinófilos normales por parte de la *E. histolytica* recuerda a la apoptosis, por la fragmentación de DNA que se observa (McCoy, Mann and Petri, 1994).

Aunque el eosinófilo no se ha identificado como célula efectora en enfermedades de protozoarios [con excepción del *Trypanosoma cruzi* y la *Isospora belli* (Sanderson, López and Bunn-Moreno,1977; Weller, 1991)], y la eosinofilia circulante - característica de las enfermedades helmínticas - no acompaña a las enfermedades por protozoarios (Butterworth and Thorne, 1993); éstas no son razones suficientes para dejar de pensar que el eosinófilo pudiera ejercer una acción importante en alguna de estas enfermedades (Weller, 1991). De hecho, recientemente se ha observado una actitud " revisionista " con respecto al papel de los eosinófilos en enfermedades protozoarias tales como la malaria y la tripanosomiasis (Butterworth and Thonre, 1993).

En las reacciones inflamatorias tempranas contra amibas invasoras se han observado regularmente algunos eosinófilos (Griffin, 1972; Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988); como éstos se lisan rápidamente en los tejidos inflamados, su escasa presencia o su ausencia no constituyen necesariamente un reflejo de su papel en el proceso. La detección de proteínas citoplasmáticas características del eosinófilo (MBP, EPO, ECP y EDN) podría constituir una evidencia más

confiable de su participación que su identificación propiamente celular en cortes histológicos (Venge, 1990).

Falta por aclarar el mecanismo preciso - oxidativo o no oxidativo - por el cual los eosinófilos activos destruyen a la *E. histolytica* virulenta y el papel que pudieran tener *in vivo* al enfrentar a este parásito. Sin embargo, los datos de estos experimentos realzan las semejanzas, al menos funcionales, entre los eosinófilos y los macrófagos activados, y abren nuevos horizontes en la exploración de los eosinófilos como posible célula efectora en la amibiasis invasora, quizá como la responsable principal de que muchos casos de amibiasis invasora aborten oportunamente sin trazas clínicas o histopatológicas.

Como ya se mencionó, los neutrófilos y los eosinófilos son constituyentes regulares de las reacciones inflamatorias tempranas. Ya que los neutrófilos son notoriamente incapaces de destruir a la *E. histolytica* virulenta, aún asistidos por opsoninas, se podría especular que los eosinófilos activados pudieran contribuir a que la *E. histolytica* no alcance a invadir los tejidos o a establecerse en ellos.

The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils

MARTHA LÓPEZ-OSUNA, JORGE ARELLANO &
ROBERTO R. KRETSCHMER

*Division of Immunology, Unidad de Investigación Biomedica, Centro
Medico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social and Division of
Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Nacional
Autonoma de Mexico, Mexico City, Mexico*

Accepted for publication 1 May 1992

Summary Unlike normal (i.e., non-activated) human eosinophils that are unable to destroy virulent *Entamoeba histolytica* even in the presence of antibodies and complement, activated eosinophils effectively destroy the parasite *in vitro* without the help of opsonins, yet increase this capacity with their assistance. Many activated eosinophils succumb in the process as well, probably victims of toxic products released by dying amoebae. Human activated eosinophils thus behave more like activated macrophages than like neutrophil polymorphonuclear leucocytes that are notoriously incompetent in dealing with virulent amoebae. As a regular constituent of early inflammatory reactions, and notwithstanding the absence of blood and tissue eosinophilia in invasive amoebiasis, the activated eosinophil may play a role in the defence against *E. histolytica*.

Keywords: *E. histolytica*, eosinophils

Introduction

In a previous publication we demonstrated the ability of virulent axenic *Entamoeba histolytica* to destroy normal human eosinophil polymorphonuclear leucocytes (eosinophils), even in the presence of anti-amoebic antibodies and complement, the amoeba emerging virtually unharmed from the process (López-Osuna & Kretschmer 1989). Our results were in accordance with the well known cytolethal effect that virulent *E. histolytica* exerts on human neutrophil polymorphonuclear leucocytes (Guerrant *et al.* 1981, Ravdin *et al.* 1985, López-Osuna, Contreras & Kretschmer 1986), lymphocytes (Salata, Cox & Ravdin 1987) and non-activated monocytes (Salata, Pearson & Ravdin 1985). In the present study we explored the performance of human eosinophils co-incubated with axenic trophozoites of a virulent strain of *E. histolytica*, after their activation with f-Met-

Correspondence: Roberto R. Kretschmer, Head of Division of Immunology, Jefatura de Investigación Médica, Centro Médico Nacional, IMSS, Apartado Postal 73-032, CP 03020, México, DF, México.

Leu-Phe (FMLP) (Yazdanbakhsh *et al.* 1987a). This activation induces a new set of properties and functions in the eosinophil, so that in many ways it now resembles activated macrophages (Weller 1991), known to be the most proficient effector cells against virulent *E. histolytica* (Salata *et al.* 1985, Kretschmer & López-Osuna 1990).

Materials and methods

EOSINOPHILS

Fasting human venous blood (500 ml) was obtained from 26 voluntary healthy adult donors (i.e., eosinophil count 200–300/mm³). The buffy coat was processed by the method of Böyum (1968). The erythrocytes in the resulting pellet (which contained also the polymorphonuclear cells) were lysed with cold ammonium chloride (Roos & De Boer 1986) and were centrifuged at 4°C for 7 min at 400 g. The original specific gravity was restored by resuspending the cell pellet in Hanks' balanced salt solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA) with 20 mM HEPES (Sigma) and 5% fetal calf serum v/v, pH 7.4. The cell suspension was incubated for 30 min at 37°C before applying it to a discontinuous Percoll (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) gradient following the method of Yazdanbakhsh *et al.* (1987b). The eosinophil fraction was collected from the lower interface of the gradient with a fine tip Pasteur pipette. Cells were washed once in RPMI-1640 pH 7.4 (Sigma) and resuspended in the same medium at a concentration of 1×10^7 cells/ml. Viability and purity of the eosinophils were assessed by trypan blue dye exclusion and by differential counts with the modified Wright-Giemsa stain (Ring 1975) respectively. Recovery ranged from 50 to 80% with a purity of $\geq 90\%$ (the rest being neutrophil polymorphonuclear leucocytes) and viability $\geq 95\%$.

ACTIVATION OF EOSINOPHILS

Eosinophils were incubated with FMLP 10^{-6} M (Sigma) at 37°C for 30 min, after which they were washed once with RPMI-1640 and resuspended to the required concentration in the same medium (Ramesh *et al.* 1987). Activation was assessed by chemiluminescence following the methods of Yazdanbakhsh *et al.* (1987b) and Van Dyke, Van Scott & Castranova (1986) using the out-of-coincidence mode of a beta scintillator (Packard PRIAS, Packard Ins. Co., Downers Grove, IL., USA). Non-activated cells in HEPES-buffer alone, non-activated cells with Lucigenin (Sigma) and buffer, and Lucigenin in buffer alone were included as controls. Eosinophils were regularly activated, yet only cell samples reaching at least 15000 cpm by 13 min were further processed.

AMOEBAE

Axenicly grown trophozoites of *E. histolytica* (logarithmic phase, 48–72 h) of the virulent strain HM1-IMSS were obtained from the Laboratorio de Inmunología, UIB-IMSS or from the Subdivisión de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, México. Culture flasks were chilled in iced water and were centrifuged at 4°C for 10 min at 100 g. The pellet was washed twice with cold PBS and resuspended in TYI-S-33

medium (Diamond, Harlow & Cunnick 1978) at 10^6 amoebae/ml. Amoebic viability ($\geq 95\%$) was assessed by trypan blue dye exclusion.

CO-INCUBATION OF EOSINOPHILS AND AMOEBAE

Normal or activated eosinophils were mixed with amoebae in 0.6 ml polypropylene microcentrifuge tubes (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA., USA) in a 200:1 (eosinophils: amoeba) ratio (Guerrant *et al.* 1981) in a final volume of 500 μ l of TYI-S-33 medium. Additional tubes contained also 10% fresh anti-amoeba immune human serum (1:3200, ELISA titre) (pool of four AB/Rh⁺ sera from amoebic liver abscess patients, kept frozen at -70°C in 500 μ l aliquots until used). Eosinophils or amoebae incubated alone in their respective medium, with or without fresh immune serum, were used as controls. The tubes were incubated at 37°C and after brief (3 min) chilling and mixing (Diamond *et al.* 1978), 0.1 ml aliquots were sampled at 0, 60, 90 and 180 min. The number of viable cells was determined microscopically in a Neubauer chamber after trypan blue staining. Results were expressed as per cent survival:

$$\% \text{ survival} = \frac{\text{viable cells/ml at 'n' min}}{\text{viable cells/ml at 0 min}} \times 100.$$

Co-incubation experiments with normal eosinophils consisted of six runs, all other co-incubation experiments of 20 runs, all in duplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

Chemiluminescence results were analysed by the Student *t* test (Colton, 1974). Results of the co-incubation experiments were analysed by the non-parametric Mann-Whitney *U* test (Siegel 1956).

Table 1. Percent survival of co-incubated *E. histolytica* and activated eosinophils

Experiment	Survival of <i>E. histolytica</i> (min)			Experiment	Survival of eosinophils (min)		
	60	120	180		60	120	180
Eh (<i>n</i> = 20)	99 ± 1 ^a	95 ± 3 ^b	90 ± 4 ^c	Aeos (<i>n</i> = 20)	88 ± 3 ^q	82 ± 4 ^r	82 ± 4 ^s
Eh + is (<i>n</i> = 20)	92 ± 2 ^d	92 ± 3 ^e	88 ± 3 ^f	Aeos + is (<i>n</i> = 20)	95 ± 2 ^t	90 ± 3 ^u	89 ± 3 ^v
Eh + Aeos (<i>n</i> = 20)	75 ± 5 ^g	54 ± 7 ^h	40 ± 7 ⁱ	Aeos + Eh (<i>n</i> = 20)	81 ± 4 ^w	73 ± 5 ^x	63 ± 6 ^y
Eh + Aeos + is (<i>n</i> = 20)	54 ± 8 ^j	34 ± 7 ^k	20 ± 5 ^m	Aeos + Eh + is (<i>n</i> = 20)	74 ± 5 ^z	71 ± 6 ^{aa}	61 ± 7 ^{bb}
Eh + Neos (<i>n</i> = 6)	99 ± 1 ⁿ	97 ± 2 ^o	91 ± 4 ^p	Neos + Eh (<i>n</i> = 6)	95 ± 3 ^{cc}	86 ± 4 ^{dd}	73 ± 6 ^{ee}

Abbreviations: a (etc.) = mean ± s.e., Eh = *E. histolytica*, is = anti-amoeba immune serum, Aeos = activated eosinophils, Neos = normal (non-activated) eosinophils, NS = not significant.

Statistical analysis: a vs g *P* < 0.001; b vs h *P* < 0.001; c vs i *P* < 0.001; j vs g *P* < 0.03; k vs h NS; m vs i *P* < 0.005; n vs a NS; o vs b NS; p vs c NS; d vs a *P* < 0.001; e vs b NS; f vs c NS; w vs q NS; x vs r NS; y vs s *P* < 0.05; z vs t *P* < 0.003; aa vs u *P* < 0.05; bb vs v *P* < 0.001; cc vs dd NS; cc vs ee *P* < 0.01; dd vs ee *P* < 0.03; ee vs w NS; dd vs x NS; ee vs y NS.

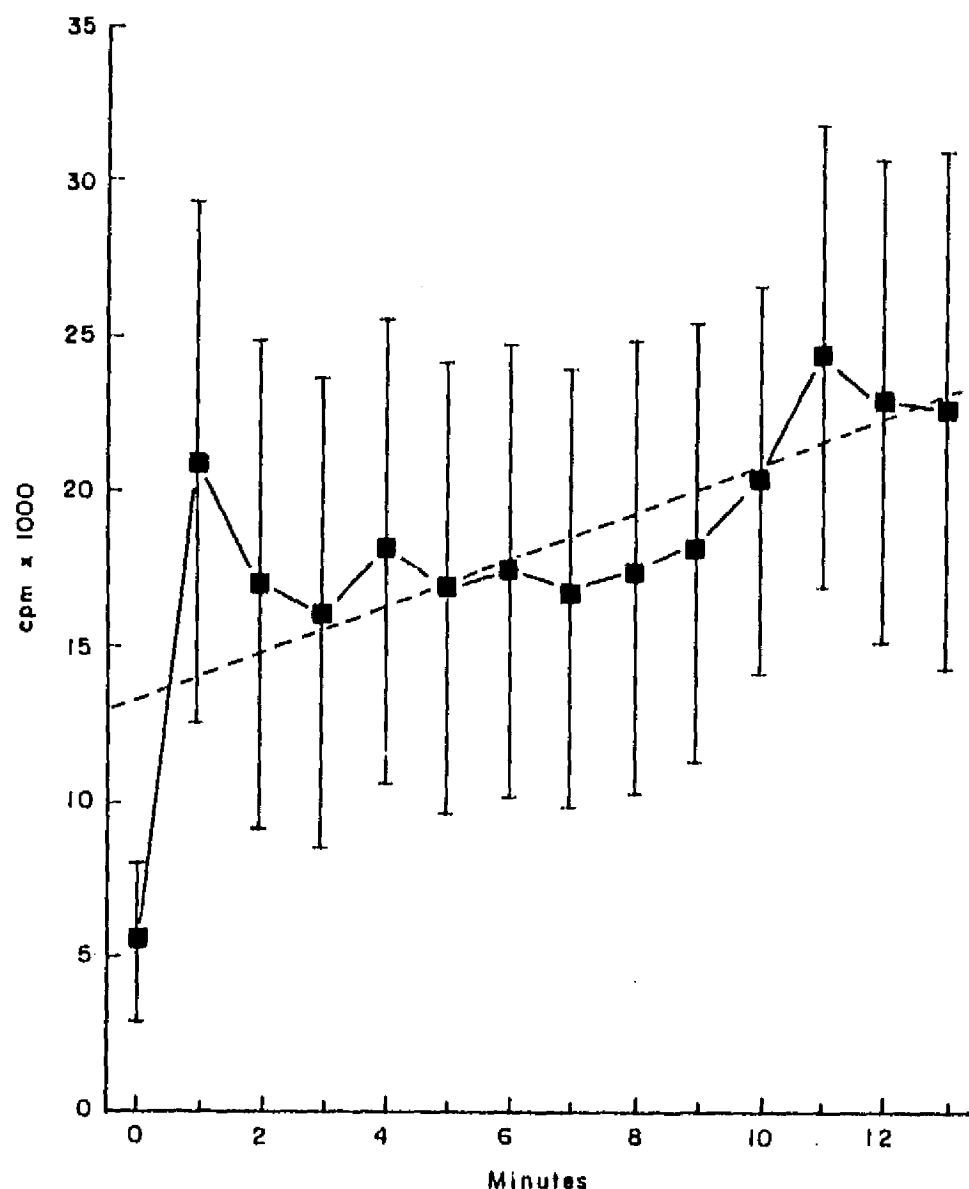


Figure 1. Chemiluminescence of human eosinophils activated by f-Met-Leu-Phe (FMLP). —■— X + s.e.m. - - - Trend (best fit by least squares).

Results

Chemiluminescence of activated eosinophils rose sharply from 5426 ± 2549 cpm (per 10^5 cells, mean \pm s.e.) to 20927 ± 8382 cpm within the first min, falling then between 16008 ± 7596 cpm and 18067 ± 7464 cpm during the next six min and raising slowly thereafter to a maximum of 24180 ± 7362 cpm by 11 min. Activation varied between cells samples, yet the trend clearly revealed the appropriate activation of the cells (zero min *vs* 11 min, $P < 0.03$) (Figure 1). Control tubes disclosed no significant increase in cpm.

E. histolytica were significantly destroyed when co-incubated with activated human eosinophils, their survival steadily decaying through the observation period when compared to their controls (i.e., amoebae incubated alone) ($P < 0.001$) (Figure 2a, Table 1). This destruction of amoebae was significantly enhanced by the presence of fresh immune serum ($P < 0.01$). In contrast, *E. histolytica* remained essentially unharmed when co-incubated with normal (i.e., non-activated) eosinophils. Incidentally, adequate survival of *E. histolytica* mixed with fresh anti-amoebic immune serum alone further testifies to the virulence of the strain used in these studies (Reed *et al.* 1986).

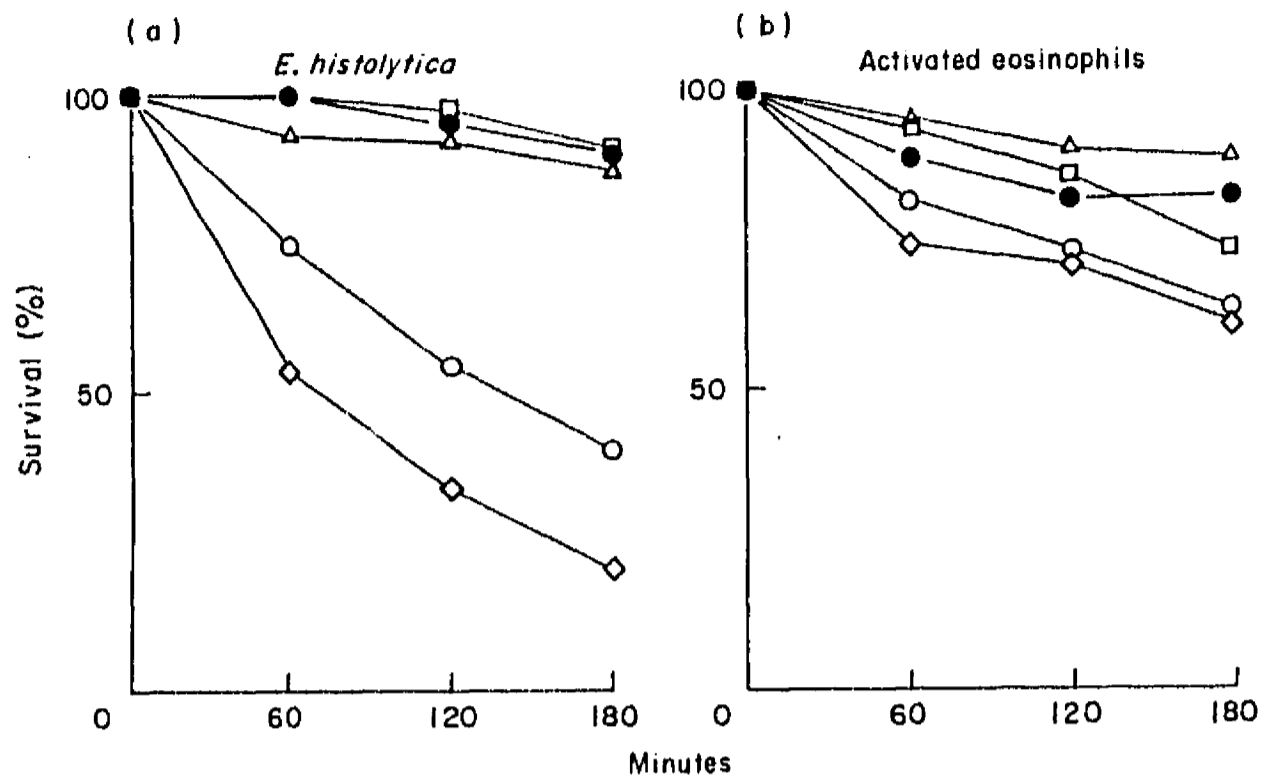


Figure 2. Percent survival of co-incubated *E. histolytica* (a) and activated eosinophils (b). Curves are drawn with mean values. Mean values and s.e. are shown in Table 1. (a) —●—, *E. histolytica* (Eh), —△— Eh + anti-amoeba immune serum (is), —○— Eh + activated eosinophils (Acos), —◇— Eh + Acos + is, —□— Eh + normal eosinophils (Neos). (b) —●— Acos, —△— Acos + is, —○— Acos + Eh, —◇— Acos + Eh + is, —□— Neos + Eh.

Activated eosinophils co-incubated with virulent amoebae also underwent gradual destruction (Figure 2b and Table 1). This was significant ($P < 0.05$) only at the 180' incubation time in the experiments lacking fresh immune serum, yet was significant ($P < 0.05$ to 0.001) throughout the whole incubation process when fresh immune serum was present. Finally, as expected (López-Osuna & Kretschmer 1989), normal eosinophils were destroyed by virulent *E. histolytica* ($P < 0.01$ at 180 min). Even though more activated eosinophils than normal eosinophils appeared to succumb when co-incubated with virulent *E. histolytica*, this observation was not statistically significant.

Discussion

Unlike normal (i.e., non-activated) human eosinophils that are unable to destroy virulent axenic *E. histolytica* (López-Osuna & Kretschmer 1989), even in the presence of anti-amoebic antibodies and complement, FMLP-activated human eosinophils effectively kill this cytolytic protozoan parasite *in vitro*. This capacity of the activated eosinophils resembles the ability of lymphokine-activated monocyte-derived macrophages to destroy virulent *E. histolytica* (Salata *et al.* 1985). Just as with activated macrophages, the amoebolytic effect of activated eosinophils takes place in the absence of antibodies and complement. Unlike activated macrophages (Salata *et al.* 1985), however, activated eosinophils killed significantly more amoebae in the presence of such opsonic factors.

About 40% of the activated eosinophils also succumb during the process, perhaps as a result of toxic products released by dying amoeba (Salata *et al.* 1985). This was more noticeable when eosinophils and amoebae were incubated in the presence of fresh human serum. A serum factor said to improve the overall *in vitro* survival of eosinophils (Lamas, Marcotte & Schleimer 1989) may just have enhanced the contrast between the different eosinophil decay curves. Even so, the rate of eosinophil destruction clearly tracked that of the amoebae, at least at the eosinophil:amoeba ratio employed. Finally, even though more activated eosinophils than normal eosinophils appeared to be destroyed in their respective co-incubation with amoebae this observation was not statistically significant. The mechanism through which normal or activated eosinophils are destroyed by virulent *E. histolytica* may not be the same. The late and probably secondary destruction of activated eosinophils resembles the decay of activated macrophages described by Salata *et al.* (1985) in their study, where a correlation was established between the number of killed amoebae and the subsequent destruction of macrophages over a range of leucocyte:amoeba ratios.

In contrast with their effector role in helminthic diseases (Gleich & Adolphson 1986, Butterworth *et al.* 1975, Capron, Torpier & Capron 1979) the eosinophil has not been recognized as an important effector cell in protozoan diseases except in the cases of *Trypanosoma cruzi* and *Isoospora belli* (Sanderson *et al.* 1977, Weller 1991). Blood eosinophilia—a landmark in helminthic diseases (Weller & Goetzl 1980)—does not occur in protozoan diseases. However, the absence of blood eosinophilia does not preclude a tissular role of eosinophils (Weller 1991), and some eosinophils are regularly found in the early inflammatory reaction against invading amoebae (Tsutsumi *et al.* 1988). Moreover, since eosinophils undergo prompt cytolysis in inflamed tissues, their scant presence is not a reliable reflection of their actual role in the process either. The detection of cytoplasmic proteins unique to eosinophils (MBP, ECP, EDN, and EPO) may constitute better evidence of their involvement than their actual identification in routine histological analysis of inflamed tissues (Gleich *et al.* 1984).

Neutrophils and eosinophils are regular ingredients of early inflammatory reactions. Since neutrophils are notoriously incompetent in handling virulent *E. histolytica* (Ravdin & Guerrant 1982) it may be valid to speculate if activated eosinophils may contribute to the many unrecorded instances where *E. histolytica* fails to invade the host's intestinal tissues and beyond. The precise mechanism through which activated eosinophils kill virulent *E. histolytica*, as well as the actual role they may play in the *in vivo* handling of this parasite, remain to be elucidated.

Our results suggest that the eosinophil should not be dismissed as a potential effector cell against invading *E. histolytica* solely on traditional arguments (i.e., absence of blood and tissue eosinophilia or poor *in vitro* performance of non-activated cells). They also add to the growing evidence linking, at least functionally, eosinophils to macrophages (Silberstein & David 1987), a recognition that may contribute to the long due coming-of-age of this remarkable cell.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Ruy Pérez Tamayo for his critical reading of the manuscript, Ms Aida Guerrero and Rosa Delgado for their patient secretarial help, and

the Central Blood Bank, CMN-IMSS for providing the blood donors. This work was supported by a research grant PCSABNA-021552 from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT).

References

- BÖYUM A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **21** (97), 77
- BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA V., MAHMOUD A.A.F., SHER A. & REES P.H. (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* (London) **256**, 727
- CAPRON M., TORPIER G. & CAPRON A. (1979) *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *Journal of Immunology* **123**, 2220
- COLTON T. (1974) Inference on means. In *Statistics in Medicine*, p. 99, Little Brown & Co., Boston, USA
- DIAMOND L.S., HARLOW D.R. & CUNNICK, C.C. (1978) A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 431
- GLEICH G.J., SCHROETER A.L., MARCOUX J.P., SACHS M.I., O'CONNELL E.J. & KOHLER P.F. (1984) Episodic angioderma associated with eosinophilia. *New England Journal of Medicine* **310**, 1621
- GLEICH G.J. & ADOLPHSON C.R. (1986) The eosinophilic leucocyte: structure and function. *Advances in Immunology* **39**, 1977
- GUERRANT R.L., BRUSH J., RAVDIN J.I., SULLIVAN J.A. & MANDELL G.L. (1981) Interaction between *Entamoeba histolytica* and human PMN neutrophils. *Journal of Infectious Diseases* **143**, 83
- KRETSCHMER R.R. & LÓPEZ-OSUNA M. (1990) Effector mechanisms and immunity to amebas. In *Amebiasis. Infection and Disease by Entamoeba histolytica*, ed. R. Kretschmer, p. 105. CRC Press, Boca Raton, USA
- LAMAS A.M., MARCOTTE G.V., SCHLEIMER R.P. (1989) Human endothelial cells prolong eosinophil survival: regulation by cytokines and glucocorticoids. *Journal of Immunology* **142**, 3978
- LÓPEZ-OSUNA M., CONTRERAS B.A. & KRETSCHMER R. (1986) *In vitro* interaction of PMN leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (México)* **17**, 247
- LÓPEZ-OSUNA M. & KRETSCHMER R.R. (1989) Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunology* **11**, 403
- RAMESH K.S., ROCKLIN R.E. & PINCUS S.S. (1987) Activated human eosinophils synthesize new proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **923**, 241
- RAVDIN J.I. & GUERRANT R.L. (1982) A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Review of Infectious Diseases* **4**, 1185
- RAVDIN, J.I., MURPHY C.F., SALATA R.A., GUERRANT R.L. & HEWLETT E.L. (1985) N-acetyl- β -galactosamine-inhibitable adherence lectin to *E. histolytica* I. Partial purification and relation to amoebic virulence *in vitro*. *Journal of Infectious Diseases* **151**, 804
- REED S.L., CURD J.G., GIGLI I., GILLIN F.D. & BRAUDE A.I. (1986) Activation of complement by pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology* **136**, 2265.
- RING A.M. (1975) Wright-Giemsa modified stain. Model Laboratory Procedure Manual (Hematology). *Laboratory Medicine* **6**, 28
- ROOS D & DE BOER M. (1986) Purification and cryopreservation of phagocytes from human blood. In *Methods of Enzymology* (Vol 132), eds G. DiSabato & J. Everse, p. 225, Academic Press, New York, USA

- SALATA R.A., PEARSON R.D. & RAVDIN J.I. (1985) Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amoebae by the activated macrophage. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 491
- SALATA R.A., COX J. & RAVDIN J.I. (1987) The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunology* **9**, 249
- SANDERSON C.J., LÓPEZ A.F. & BUNN-MORENO M. (1977) Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature (London)* **268**, 340
- SIEGEL S. (1956) In *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, p. 116, McGraw Hill Book Co., New York, USA
- SILBERSTEIN D.S. & DAVID J.R. (1987) The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunology Today* **8**, 380
- TSUTSUMI V. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology* **130**, 112
- VAN DYKE K., VAN SCOTT M.R. & CASTRANOVA V. (1986) Measurement of phagocytosis and cell mediated cytotoxicity by chemiluminescence. In *Methods in Enzymology* (Vol. 132), eds G.DiSibato & J.Everse, p. 1498, Academic Press, New York, USA
- WELLER P.F. & GOETZL E.J. (1980) The human eosinophil: roles in host defense and tissue injury. *American Journal of Pathology* **100**, 793
- WELLER P.F. (1991) The immunobiology of eosinophils. *New England Journal of Medicine* **324**, 110
- YAZDANBAKHSH M., ECKMANN, C.M., KOENDERMAN L., VERHOEVEN A.J. & ROOS D. (1987a) Eosinophils do respond to fMLP. *Blood* **70**, 379
- YAZDANBAKHSH M., ECKMANN C.M., DE BOER M. & ROSS D. (1987b) Purification of eosinophils from normal human blood, preparation of eosinoplasts and characterization of their functional response to various stimuli. *Immunology* **60**, 123

CAPÍTULO V

Artículo : *E. histolytica* and eosinophils. II. Testicular lesions produced by amebas in eosinophilic rats.

Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1986, 17 (S): 247-249.

INTRODUCCIÓN

Mientras realizábamos los estudios *in vitro* de la confrontación entre eosinófilos y la *E. histolytica* virulenta, reflexionamos sobre la eventual necesidad de realizar experimentos *in vivo*, utilizando algún modelo experimental que reprodujera las lesiones del AHA lo más parecido a las del humano con el fin de aclarar si la capacidad amebolítica del eosinófilo activado se ejerce igualmente *in vivo*. El primer animal que utilizamos para inducir eosinofilia fue la rata, en la que esto

se logra por medio de la inoculación intravenosa de Sephadex (Laycock, Smith and Spicer, 1986).

Aprovechamos la doble contingencia de esta eosinofilia inducida y la familiaridad con un modelo ya establecido de amibiasis testicular en la rata, en el que un testículo es inoculado *in situ* con la amiba y se usa como espacio experimental en tanto que el testículo contralateral funge como conveniente testigo recibiendo sólo solución salina (Pérez-Tamayo et al., 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eosinofilia en ratas se obtuvo mediante dos inoculaciones de Sephadex G200 en suspensión por vía intravenosa. La eosinofilia ($\geq 4\%$) en la sangre se logró entre los días 19 y 25 postinyección. Los eosinófilos en la rata son normalmente de $\leq 2\%$ (Baker, Lindsay and Weisdrott, 1979).

La amibiasis testicular se logró con la inyección intratesticular de *E. histolytica* HM1-IMSS, observándose las lesiones características de esta fase temprana (6 h) en este tipo de modelo : edema intertubular, infiltración focal por PMN, amibas no viables rodeadas de PMN, eosinófilos ocasionales, áreas focales de necrosis y descamación tubular (López-Osuna et al., 1990).

Cuantitativa y cualitativamente los testículos inyectados con *E. histolytica* en las ratas eosinofílicas y sus testigos mostraron lesiones comparables en todo. La inyección de solución salina fisiológica en el testículo contralateral no provocó lesiones ni en los animales eosinofílicos ni en los normales.

En las lesiones testiculares de ambos grupos pudo observarse ocasionalmente - y en forma comparable - algún eosinófilo en el infiltrado inflamatorio. Debido a estos resultados fue necesario escoger otro modelo experimental ya que la resistencia natural de la rata a la amibiasis de por sí no la constituye en un modelo ideal para estudiar amibiasis.

MARTHA LOPEZ-OSUNA
RUY PEREZ-TAMAYO,
PAUL FRENK
ROBERTO KRETSCHMER

El eosinófilo y la *Entamoeba histolytica*. II. Lesiones testiculares amebianas producidas en ratas eosinofílicas

Martha López-Osuna, Ruy Pérez Tamayo, Paul Frenk y Roberto Kretschmer. División de Inmunología. Unidad de Investigación Biomédica, CMN-IMSS y Subdivisión de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F.

Entamoeba histolytica and eosinophiles. II Testicular lesions produced by amebas in eosinophilic rats

Solicitud de sobretiros (request for reprints): *Martha López-Osuna.* Apartado Postal No. 73-032, C.P. 03020. México, D.F.

Resumen

Aunque la eosinofilia no es una característica de la amebiasis, con regularidad se encuentran polimorfonucleares eosinófilos en la reacción inflamatoria que acompaña las fases tempranas de la amebiasis invasora. Para conocer mejor la posible intervención de esta célula en la confrontación con la *E. histolytica*, se produjeron lesiones testiculares mediante la inyección directa de amebas en ratas con eosinofilia. La eosinofilia ($\geq 4\%$) fue inducida en ratas Sprague Dawley (macho) inyectando una suspensión de Sephadex G200 por vía intravenosa. Las ratas eosinofílicas y las ratas (testigos) normales se retaron posteriormente con una inyección intratesticular (testículo izquierdo) de 2×10^6 amebas de la cepa virulenta HM1-IMSS. El testículo contralateral se inyectó con BFS-A sirviendo como testigo. Los testículos se extirparon 5 hs. después de la inyección y se evaluaron histológicamente. El tamaño y la celularidad de las lesiones testiculares producidas por las amebas fueron comparables en las ratas eosinofílicas y en las normales, en tanto que no se observó daño alguno en los testículos inyectados con BFS-A. Dentro de los límites del modelo experimental utilizado, los resultados sugieren que el eosinófilo no interviene en forma importante en la génesis de las lesiones testiculares producidas por *E. histolytica*.

Abstract

Even though eosinophiles are not characteristic of amebiasis, polymorphonuclear eosinophilic cells are regularly found in the inflammatory lesion which occurs in the early phases of amebic invasion. To acquire better knowledge of the intervention of these cells when confronted with *E. histolytica*, testicular lesions were produced by means of direct injection of amebas in rats with eosinophilia. Eosinophilia ($\geq 4\%$) was induced in male Sprague Dawley rat do not participate in a substantial way in the genesis an intravenous injection of Sephadex G200 suspension. Later, both the eosinophilic and normal (control) rats were challenged with an intratesticular injection (on the left side) of 2×10^6 amebas of the virulent strain HM1-IMSS. The other testicle was injected with BFS-A to serve as control. The testicles were removed 5 hours later and evaluated histologically. The size and cellularity of the testicular lesions produced by the ameba on both eosinophilic and controls were similar, whereas lesions were not found in testicles injected with BFS-A. Within the limits of our experimental model, the results suggest that eosinophiles of tissur lesions produced by *E. histolytica*.

Introducción

La inflamación reviste características especiales en la amibiasis invasora. En las fases tempranas la inflamación es intensa en tanto que en los estadios avanzados es escasa.^{1,2} Todavía desconocemos el significado biológico de esta peculiar secuencia inflamatoria^{3,4} pero seguramente no es irrelevante a la escasa cicatrización y perfecta regeneración tisular que se observa al curar la lesión.^{5,6} Algunos modelos de amibiasis experimental sugieren que es el exudado inflamatorio el que provoca la necrosis tisular y no la *E. histolytica*,⁷ en tanto que otros adscriben un papel protector a la inflamación e incriminan a la *E. histolytica* y sus proteínas en la necrosis de los tejidos invadidos.⁸

In vitro, la *E. histolytica* virulenta es capaz de resistir la acción fagocítica de los polimorfonucleares (PMN) neutrófilos y eosinófilos^{9,10,11,12,13,14,15} y de hecho los destruye con facilidad. En la inflamación temprana provocada por *E. histolytica* en el intestino y en el hígado se han identificado algunos eosinófilos.^{4,16} Empero, desconocemos el papel que juega el eosinófilo en el curso de esta infección que, a diferencia de otras parasitosis, no se acompaña de eosinofilia en la sangre. En la rata de laboratorio es fácil provocar eosinofilia mediante la inyección de Sephadex G200.¹⁷ Es igualmente fácil producir en este animal lesiones amibianas mediante la inoculación intratesticular de *E. histolytica*.¹⁸ Se aprovechó esta doble contingencia experimental con el fin de explorar *in vivo* el papel que juega el eosinófilo en la amibiasis invasora.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 200 - 250 g de peso.

Inducción de eosinofilia.¹⁷ Se preparó una suspensión de Sephadex G200 (Pharmacia, Uppsala, Sweden; tamaño de partícula 40-120 μm) (0.5 mg/ml) en solución salina y se almacenó a 4°C por 48 hs para su imbibición. Un ml de esta suspensión se inoculó por vía intravenosa en la cola de las ratas experimentales los días 0 y 14 del experimento. Se tomaron muestras de sangre para cuentas totales y diferenciales de leucocitos los días 0 (antes de la inyección), 14, 19 y los subsiguientes hasta identificar el máximo de eosinofilia (19-25 días).

Suspensión de *E. histolytica*. La cepa virulenta HM1-IMSS de *E. histolytica* (proporcionada por el Laboratorio de Inmunología, UIB, IMSS) se cosechó a las 72 hs de cultivo en medio axénico,¹⁹ se enfrió el frasco con agua de hielo por 10 min y se lavaron las amibas con buffer de fosatos-salina-amiba pH7.2 (BFS-A). Las amibas se resuspendieron a una concentración de $10 \times 10^6/\text{ml}$. se verificó su viabilidad ($\geq 99\%$) por exclusión de azul tripano.

Amibiasis testicular.¹⁸ Una vez obtenido el máximo de eosinofilia ($\geq 4\%$) se inyectaron 0.2 ml de la suspensión de ami-

bas en el parénquima del testículo izquierdo y 0.2 ml de BFS-A en el parénquima del testículo contralateral. Las ratas testigo (eosinófilos $\geq 2\%$) se inocularon de manera idéntica. A las 5 hs de la inoculación se sacrificaron los animales, se extirparon los testículos que se fijaron en formol al 10% y se procesaron para su análisis microscópico.

Resultados

Cualitativa y cuantitativamente los testículos inyectados con *E. histolytica* mostraron el mismo tipo de lesión (i.e., edema intertubular, infiltración focal por PMN's, amibas no viables rodeadas de PMN's, eosinófilos ocasionales, áreas focales de necrosis y descamación tubular) en las ratas eosinofílicas como en las ratas normales. La inyección de BFS-A no provocó lesión testicular alguna en los animales eosinofílicos o en los normales.

Discusión

Tal como ocurre con los PMN neutrófilos, la confrontación *in vitro* de *E. histolytica* virulenta y PMN eosinófilos resulta en la destrucción de estos últimos.¹⁵ El conveniente modelo experimental de lesiones testiculares amibianas de las ratas de laboratorio y la facilidad con que se provoca eosinofilia en estos animales, nos brindó la oportunidad de estudiar *in vivo* el pobre papel que juega el eosinófilo en la amibiasis. Las lesiones testiculares producidas por la *E. histolytica* en ratas eosinofílicas y en ratas normales fueron totalmente comparables, en ambos casos pudo observarse ocasionalmente algún eosinófilo en el infiltrado inflamatorio, pero definitivamente no más en las ratas eosinofílicas que en las normales. Sin olvidar las inevitables limitaciones de sensibilidad que impone el modelo utilizado, estos resultados sugieren que el eosinófilo no interviene en forma importante ni en la génesis de las lesiones tisulares provocadas por *E. histolytica* ni, aparentemente, en la defensa contra este parásito.

Referencias

1. TSUTSUMI, V.; MARTINEZ-PALOMO, A.: *Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study.* Am. J. Pathol. 1988;130:112.
2. PEREZ-TAMAYO, R.; BRANDT, H.: *Amebiasis.* En Pathology of Protozoal and Helminthic diseases. R.A. Marcial Rojas (ed), Williams Wilkins, Baltimore, 1971. Pág. 145.

3. HARRIES, J.: *Amoebiasis: A Review*. J.R. Soc. Med., 1982;75:190.
4. PITTMAN, F.G.; PITTMAN, J.C.; EL-HASHIMI, W.K.: *Human amoebiasis: light and electron microscopic findings in colonic mucosal biopsies from patients with acute amoebic colitis*. En *Amoebiasis*. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. (eds.), Proc. Int. Conf. Amoebiasis, IMSS, México, 1976, Pág. 398.
5. JERVIS, H.R.; TAKEUCHI, A.: *Amoebic dysentery. Experimental E. histolytica infection in the germ-free guinea pig*. Am. J. Pathol. 1979;94:197.
6. LUSHBAUGH, W.B.; KAIRALLA, A.B.; HOFBAUER, A.F., Y COL.: *Sequential histopathology of cavitary liver abscess formation induced by axenically grown E. histolytica*. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1980; II (Supl. 1):163.
7. TSUTSUMI, V.; MENA-LOPEZ, R.; ANAYA VELAZQUEZ, E., Y COL.: *Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation*. Am. J. Pathol., 1984;117:81.
8. PEREZ-TAMAYO, R.; BECKER, I.; MONTFORT, I., Y COL.: *Experimental testicular necrosis induced by Entamoeba histolytica. II. Role of leucocytes and amoebic proteinases*. Parasit. Res. 1989; submitted for publication.
9. ARTIGAS, J.; OTTO, I.; KAWADA, M.E.: *Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos*. Bol. Chil. Paras., 1966; 21:114.
10. JARUMILINTA, R.; KRADOLFER, F.: *The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1964;58:385.
11. GUERRANT, R.L.; BRUSH, J.; RAVDIN, J.I., Y COL.: *Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils*. J. Infect. Dis., 1981; 194:83.
12. RAVDIN, J.I.; MURPHY, C.F.; SALATA, R.A., Y COL.: *N-Acetyl-B-galactosamine-inhibitable adherence lectin to E. histolytica. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro*. J. Infect. Dis., 1984; 151:804.
13. SALATA, R.A.; PEARSON, R.D.; RAVDIN, J.I.: *Interaction of human leukocytes and Entamoeba histolytica*. J. Clin. Inv., 1984;76:491.
14. LOPEZ-OSUNA, M.; CONTRERAS, B.A.; KRETSCHMER, R.: *In vitro interaction of PMN leukocytes and Entamoeba histolytica*. Arch. Inv. Med. (Méx.), 1986, 17 (Supl.1):247.
15. LOPEZ-OSUNA, M.; KRETSCHMER, R.: *Interaction of eosinophils and Entamoeba histolytica*. Paras. Immunol., 1989; 11: 403.
16. GRIFFIN, J.L.: *Human amoebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contracting, ingesting and digesting inflammatory cells*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1972;21:895.
17. LAYCOCK, S.M.; SMITH, H.; SPICER, B.A.: *Airway hyper-reactivity and blood, lung and airway eosinophilia in rats treated with Sephadex particles*. Int. Arch. Allergy Appl. Imm., 1986; 81:: 363.
18. PEREZ-TAMAYO, R.; BECKER, I.; MONTFORT, I., Y COL.: *Experimental testicular necrosis induced by Entamoeba histolytica. I. Description of the model*. Parasit. Res. 1989; submitted for publication.
19. DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.R.; CUNNICK, C.C.: *A new medicine for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1978;72:431.

CAPÍTULO VI

Artículo : Antigen induced eosinophilia protects gerbils (Meriones unguiculatus) against experimental amebic abscess of the liver.

Arch. Med. Res. Vol.26, Supl. En prensa.

INTRODUCCIÓN

La inducción de eosinofilia iniciada en la rata, se intentó ahora en el gerbo (Meriones unguiculatus) ya que este animal constituye un modelo estándar para el estudio del AHA experimental (Meerovitch and Chadee, 1988; Zhang, Cieslak and Stanley, 1994). Inicialmente se utilizó la misma técnica que la usada en la rata, la inoculación intravenosa de Sephadex G200. Sin embargo, abandonamos pronto este método debido a las dificultades técnicas y la mortandad causada en estos animales.

Decidimos entonces inducir eosinofilia utilizando un helminto vivo (*T. canis*) ya usado con este fin en ratones, administrado por sonda al intestino. Los resultados obtenidos fueron más que satisfactorios en cuanto a la eosinofilia (1036 ± 244 eosinófilos / mm^3 , $\bar{X} \pm \text{EE}$, grupo piloto, n=6)(datos no publicados), pero los estudios histopatológicos revelaron la presencia de larvas de *Toxocara* en microabscesos en el hígado de los animales [lo que no es extraño ya que la fase de migración larvaria del parásito incluye varios tejidos entre ellos el hígado (Tomoo, 1961)] . Por ello se decidió abandonar también este método.

Probamos a continuación antígenos estériles provenientes de homogenados de *T. canis* y *A. lumbricoides* administrados intramuscular o subcutáneamente (1 mg / 0.1 ml solución salina) en varias dosis ya que esto no induce lesiones tisulares. Aunque la eosinofilia obtenida con estos antígenos no resultó tan elevada como con el parásito vivo, sí fue lo suficientemente alta (785 ± 124 eosinófilos / mm^3 , $\bar{X} \pm \text{EE}$, grupo piloto, n=6, Fig. 1, p. 2 del artículo) para nuestros propósitos, de modo que elegimos el antígeno de *T. canis* que fue el que produjo los picos más elevados de eosinófilos que, incidentalmente, no se incrementaron cuando el antígeno se inoculaba con un adyuvante como el Titer Max. A continuación procedimos con la inoculación intraportal de 1×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* virulenta, en el día pico de eosinofilia, con el

propósito de establecer un modelo de lesión hepática discreto para así favorecer - si la hubiera - una posible intervención protectora de la eosinofilia.

Se hicieron determinaciones de IL-5 en el suero de los animales eosinofílicos y sus testigos, en los tiempos 0, 6, 24, 96 h y 45 días. También se probaron sueros de animales no manipulados para conocer los niveles normales de la IL-5 en esta especie animal.

Los gerbos eosinofílicos y normales, inoculados intraportalmente con la amiba, se estudiaron de dos maneras: una " ventana " lenta de observación temprana con sacrificio aleatorio de animales a las 6, 24 y 96 horas y una " ventana " prolongada estudiando los animales muertos espontáneamente o sacrificados a los 45 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos hasta ahora obtenidos sugieren la existencia de una fase temprana (6 y 24 h) que es similar entre los grupos de gerbos normales y eosinofílicos (Velázquez et al., 1995). El cuadro comienza a diferenciarse aparentemente a partir de las 96 h postinoculación a las que se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el número y el tamaño de los abscesos hepáticos amibianos presentes entre los gerbos eosinofílicos y los normales (Fig. 2 y 3, p. 4 del artículo). En la ventana " tardía " pudo observarse un desplazamiento significativo ($p < 0.05$) a la derecha de la curva de sobrevida actuarial en los gerbos eosinofílicos y al final de 45 días menos gerbos eosinofílicos tuvieron AHA que los animales normales (45 días, Fig.4, p. 4 del artículo).

No encontramos cambios en la IL-5 en los experimentos (Tabla 1, p. 3 del artículo). Tampoco se pudo establecer una correlación entre el grado de eosinofilia antes de la inoculación de amibas y las mismas lesiones (Tabla 1.). Para aclarar la participación de los eosinófilos en las lesiones hepáticas causadas por la amiba creemos que será necesario buscar la presencia, en mayor o menor cantidad, de las proteínas de los gránulos del eosinófilos en las biopsias de las lesiones con el fin de corroborar su intervención en el proceso.

Original Article**Antigen Induced Eosinophilia Protects Gerbils (*Meriones unguiculatus*) Against Experimental Amebic Abscess of the Liver¹**

JUAN R. VELAZQUEZ,* PATRICIA LLAGUNO,** JORGE FERNANDEZ-DIEZ,**
MARTHA PEREZ,* JORGE ARELLANO,* MARTHA LOPEZ-OSUNA,* and
ROBERTO R. KRETSCHMER*

* Unidad de Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI,
Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

** Unidad de Patología, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI,
Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

*** Departamento de Parasitología, ENCB, IPN, México, D.F.

Abstract

While the normal human eosinophil is destroyed *in vitro* by virulent *Entamoeba histolytica*, notwithstanding the presence of antibodies and complement, activated eosinophils promptly destroy the parasite even though succumbing in the process as well. To study the possible *in vivo* participation of eosinophils in invasive amebiasis, we compared the induction of experimental amebic abscess of the liver (EAAL) in gerbils (*Meriones unguiculatus*) previously made eosinophilic (532 ± 80 eosinophils/mm³) through *Toxocara canis* antigen injection and normal control gerbils (101 ± 15 eosinophils/mm³). Shortly (6 and 24 h) after intraportal injection of 10⁷ virulent *E. histolytica*, the ratio of gerbils with EAAL, as well as the number and size of the abscesses was comparable

in eosinophilic and control gerbils. At 96 h post-inoculation, the ratio of animals with EAAL was still the same in both groups, yet number and size of abscesses were significantly ($p < 0.05$) smaller in eosinophilic gerbils. The actuarial EAAL survival curve up to 45 days post-amebic inoculation was significantly ($p < 0.05$) shifted to the right in eosinophilic gerbils. No significant changes in IL-5 levels were recorded throughout these experiments. The results suggest that antigen-induced eosinophilia may exert a protective effect against EAAL in gerbils. It is speculated that a less overwhelming EAAL strategy - more akin to human amebic abscesses - may reveal this protective effect more clearly. (*Arch Med Res* 1995; 26:00)

KEY WORDS: Eosinophils; *Entamoeba histolytica*; Amebic abscess of the liver (EAAL); *Toxocara canis* antigen.

Introduction

The role of the eosinophil leucocyte in amebiasis has been largely neglected. Understandably so, since circulating and tissue eosinophilia (a typical landmark of

ectoparasitic and helminthic diseases) are absent in invasive amebiasis - as in most protozoan diseases - even though a few eosinophils are regularly found in the early stages of the inflammatory reaction to the invading (intestinal and hepatic) *E. histolytica* (1,2). However, these two alleged preconditions to consider the participation of eosinophils in a given physiopathological phenomenon have recently come under criticism, which has contributed to the return of this interesting leucocyte to the forefront of biomedical research (3). At any given time, only one tenth of the total mass of eosinophils are

Correspondence to:

Dr. Roberto Kretschmer, Unidad de Inmunología, Coordinación de Investigación Médica, CMN-IMSS, Apto. Postal 73-032, 03020 México, D.F.

¹This work was supported by grant M 9107-0384, CONACYT, México.

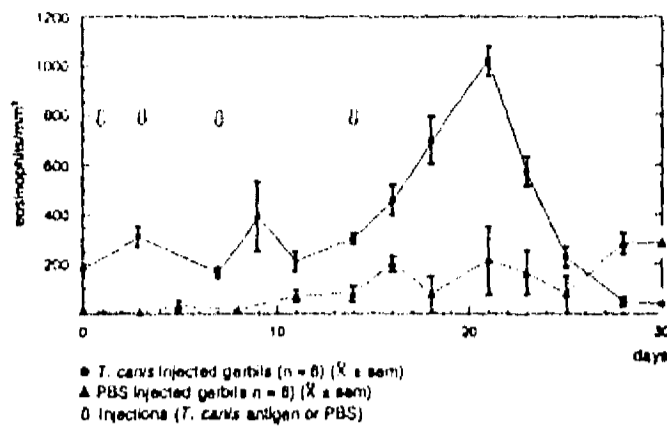


Figure 1. Eosinophilia in *T. canis* antigen injected gerbils. Circulating blood eosinophils in *T. canis* antigen (●) ($n = 6$) and PBS (▲) ($n = 6$) injected (○) gerbils over a 30-day period. Mean \pm SEM are shown. At day 21 the difference between the two groups was significant ($p < 0.02$).

in the bloodstream. On the other hand, tissue eosinophils are short lived and labile cells, so that their eventual presence can only be reliably ascertained by a search of the detritus of their specific granule proteins (i.e., MBP, EPO, ECP, EDN and CL), which is not frequently done (4). While studying the performance of phagocytic cells confronted *in vitro* with virulent *E. histolytica*, we found that normal human eosinophils - just as their neutrophilic counterparts - are swiftly destroyed by the parasite, even in the presence of antiamebic antibodies and complement (5). In contrast, activated eosinophils - like activated macrophages - promptly kill the amebas, although succumbing in the process as well. Unlike activated macrophages, however, antibodies and complement enhanced the amebolytic prowess of activated eosinophils (6).

The time and circumstances seemed thus ripe to analyze further the role of this remarkable leucocyte in invasive amebiasis, especially since the same is happening in other protozoan diseases (plasmodium, leishmania, isospora) (3,4). After some initial and unsuccessful dodging with an *in vivo* model of testicular amebic lesions in eosinophilic rats (7), we decided to evaluate a possible protective effect of antigen-induced eosinophilia against experimental amebic abscess of the liver (EAAL) in gerbils (*Meriones unguiculatus*), a presently preferred laboratory animal for amebic studies (8).

Materials and Methods

Animals. Adult, male, 60 - 80 g gerbils (*Meriones unguiculatus*) (kindly donated by Dr. G. Acosta, School of Medicine, IPN, Mexico, D.F.) kept in groups of not more than six animals per cage and fed Purina special food and water *ad libitum* were used throughout these experiments.

***Toxocara canis* Antigen.** Thirty to forty adult *Toxocara canis* worms obtained from pups undergoing deparasitization were thoroughly washed in tap water and sterile phosphate buffered saline solution, pH 7.4 (PBS) prior to homogenization using a Dounce homogenizer immersed in an ice-bath. The homogenized material was pressed through a Nr 20 wire mesh before undergoing five sonication cycles of 1 min each. This material was lyophilized and stored in aliquots at -70°C until used. At such time it was dissolved in sterile PBS at a 5 mg/ml protein concentration (9).

Induction of Eosinophilia. An eosinophilia curve was previously established in a pilot group of six gerbils receiving four intramuscular injections of 1.0 mg of *Toxocara canis* antigen, each in 0.2 ml PBS without adjuvant, at days 0, 3, 7 and 14. Eosinophilia was assessed through biweekly peripheral blood counts and expressed as absolute numbers of eosinophils/mm³. The eosinophil count rose after the fourth *T. canis* antigen injection (day 14), reaching a significant ($p < 0.02$) peak 7 days later (day 21) when compared with the control animals ($n = 6$) that received intramuscular injections of sterile PBS alone on the same dates. The eosinophil count declined steadily after day 21 in the *T. canis* antigen injected gerbils (Figure 1). No side effects were observed in the gerbils as a result of these *T. canis* antigen injections. Thus, gerbils programmed for EAAL received four intramuscular injections of 1.0 mg *T. canis* antigen in 0.2 ml PBS without adjuvant each on days 0, 3, 7 and 14, while control gerbils received only PBS injections on the same dates. Weekly blood counts monitored the rise of the eosinophil counts and confirmed the peak at about the 21st day (baseline in Table 1).

Interleukin-5 Measurement. This cytokine was measured in the gerbils' serum (0.05 ml) by an ELISA kit (Endogen Inc., Boston, MA, USA) using gerbil cross-reacting anti-murine IL-5 monoclonal antibody and following the purveyor's instructions. IL-5 levels were measured at the time of amebic inoculation (0 h, baseline) 6, 24, 96 h, and 45 days afterwards (vide infra) in both eosinophilic and control gerbils undergoing EAAL. Since gerbil IL-5 literature is void, a reference standard in non-manipulated gerbils ($n = 10$) was also established.

Amebas. Axenically (TYI-S-33) grown *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS was kindly provided by Dr. A. Ramirez, Immunochimistry Lab, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", CMN Siglo XXI, Mexico, D.F. The amebas were harvested at log-phase growth by centrifugation at 1500 rpm at 4°C for 3 min, washed twice with PBS and resuspended at a concentration of 1×10^6 amebas/ml in sterile PBS. Viability of the amebas was ascertained by trypan blue dye exclusion ($\geq 95\%$).

Table 1
Eosinophils and IL-5 in Gerbils with EAAL

		Baseline (0 h)	6 h	24 h	96 h	45 days
Controls						
	Eos ^a	101±15	—	—	59±21	103±42
	IL-5 ^b	22±1	46±13	25±0	35±14	65±6
	n	38 (5) ^c	13	8	8	9 (2) ^d
Eosinophilic						
	Eos	532±80	—	—	64±19	63±32
	IL-5 ^b	29±4	51±18	63±30	35±10	78±19
	n	38 (5) ^c	11	8	9	10 (5) ^d

Note: Circulating blood eosinophil counts and serum IL-5 levels in eosinophilic and control gerbils just before (baseline, 0 h), 6, 24, 96 h and 45 days after intraportal *E. histolytica* inoculation. IL-5 levels did not change significantly when compared to the normal range (39 ± 7 pg/ml) found in non-experimentally manipulated gerbils. Eosinophils remained stable or gradually returned to normal range over 45 days in the control and eosinophilic gerbils, respectively.

^aEosinophils/mm³ ($\bar{X} \pm$ SEM).

^bIL-5, pg/ml ($\bar{X} \pm$ SEM) (normal range in non-experimentally manipulated gerbils: 39 ± 7 pg/ml, n = 10).

^cNumber in brackets = IL-5 determination.

^dNumber in brackets = gerbils sacrificed at 45 days.

Experimental Amebic Abscess of the Liver (EAAL).

At the peak of their confirmed eosinophilia (i.e., 21 days after initiation of *T. canis* antigen injections) eosinophilic gerbils (and their controls) were anesthetized by the intramuscular injection of 10 U ketamine (Ketacolor®) (Astra, Sweden) and 0.5 mg dihydrobenzperidol (Janssen Farm., Mexico, D.F.). The animals were then operated on under strict surgical conditions. The portal vein was exposed and either 1 × 10⁷ freshly prepared amebas suspended in 0.1 ml PBS, or 0.1 ml sterile PBS alone was slowly injected through a 27 gauge needle. After careful withdrawal of the needle, gentle pressure was exerted with a Gelfoam® (Upjohn Corp., Mexico, D.F.) pad at the injection site for 5 - 10 min, and the abdominal wall closed with a 4-0 propylene suture (Ethicon Inc., NJ, USA). The wound was cleansed and sealed with Topazone® spray (Lab. Columbia, Mexico, D.F.). Surgical and immediate postoperative mortality was negligible.

Assessment of EAAL. An initial (early) observation window consisted of randomly chosen animals sacrificed, by an overdose of anesthetic, at 6, 24, and 96 h post-amebic inoculation. A second (protracted) observation window was that of actuarial survival-curves extending for 45 days after amebic inoculation, at which time the surviving animals were sacrificed as stated before. The liver lobes (3-4) were removed from spontaneously dying or from sacrificed gerbils, sliced antero-posteriorly with a razor blade to yield 3 - 4 slices that were fixed in 10% phosphate buffered formalin. The slices were embedded in paraffin and histological H & E slides were

prepared for light microscopy examination. The slides were scanned blindly by two observers and the percent of animals with abscesses (≥30 µm in diameter) was recorded. In the early schedule (6 - 96 h; sacrificed animals) the number of abscesses per liver and the average size of the abscesses (i.e., largest diameter measured with an ocular grid) were also recorded and averaged per group. Such number and size scoring was unnecessary in the protracted schedule (0 - 45 days, actuarial survival) where abscesses - when present - were always huge, firm, well contained and involving virtually the whole organ.

Statistical Analysis. Results were compared by the non-parametric Mann-Whitney U test (10).

Results

The eosinophil count in the eosinophilic gerbils just about to receive an intraportal *E. histolytica* inoculation was 532 ± 80/mm³, and was significantly (p < 0.01) higher than that found in control gerbils (101 ± 15/mm³) at 21 days after the first *T. canis* antigen or PBS injection, respectively (baseline, Table 1). Since the drawing of blood for eosinophil counts in gerbils is done under general anesthesia, and this carries some mortality risk with it when excess blood is drawn. We decided to refrain from doing regular subsequent blood counts once the gerbils had been intraportally inoculated with amebas, lest valuable experimental animals were to be lost (protracted course). However, an eosinophil count was obtained from the animals sacrificed at 96 h and at 45

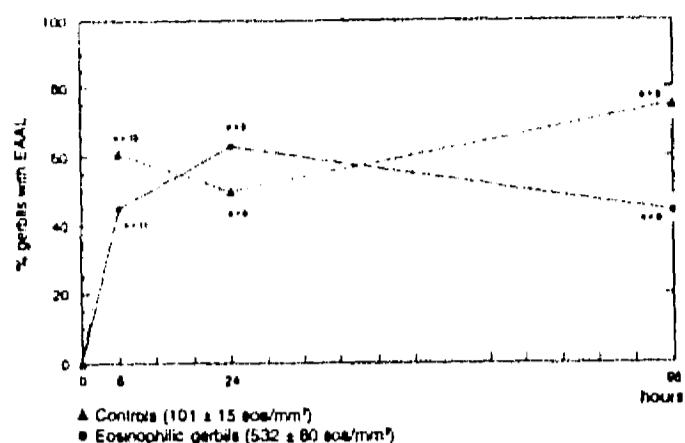


Figure 2. EAAL in eosinophilic gerbils. Percent of EAAL affected eosinophilic (●) or control (▲) gerbils sacrificed at 6, 24 and 96 h after intraportal *E. histolytica* inoculation. No significant differences between the two groups were found.

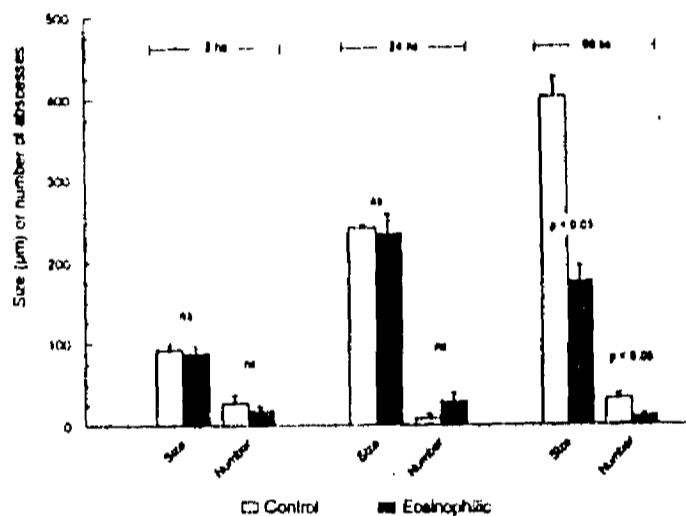


Figure 3. Size and number of EAAL in eosinophilic gerbils. The size (μm) and number of abscesses per liver found in eosinophilic (dark columns) and control (light columns) gerbils sacrificed 6, 24 and 96 h after *E. histolytica* intraportal inoculation. Only at 96 h were size and number of abscesses in the eosinophilic gerbils significantly smaller ($p < 0.05$) than in control gerbils.

days, revealing that the blood eosinophil count remained essentially stable in the control gerbils, and returned gradually to the normal range in the eosinophilic animals (Table 1). IL-5 levels, on the other hand, were measured in all the sacrificed animals. They remained essentially stable during the early observation schedule (6, 24, 96 h) and at 45 days after amebic inoculation when compared to the normal range of IL-5 (39 ± 7 pg/ml) found in normal non-experimentally manipulated gerbils ($n = 10$), which we considered to be the most stringent reference value, especially when using a monoclonal anti-murine (not antigerbil) IL-5 ELISA kit (Table 1).

There was no significant difference in the fraction (range: 45 - 63%) of eosinophilic and control animals

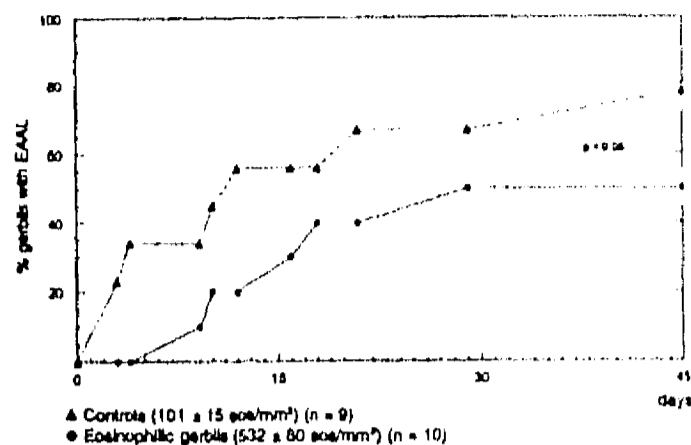


Figure 4. Actuarial survival curve of eosinophilic gerbils with EAAL. Cumulative percent of eosinophilic (●) and control (▲) gerbils dying spontaneously with EAAL within 45 days post-intraportal *E. histolytica* inoculation.

bearing evidence of EAAL at 6 and 24 h post-amebic inoculation (Figure 2), nor was there any difference in the size and number of the EAAL found (Figure 3). The fraction of gerbils with EAAL in the two groups appeared, however, to split at 96 h (i.e., 44% in eosinophilic animals vs. 75% in the control animals), yet not in a significant fashion. Nevertheless, at this observation time (96 h) the size and the number of EAAL was significantly ($p < 0.05$) smaller in the eosinophilic animals than in the control animals (Figure 3). No bona fide abscesses were found in gerbils (eosinophilic [$n = 4$] and controls [$n = 4$], not shown in Figure 3) intraportally injected with PBS alone (vide infra).

The actuarial survival curve of eosinophilic gerbils dying from EAAL up to 45 days after amebic inoculation was consistently and significantly ($p < 0.05$) below that of the control gerbils (Figure 4). The cumulative ratio of eosinophilic gerbils that had died of EAAL by 45 days post-amebic inoculation was 50% in the eosinophilic gerbils as opposed to 78% of the control gerbils ($p < 0.05$). Again, none of the animals (eosinophilic [$n = 4$] or controls [$n = 4$], not shown in Figure 4) intraportally injected with PBS alone died during this period, and when sacrificed at 45 days they were all free from any abscesses (vide infra).

The histology of the EAAL in eosinophilic and control gerbils was essentially the same (same size and number, where applicable). Up to 96 h the generous polymorphonuclear cuffs surrounding a single or a few *E. histolytica*s abounded (Figure 5). At and after 96 h, an inexorable process of necrosis with a conspicuously poor inflammatory reaction ensued. In animals allowed to die spontaneously of their EAAL, and especially in those sacrificed at 45 days post-inoculation, abscesses were still firm, very large, confluent but well contained and frequently allowing only a small rim of hepatic tissue to remain, with histiocytes but only a few lymphocytes

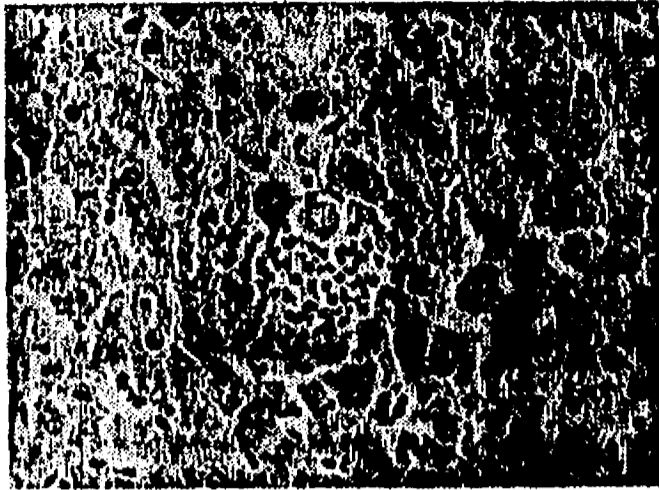


Figure 5. Leucocyte cuff (including an eosinophil [arrow]) surrounding an *E. histolytica* (E.) found in an eosinophilic gerbil sacrificed 24 h after intraportal *E. histolytica* inoculation. (Magnification x40.)

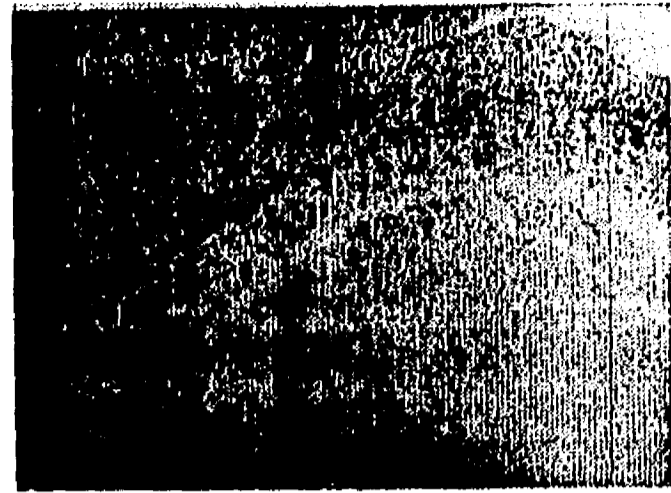


Figure 6. EAAL in a control gerbil sacrificed 45 days after *E. histolytica* inoculation. A tenous histiocyte-rich (with scant inflammation) rim separating necrotic material and the liver parenchyma can be seen (arrows). (Magnification x10.)

scattered around (Figure 6), thus averting the need to record size and number of EAAL in these animals. *E. histolytica* was frequently identified in the center of the typical early inflammatory cuffs (≤ 96 h) (Figure 5), but also occasionally in the abscess rim of the more advanced lesions.

Finally, some eosinophils were regularly found in the early (i.e., ≤ 96 h) inflammatory stages of EAAL (Figure 5), yet seldomly in the more advanced lesions. Most important, however, we were unable to document more eosinophils in the eosinophilic animals with EAAL than in the control animals with EAAL. Eosinophilic and control animals intraportally injected with PBS alone disclosed no abscesses whatsoever, yet not infrequently a certain edematous widening of the periportal spaces could be seen, sometimes with a concurrent mild inflammatory reaction probably the result of the sudden hemodynamic/mechanical assault on the liver by the intraportal injection (11). Such lesions (never accompanied by *E. histolytica* and always smaller than 30 μm in diameter), when found in animals intraportally injected with *E. histolytica* were not recorded as EAAL.

Discussion

The smaller number and size of EAAL at 96 h, and the shift to the right of the EAAL survival curves up to 45 days after intraportal injection of virulent *E. histolytica* in eosinophilic gerbils as opposed to their normal controls, may not prove, yet certainly suggest, that the eosinophil leucocyte could play a role in the defense against invading *E. histolytica*. The eosinophilia was artificially induced prior to the intraportal amebic inoculation, and by an agent (*T. canis* antigen) different from *E. histolytica*. Thus the model may not reflect what actually occurs in spontaneous human amebic abscess of the liver (AAL),

where eosinophilia (circulating and tissue) is not a landmark (5), a fact that does not rule out a possible involvement of eosinophils, however (3,4). That the protective effect of eosinophilia against EAAL was relatively weak and evident foremost at advanced (4 - 45 days), and not early stages (6 - 24 h) of the abscesses, may be due to the fact that although we used an EAAL model about half as strong as those usually employed (12), it still represents an overwhelming amebic challenge (i.e., about 80% of the control animals had evidence of EAAL at 45 days post-inoculation) when one compares it to spontaneous AAL in man where, after all, only less than 1% of the patients with intestinal invasive amebiasis will eventually develop AAL (13). Therefore, either portal invasion by *E. histolytica* is a rare (i.e., $\leq 1\%$) yet highly effective event in humans with amebic colitis, in which case man would be an extremely susceptible animal species for hepatic homing and destruction by *E. histolytica* once the parasite has reached the portal circulation; or else portal invasion by *E. histolytica* is a rather frequent (100%) event, but the parasite is more often than not prevented from homing and damaging the liver in a quiet, subclinical and unrecorded fashion. It is this latter proposition that is more likely to offer activated eosinophils a possible - yet so far unrecognized - role in the defense against tissue-invading *E. histolytica*, inasmuch as eosinophils are regular components of the early acute inflammatory reaction and are cells that possess amebolytic capabilities (6).

Not surprisingly, our study raises more questions than it answers. We do not know, for instance, what additional, non-specific effects the injection of *T. canis* antigen may have induced in gerbils. To put it in a modern way, what Th1/Th2 modulations it can induce in gerbils (14). Incidentally, significant changes in IL-5 were not recorded throughout our experiments. Furthermore, although eosinophils were regularly found in the early amebic

lesions, we failed to identify differences between eosinophilic and normal control gerbils in this respect. Nor could we establish a correlation between the degree of eosinophilia prior to amebic portal inoculation and the extent of amebic lesions (i.e., percent of animals with EAAL, number and size of lesions).

A far more expensive eosinopenia model, and passive eosinophil transfer studies would perhaps be required to help answer these and other questions. A systematic search for the remains of eosinophil granule proteins in the lesions, and an equally diligent survey of the gerbils that failed to develop amebic hepatic lesions would certainly contribute to clarify the real extent of eosinophil involvement in EAAL. For understandable, yet unjustified, reasons, amebologists have traditionally concentrated their attention to the animals with amebic lesions, bypassing those that escaped this fate in spite of identical amebic inoculation. The latter group of animals may constitute a treasure chest of information for a better understanding of the pathogenesis of AAL.

Finally, if eosinophils play a role in preventing EAAL, one would expect this to occur at the earlier stages of hepatic invasion. However, the ratio of affected animals, as well as the number and size of their abscesses, was comparable in eosinophilic and normal animals at 6 and 24 h post-amebic inoculation. Only at 96 h post-inoculation and thereafter did eosinophilic and normal controls differ, and at the end of this study (45 days post-inoculation) about 30% fewer eosinophilic animals had developed EAAL than their normal control counterparts. The essential battle responsible for this EAAL-sparing effect in eosinophilic gerbils may have occurred early and inadvertently; (i.e., initial rounds), the net effect, however, being obvious only at the final outcome. At any event, our results should contribute to stimulate additional studies to clarify further the role of activated eosinophils in invasive amebiasis.

Acknowledgment

The valuable help in the analysis of the pathological studies by Dr. Alejandra Mantilla is hereby acknow-

ledged. Our gratitude is expressed to Ms. Rosa Delgado and Ms. Berenice Ramirez for their excellent and patient secretarial help.

References

1. Butterworth AE, Thome KJ. Eosinophils and parasitic diseases. In Smith H, Cook RM, Eds. Immunopharmacology of Eosinophils. London: Academic Press, 1990:119.
2. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; 130:112.
3. Weller PF. The immunology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324:1110.
4. Gleich GJ, Glitz DG, Abu-Ghazaleh RI. Eosinophil granule proteins: structure and function. In Gleich GJ, Kay AB, Eds. Eosinophils in Allergy and Inflammation. New York: Marcel Dekker, 1994:1.
5. López-Osuna M, Kretschmer RR. Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. *Parasit Immunol* 1989; 11:403.
6. López-Osuna M, Arellano J, Kretschmer RR. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Parasit Immunol* 1992; 14:579.
7. López-Osuna M, Pérez-Tamayo R, Frenk P, Kretschmer R. *Entamoeba histolytica* and eosinophils. II. Testicular lesions produced by amebas in eosinophilic rats. *Arch Invest Med (Mex)* 1990; 21:263.
8. Meerovitch E, Chadee K. *In vivo* models for pathogenicity in amebiasis. In Ravdin JI, Ed. Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John & Sons, 1988:177.
9. Metcalf JA, Gallin JJ, Nauseef WM, Root RK. Laboratory Manual of Neutrophil Function. New York: Raven Press, 1986:10.
10. Siegel S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. London: McGraw-Hill, 1956:116.
11. Schaffer F, Popper H. Non-specific reactive hepatitis in age. *Am J Digest Dis* 1959; 4:389.
12. Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A. Morphologic characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. *Arch Med Res (Mex)* 1992; 23:203.
13. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8:228.
14. Hamblin AS. Cytokine and Cytokine Receptors. Oxford: IRL Press, Oxford University Press, 1993:1.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

La confrontación *in vitro* de cepas de *E. histolytica* con poblaciones de fagocitos (monocitos y neutrófilos) normales, - humanos y animales -, ha revelado la capacidad del parásito de destruir con gran facilidad a los leucocitos y en el caso de neutrófilos, aún estando éstos en ventaja numérica de 3000:1 (Guerrant et al. 1981). Conociendo la importancia del eosinófilo como célula efectora contra algunos helmintos, decidimos investigar si la *E. histolytica* virulenta era capaz de este mismo efecto lítico al enfrentarse a poblaciones purificadas de eosinófilos, o si por el contrario el eosinófilo lograba asumir un papel más efectivo que el resto de los leucocitos. Así demostramos que los eosinófilos humanos normales (i. e. no activados) eran destruídos por el parásito tal como sucedía con los leucocitos anteriormente estudiados (neutrófilos, monocitos no activados, linfocitos, etc.). Incluso la adición de suero fresco (complemento) y anticuerpos anti-amiba a las mezclas de leucocitos y amibas, no ayudó en la lucha de los eosinófilos contra la amiba. El parásito por su parte mantuvo su

viabilidad durante todo el tiempo de incubación (180 min). Estos resultados alinean al eosinófilo normal (i. e. no activado) con los otros leucocitos en la lista de fáciles víctimas de la amiba, al menos *in vitro*.

La amibiasis invasora (intestinal y extraintestinal) no se acompaña de eosinofilia sanguínea. Por otra parte, la importancia clave del eosinófilo en la inmunoparasitología (especialmente su papel en la lucha contra los helmintos), sugiere que su intervención efectiva en la amibiasis, si la hay, pudiera ocurrir *in vivo* en forma particularmente silenciosa y sutil. Este pensamiento lo reforzaron los estudios con macrófagos que al menos *in vitro* y en condiciones normales (i. e. no activados) no dañan a la amiba, pero que una vez activados, destruyen al parásito (Salata, Pearson and Ravdin, 1985). Esto condujo a la siguiente fase de nuestros estudios: la activación de los eosinófilos previa a su confrontación con la *E. histolytica* virulenta. Así, se activaron eosinófilos humanos con fMLP y se confirmó su activación por medio de quimioluminiscencia. Estos eosinófilos activados, al mezclarse con la *E. histolytica* virulenta en proporción de 200:1. (eosinófilos:amiba), y a semejanza con los macrófagos activados, ahora sí lisan eficazmente a la amiba. A diferencia de lo que ocurre con los macrófagos activados, sin embargo, la destrucción amibiana aumentó con la adición de anticuerpos anti-amiba y complemento. Por otra parte, y tal como ocurre con los

macrófagos activados, el eosinófilo activado también acaba sucumbiendo en el proceso.

Ya que la participación del eosinófilo en la amibiasis no había sido considerada anteriormente, resultaba de interés probar este efecto *in vivo*, por lo que nuestro siguiente paso consistió en el desarrollo de un modelo experimental en que coincidieran la eosinofilia por una parte, y por otra el desarrollo de abscesos amibianos (hepáticos o de otros tejidos). El animal más utilizado actualmente para el estudio del absceso hepático amibiano (AHA) es el gerbo (*M. unguiculatus*), entre otros motivos debido a la semejanza de las lesiones hepáticas con las del humano. Antes de considerar la realización de un modelo experimental de eosinofilia en gerbos por razones logísticas (i.e. disponibilidad económica), recurrimos a la rata con un modelo ya establecido de producción de eosinofilia (con inyección i.v. de partículas de Sephadex G200) e inducción de abscesos amibianos en los testículos. Sin embargo, como se puede ver en el artículo correspondiente (p. 87) los dos grupos de ratas - eosinofílicas y normales -, presentaron lesiones testiculares en todo comparables. Esto no sorprende teniendo en cuenta la resistencia natural de la rata a la amibiasis. Fue por eso que se decidió usar al gerbo, que como ya se señaló, es actualmente el animal experimental más apropiado para el estudio del AHA.

La estandarización del modelo de eosinofilia en gerbos tomó algún tiempo en buena medida debido al de por sí delicado manejo de estos animales. Para la inducción de eosinofilia, primero se probaron diversas dosis de huevos de *T. canis* (no fue posible hacerlo con *M. corti* por su inaccesibilidad) beneficiándonos con la asesoría del Dr. Alejandro Cruz Reyes (Investigador del Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, UNAM). La realización corrió a cargo del becado M. Becerril.

La eosinofilia producida en los gerbos con diferentes dosis de huevos de *T. canis* se logró con éxito (datos no publicados), como se describe en la Introducción del último artículo (Capítulo VI, p. 91). Sin embargo, los estudios histopatológicos mostraron la migración de las larvas del parásito al hígado, lo que obstaculizaría la observación del AHA. Por ello se decidió inducir la eosinofilia ya no con parásitos intactos, sino con antígenos, de éste y otros parásitos. Lo intentamos con antígenos de larvas y gusanos adultos de *T. canis* y *A. lumbricoides*. Al encontrar que el *T. canis* daba el mejor resultado (i. e. elevación de los eosinófilos circulantes ≥ 5 veces el valor basal, alrededor del día 21 postinoculación) decidimos usar este antígeno en los experimentos subsecuentes.

El número de trofozoitos usualmente empleado para la inducción de AHA experimental (2.5×10^5) es en realidad bastante agresivo (i. e. $\sim 100\%$ de

eficacia) por lo que optamos - para favorecer a los eosinófilos - por una dosis menor que nos permitiera obtener microabscesos desde las fases tempranas (6 h) y abscesos bien definidos a partir de las 96 h. Después de probar varias dosis (J.R. Velázquez, tesis de maestría) escogimos la de 1×10^5 como la más apropiada para lograr los propósitos enunciados.

Los resultados descritos en la p. 93 nos permiten concluir que la posibilidad de que el eosinófilo participe en la amibiasis invasora no es tan remota como pudieran sugerirlo la ausencia de eosinofilia sanguínea en esta enfermedad. Su posible participación no se hace notar durante las primeras fases del AHA experimental y no es sino hasta las 96 h que se hace patente la diferencia entre el grupo experimental y los testigos, siendo ahora mayor el número y el tamaño de los microabscesos en los gerbos normales que en los eosinofílicos. El posible efecto protector fue aún más evidente a los 45 días postinoculación, cuando los gerbos eosinofílicos presentaron menos AHA que los gerbos normales (p. 4 del último artículo). La mejoría en la sobrevida en la etapa tardía (sobrevidas actuariales hasta los 45 días) muestra que la eosinofilia puede contribuir a la atenuación o a la cancelación del AHA, al menos en este modelo experimental. Para confirmar el papel desempeñado por el eosinófilo en el curso de la amibiasis invasora - en cuyas lesiones se suelen ver pocos eosinófilos probablemente porque también sucumben en el enfrentamiento -

sería conveniente inferir su paso por los tejidos mediante la búsqueda de sus detritus, estos es el conjunto de sus proteínas tóxicas exclusivas de esta célula (MBP, ECP, EPO, EPX/EDN, CLC, etc.) en las lesiones hepáticas.

In vivo, el enfrentamiento entre el eosinófilo y la E. histolytica virulenta se hace patente sólo a partir del final de la primera etapa del proceso (96 h) y continúa en forma inexorable hasta la etapa tardía (45 días) resultando en la disminución o cancelación del AHA experimental en al menos la mitad de los animales eosinofílicos. Esto hace surgir conjeturas sobre el mecanismo que pudiera operar en este proceso. Si consideramos que en el humano los trofozoitos de la amiba llegan al hígado en números relativamente escasos habría que usar dosis de amibas mucho menores que las que hemos estado manejando hasta ahora en los animales de experimentación, para así imitar con más fidelidad las condiciones prevalecientes en los pacientes con AHA. Por otra parte habría que ver en qué momento se da la señal del reclutamiento de los eosinófilos y su migración hacia los tejidos invadidos, y en qué medida intervienen las moléculas de adhesión y las sustancias atrayentes que hacen posible finalmente su presencia en el tejido afectado. Habría que dilucidar los mecanismos precisos por los cuales se logra todo esto; ¿son, como sugerimos, las proteínas tóxicas del eosinófilo o son otros mediadores biológicos o mecanismos (i. e. apoptosis) los que intervienen en la confrontación decisiva

contra la amiba, y que permiten que finalmente se la pueda vencer? ¿Será esta circunstancia la que ocurre en la mayoría ($\geq 99\%$) de los humanos con amiba invasora intestinal, que no llegan a desarrollar enfermedad hepática?

Aún hay mucho que aprender acerca de este fascinante leucocito y su interacción con amibas virulentas. Pensamos que vale la pena proseguir su estudio ya que el papel que ha mostrado en su enfrentamiento con algunos helmintos [especialmente el *S. mansoni* (Butterfield and Leiferman, 1993)], la ha revelado como una importante célula efectora y factor crucial en la destrucción de estos parásitos e inclusive de algunos protozoarios (Leishmania, Isospora belli, Plasmodium) por lo que será de considerable valor conocer su presencia en el enfrentamiento temprano con la amiba, y los mecanismos mediante los cuales se logra esto.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
AHA	absceso hepático amibiano
CLC	cristales de Charcot-Leyden
ECF-A	factor quimiotáctico de la anafilaxis para eosinófilos
ECP	proteína catiónica eosinofílica
EDN	neurotoxina derivada del eosinófilo
EPO	peroxidasa eosinofílica
EPX	proteína X del eosinófilo
FM	fagocitos mononucleares
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos

5-HETE	ácido 5-hidroxiicosatetraenoico
IFN α	interferón alfa
IFN γ	interferón gama
IL-1	interleucina 1
IL-3	interleucina 3
IL-5	interleucina 5
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
KLH	hemocianina de la lapa de mar
LBA	lavados broncoalveolares
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LTC ₄	leucotrieno C ₄
LTD ₄	leucotrieno D ₄
LTE ₄	leucotrieno E ₄
MACS	sistema separador magnético
MBP	proteína básica principal

MN	mononucleares
OH	radical hidroxilo
PAF	factor activador de plaquetas
PHA	fitohemaglutinina
PMA	acetato de forbol miristato
PMN	polimorfonuclear
SHE	síndrome hipereosinofílico
SRS-A	substancia de reacción lenta de la anafilaxis
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
TXB ₂	tromboxano B ₂

ORTOGRAFÍA: No pocos términos en la pujante Inmunología carecen de un consenso ortográfico y ni siquiera están registrados en el Diccionario de la Real Academia Española. Su uso los irán acreditando. No es posible en algunos casos acertar con una ortografía indiscutible (i.e. jerbos o gerbos, desgranulación o degranulación, zimozán o zimosán, etc.). Cordialmente se requiere del lector un espíritu tolerante respecto a estos problemas.

REFERENCIAS

- Abraham, W. M., Perruchoud, A. P., Sielczak, M. W., Yerger, L. D. and Stevenson, J. S. 1985. Airway inflammation during antigen-induced late bronchial obstruction. *Prog. Resp. Res.* 9, 48-55.
- Aizawa, T., Tamura, G., Ohtsu, H. and Takishima, T. 1990. Eosinophil and neutrophil production of leukotriene C4 and B4: comparison of cells from asthmatic subjects and healthy donors. *Ann. Allergy* 64, 287-292.
- Alexander, R. F. and Spriggs, A. I. 1962. A method for obtaining concentrates of eosinophils from blood. *J. Clin. Pathol.* 15, 188-189.
- Allen, B. V., Kane, C. E., Powell, D. G. 1984. Leucocyte counts in the healthy English thoroughbred in training. *Equine Vet. J.* 16, 207-209.
- Anderson, C. J., Craig, S. and Bardann, E. J. 1980. Allergic broncho-pulmonary aspergillosis and bilateral fungal balls terminating in disseminated aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 140-144.
- Anderson, T. D. and Hayes, T. J. 1989. Toxicity of human recombinant interleukin-2 in rats. Pathologic changes are characterized by marked lymphocytic and eosinophilic proliferation and multisystem involvement. *Lab. Invest.* 60, 331-345.
- Aoki, I., Shindoh, Y., Nishida, T., Nakai, S., Hong, Y. M., Mio, M., Saito, T. and Tasaka, K. 1991. Comparison of the amino acid and nucleotide sequences between human and two guinea pig major basic proteins. *FEBS lett.* 282, 56-60.
- Archer, G. T. and Hirsch, J. G. 1963a. Isolation of granules from eosinophil leukocytes and study of their enzyme content. *J. Exp. Med.* 118, 277-284.
- Archer, G. T. and Hirsch, J. G. 1963b. Motion picture studies on degranulation of horse eosinophils during phagocytosis. *J. Exp. Med.* 118, 287-293.
- Archer, G. T. 1973. Eosinophilia induced by heparin-protamine complexes. *Pathology* 5, 219-227.

Archer, G. T., Robson, J. E. and Thompson, A. R. 1977. Eosinophilia and mast cells hyperplasia induced by parasite phospholipid. *Pathology* 9, 137-153.

Archer, G. T., Coulits, N., Jindra, J. and Robson, J. E. 1985. Eosinophilia, mast cell hyperplasia and antibody production in rats following intraperitoneal injection of *Ascaris* cuticle including *in vitro* studies of immune eosinophil granule lysis. *Pathology* 17, 101-107.

Artigas, J., Otto, I. y Kawada, M. E. 1966. Acción de *Entamoeba histolytica* sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. *Bol. Chil. Parasitol.* 21, 114-118.

Auriault, C., Wolowczuk, I., Damonville, M., Velge-Roussel, F., Pancre, V., Gras-Masse, H., Tartar, A. and Capron, A. 1990. T-cell antigens and epitopes in schistosomiasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 155, 3-20.

Aust-Kettis, A., Thorstensson, R. and Sunqvist, K.-G. 1981. Dynamics of the interaction between *E. histolytica* and components of the immune response. III. Fate of antibodies after binding to the cell surface. *Scand. J. Immunol.* 13, 473-481.

Aust-Kettis, A. and Sunqvist, K.-G. 1982. Activation of lymphocytes from healthy donors and patients with amebiasis by extracts of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 13 (S3), 245-248.

Bach, M. K., Brashler, J. R. and Sanders, M. E. 1990. Preparation of large numbers of highly purified normodense human eosinophils from leukapheresis. *J. Immunol. Meth.* 130, 277-281.

Bailey, M., Martin, S. C. and Lloyd, S. 1989. Immunologic and hematologic responses in ponies with experimentally induced *Strongylus vulgaris* infection. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1386-1391.

Baker, H. J., Lindsay, J. and Weisdrott, S. W. 1979. *Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Disease.* Academic Press, N. Y. App. p. 412.

Balloul, J. M., Gryzch, J. M., Pierce, R. J. and Capron, A. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138, 3448-3453.

- Barton, A. M., Washington, E. A., Stewart, A. C. and Nicholas, W. L. 1984. Mesocestoides corti in the rat: comparisons of Mesocestoides corti infections in rats and mice. *Int. J. Parasitol.* 14, 391-394.
- Basten, A., Boyer, M. H. and Beeson, P. B. 1970. Mechanism of eosinophilia. I. Factors affecting the eosinophil response of rats to Trichinella spiralis. *J. Exp. Med.* 131, 1271-1287.
- Basten, A. and Beeson, P. B. 1970. Mechanisms of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. *J. Exp. Med.* 131, 1288-1305.
- Bhandari, C. M. and Baldwa, V. S. 1976. Relative value of peripheral blood secretion and tissue eosinophilia in the diagnosis of different patterns of allergic rhinitis. *Ann. Allergy* 37, 280-284.
- Borojevic, R., C. El Cheikh, M. C. and Nicola, M. H. 1986. Schistosoma mansoni: control of extramedullar eosinophil myelopoiesis in chronically infected mice by inflammatory macrophages. *Exp. Parasitol.* 62, 349-355.
- Bourée, P., T. Nguyen Khoa, F. Bisaro. 1991. Nouvelle étiologie d'hyperéosinophilie: l'ingestion de L-tryptophane. *Feuill. Biol.* XXXII : 67-70.
- Bosse, J., Boileau, R., Begin, R., Geoffroy, M., Martel, M. and Desmarais, Y. 1987. Chronic allergic airway disease in the sheep model: functional and lung lavage features. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79, 339-344.
- Brattig, N. W., Medina-De la Garza, C. E. and Tischendorf, F. W. 1987. Comparative study of eosinophil purification on Nycodenz, Metrizamide and Percoll density gradients. *Eur. J. Haematol.* 39, 148-153.
- Brown, S. J., Galli, S. J., Gleich, G. J., and Askenase, P. W. 1982. Ablation of immunity to Amblyomma americanum by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. *J. Immunol.* 129, 790-796.
- Brown, T. R. 1898. Studies on trichinosis with especial reference to the increase of the eosinophilic cells in the blood and muscle, the origin of these cells and their diagnostic importance. *J. Exp. Med.* 3, 315-347.
- Bruijnzeel, P. L. B., Koenderman, L., Kok, P. T. M., Hameling, M. L. and Berhagen, J. 1986. Platelet-activating factor (PAF-acether) induced

leukotriene C4 formation and luminol dependent chemiluminescence by human eosinophils. *Pharmacol. Res. Commun.* 18, 61-69.

Bos, H. J., Leijendekker, W. J. and van den Eijk, A. A. 1980. *E. histolytica*: cytopathogenicity including serum effects on contact-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256, 727-729.

Bruijnzeel-Koomen, C. A. F., Van Wichen, D. F., Spry, C. J. F., Venge, P., Bruijnzeel, P. L. B. 1988. Active participation of eosinophils in patch test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 118, 229-238.

Busch, F. W., Schmidt, H. and Steinke, B. 1991. Alpha-interferon for the hypereosinophilic syndrome. *Arch. Intern. Med.* 114, 338-339.

Butterfield, J. H., Leiferman, K. M., Gonchoroff, N., Silver, J. E., Abrams, J., Bower, J. and Gleich, G. J. 1992. Elevated serum levels of interleukin-5 in patients with the syndrome of episodic angioedema and eosinophilia. *Blood* 79, 688-692.

Butterfield, J. H. and K. M. Leiferman. 1993. 9. Eosinophil-Associated Diseases. En: *Immunopharmacology of Eosinophils*, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 151-192.

Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, V., Mahmoud, A. A., Sher, A. and Rees, P. H. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256, 727-729.

Butterworth, A. E., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Mugambi, M., Ouma, J. H., Richardson, B. A., Siongok, T. K. and Sturrock, R. F. 1984. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment observations and the results of treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 108-123.

Butterworth, A. E. and Richardson, B. A. 1985. Factors affecting the levels of antibody-and complement-dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni in vitro*. *Parasite Immunol.* 7, 119-131.

Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kiamni, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Prentice, M. A., Richardson, B. A. and Siongok, T. K., Sturrock, R. F. and Taylor, D. W. 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of

resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 393-408.

Butterworth, A. E. and K. J. I. Thorne. 1993. 8. Eosinophils and Parasitic Diseases. En : *Immunopharmacology of Eosinophils*, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 119-150.

Calderón, J. and Tovar-Gallegos, R. 1980. Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 11, 241-244.

Calderón, J. and Schreiber, R. D. 1985. Activation of alternative and classical complement pathways by *E. histolytica*. *Infect. Immun.* 50, 560-565.

Camp, R. D. R., Coutts, A. A., Greaves, M. W., Kay, A. B. and Walport, M. J. 1983. Responses of human skin to intradermal injection of leukotrienes C4, D4 and B4. *Br. J. Pharmacol.* 80, 497-502.

Campbell, H. D., Sanderson, C. J., Wang, Y., Hort, Y., Martinson, M. E., Tucker, W. Q., Stellwagen, A., Strath, M. and Young, I. G. 1988. Isolation, structure and expression of cDNA and genomic clones for murine eosinophil differentiation factor. Comparison with other eosinophilopoietic lymphokines and identity with interleukin-5. *Eur. J. Biochem.* 174, 345-352.

Canon, P. 1892. Über eosinophilen Zellen und Mastzellen im Blute Gesunder und Kranker. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 10, 206.

Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126, 1764-1768.

Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M. and Torpier, G. 1982. Effector mechanisms of immunity to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 849-857.

Capron, M., Tomassini, M., Torpier, G., Kusnierz, J.-P., MacDonald, S. and Capron, A. 1989. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88, 54-58.

Carlow, C. K., Dobinson, A. R. and Bianco, A. E. 1988. Parasite-specific immune responses to *Onchocerca linealis* microfilariae in normal and immunodeficient mice. *Parasite Immunol.* 10, 309-322.

- Carmalt-Jones, D. W. 1929. Hydatid disease as a clinical problem. Some New Zealand experiences. *Br. Med. J.* 1, 5-9.
- Carme, B., Mamboueni, J. P., Copin, N. and Noireau, F. 1989. Clinical and biological study of Loa loa filariasis in Congolese. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 331-337.
- Carrington, C. B., Addington, W. W., Goff, A. M., Madoff, I. M., Marks, A., Schwaber, J. R. and Gaensler, E. A. 1969. Chronic eosinophilia pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 280, 787-798.
- Caulada-Benedetti, Z., Al-Zamel, F., Sher, A. and James, S. 1991. Comparison of Th₁- and Th₂-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated Schistosoma mansoni cercariae. *J. Immunol.* 146, 1655-1660.
- Caulfield, J. P. and Chiang, C. P. 1990. How does the schistosomula evade host defenses? *Gastroenterology* 98, 1712-1713.
- CDC Report. 1990. Eosinophilia-myalgia syndrome associated with ingestion of L-tryptophan-US, through Aug. 24, 1990. *J. Amer. Med. Assoc.* 264, 1655-1656.
- Chávez, A., Iturbe-Alessio, I., Sepúlveda, B., Segura, M. y Ortiz-Ortiz, L. 1973. Respuesta morfodinámica de los trofozoitos de E. histolytica a la acción del suero humano inmune correspondiente. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 4, S71- S78.
- Chávez, A. y Segura, M. 1974. Interacción entre los trofozoitos de E. histolytica y los leucocitos de varias especies animales. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 5, 352-382.
- Clayton, D. E. and Busse, W. W. 1981. Development of allergic bronchopulmonary aspergillosis during treatment of severe asthma with systemic corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 243-246.
- Clegg, J. A. and Smithers, S. R. 1972. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.* 2, 79-98.
- Clutterbuck, E. J. and Sanderson, C. J. 1990. The regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison on rhIL3, rhIL4, rhIL6 and GM-CSF. *Blood* 75, 1774- 1779.

- Coffman, R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J. and Rennick, D. 1989. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308-310.
- Colley, D. G. 1980. Lymphokine-related eosinophil responses. *Lymphokine Rep.* 1, 133-155.
- Connell, J. T. 1971. Asthmatic deaths. Role of the mast cell. *J. Amer. Med. Assoc.* 215, 769-776.
- Connor, D. H., George, G. H. and Gibson, D. W. 1985. Pathologic changes of human onchocerciasis: implications for future research. *Rev. Infect. Dis.* 7, 809-819.
- Cook, R. M., H. Smith and B. A. Spicer. 1993. 10. Animal Models of Eosinophilia. En: *Immunopharmacology of Eosinophils*, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 193-216.
- Councilman, W. T. and Lafleur, H. A. 1891. Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp. Rep.* 2, 395-548.
- Cromwell, O., Wardlaw, A. J., Champion, A., Moqbel, R., Osei, D. and Kay, A. B. 1990. IgG-dependent generation of platelet-activating factor by normal and low density human eosinophils. *J. Immunol.* 145, 3862-3868.
- Crosby, W. H. 1985. The hematology of hookworm disease. *Contributions of Bailey, K. and Ashford, P. R. Health Sci. J.* 4, 113-119.
- Chadee, K. and Meerovitch, E. 1984. The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*M. unguiculatus*). *Amer. J. Pathol.* 117, 71-80.
- Chadee, K., Moreau, F. and Meerovitch, E. 1987. *Entamoeba histolytica*: chemoattractant activity for gerbil neutrophils *in vivo* and *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 64, 12-16
- Chambers, W. H., Washburn, S. M., Campos, M. and Klesius, P. H. 1985. Isolation of bovine eosinophils by density gradient centrifugation. *Am J. Vet. Res.* 46, 154-156.

Chamine, D. F., Fujimura, A. Y. H. and Jamura, M. 1986. Increased levels of eosinophil-derived PAF-acether activity in a patient with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 19, 135-136.

Chernin, J. and McLaren, D. J. 1983. The pathology induced in laboratory rats by metacestodes of *Taenia crassiceps* and *Mesocestoides corti* (Cestoda). *Parasitology* 87, 279-287.

Chervenick, P. A. and Boggs, D. R. 1971. *In vitro* growth of granulocytes and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood* 37, 131-135.

Chilcote, R. R., Pergamen, E., Kretschmer, R. and Mikuta, J. C. 1982. The hypereosinophilic syndrome and lymphoblastic leukemia with extra C-group chromosome and q14+ marker. *J. Pediatrics* 101, 57-60.

Churg, J. and Strauss, L. 1951. Allergic granulomatosis, allergic angiitis and periarteritis nodosa. *Am. J. Pathol.* 27, 277-301.

Dahl, R., Venge, P. and Olsson, I. 1978. Variations of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma. *Allergy* 33, 211-218.

Dale, D. C., Hubert, R. T. and Fauci, A. 1976. Eosinophil kinetics in the hypereosinophilic syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 87, 1012-1020.

Day, R. P. 1970. Eosinophil cell separation from human peripheral blood. *Immunology* 18, 955-959.

Denis, M. and Chadee, K. 1989. Cytokine activation of murine macrophages for *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 57, 1750-1756.

Denis, M. and Ghadirian, E. 1992. Activated mouse macrophages kill *E. histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediaries. *Microbiol. Pathol.* 12, 193-198.

Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L. and Sanderson, C. J. 1990. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin-5. *J. Exp. Med.* 172, 1425-1431.

Dernouchamps, J. P., Verougstraete, C. and Demolder, E. 1990. Ocular toxocariasis: a presumed case of peripheral granuloma. *Int. Ophthalmol.* 14, 383-388.

- Dessaint, J. P. and Capron, A. 1990. Fce Receptor II-positive macrophages and platelets: potent effector cells in allergy and defense against helminth parasites. Springer Semin. Immunopathol. 12, 349-363.
- Dinarello, A. Ch. 1984. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. N. Engl. J. Med. 311, 1413-1418
- Dixon, H. B. F. and Hargreaves, W. H. 1944. Cysticercosis (*Taenia solium*). Q. J. Med. 3, 603-616.
- Douch, P. G., Harrison, G.B., Elliott, D. C., Buchanan, L. L. and Greer, K. S. 1986. Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. Vet. Parasitol. 20, 315-331.
- Douch, P. G. 1989. The effects of immunization of sheep with *Trichostrongylus colubriformis* larvae on worm burdens acquired during grazing. Int. J. Parasitol. 19, 177-181
- Dunne, D. W., Butterworth, A. E., Fulford, A. J. C., Kariuki, H. C., Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. J. and Sturrock, R. F. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. Eur. J. Immunol. 18, 123-131.
- Durham, S. R., Loegering, D. A., Dunnette, S., Gleich, G. J. and Kay, A. B. 1989. Blood eosinophils and eosinophil-derived proteins in allergic asthma. J. Allergy Clin Immunol. 84, 931-936.
- Dustin, P. and de Harven, E. 1954. Le regulation hormonale de l'eosinophile sanguine et son mecanisme. Rev. Hematol. 9, 307-340.
- Earle, B. V. 1953. Fatal bronchial asthma. A series of fifteen cases with a review of the literature. Thorax 8, 195-206.
- Eggert, F. M. and Germain, J. P. 1980. Stable acid phosphatase. I. Demonstration and distribution. Histochemistry 66, 307-317.
- Ehrlich, P. 1879a. Über die spezifischen Granulationen des Blutes. Arch. Anat. Physiol. Lpz. 3 Physiol. Abt. pp. 571-579.

- Ehrlich, P. 1879b. Beiträge zur Kenntniss der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen leukocyten. Arch. Anat. Physiol. Lpz. 3 Physiol. Abt., pp. 166-169.
- Ehrlich, P. and Lazarus, A. 1900. Histology of the blood: normal and pathological. (W. Myers, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 216.
- Ellis, A. G. 1908. The pathological anatomy of bronchial asthma. Am. J. Med. Sci. 136, 407-429.
- Ema, H., Suda, T., Nagayoshi, K., Miura, Y., Civin, C. I. and Nakauchi, H. 1990. Target cells for granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 in differentiation pathways of neutrophils and eosinophils. Blood 76, 1956-1961.
- Evengard, B. 1990. Diagnostic and clinical aspects of schistosomiasis in 182 patients treated at a Swedish ward for tropical diseases during a 10-year period. Scand. J. Infect. Dis. 22, 585-594.
- Fattah, D. I., Quint, D. J., Proudfoot, A., O'Malley, R., Zanders, E. D. and Champion, B. R. 1990. *In vitro* and *in vivo* studies with purified recombinant human interleukin 5. Cytokine 2, 112-121.
- Fauci, A. S., Harley, J. B., Roberts, W. C., Ferrans, V. J., Gralnick, H. R. and Bjornson, B. H. 1982. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical pathophysiologic, and therapeutic considerations. Ann. Intern. Med. 97, 78-92.
- Faust, E. C. 1936. Strongyloides and strongyloidiasis. Rev. Parasitol. Clin. Lab. 2, 315-341.
- Filley, W. V., Holley, K. E., Kephart, G. M. and Gleich, G. J. 1982. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. Lancet ii, 11-16.
- Fischer, T. J., Daugherty, C., Gushurst, C., Kephart, G. M. and Gleich, G. J. 1988. Systemic vasculitis associated with eosinophilia and marked degranulation of tissue eosinophils. Pediatrics 82, 69-75.
- Fivaz, B. H. 1990. Immunological responses of the rabbit host to infestation by the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* (*Acarina: Ixodidae*). Exp. Appl. Acarol. 9, 219-238.

- Flavahan, N. A., Slifman, N. R., Gleich, G. J. and Vanhoutte, P. M. 1988. Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle. Role of the epithelium. *Am. Rev. Resp. Dis.* 138, 685-688.
- Fox, B. and Seed, W. A. 1980. Chronic eosinophilic pneumonia. *Thorax* 35, 570-580.
- Frick, W. E., Sedgwick, J. B. and Busse, W. W. 1988. Hypodense eosinophils in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 119-125.
- Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., Farrow, G. M. and Gleich, G. J. 1981. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* 56, 345-353.
- Fukuda, T., Dunnette, S. L., Reed, C. E., Ackerman, S. J., Peters, M. S. and Gleich, G. J. 1985. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 132, 981-985.
- Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., Sharma, S., Chandanani, R. E., Sharma, R. R. and Mohan, C. 1979a. Isolation of antigen fraction responsible for delayed hypersensitivity in amoebiasis. *Ind. J. Med. Res.* 70, 17-21.
- Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., Sharma, S., Chandanani, R. E., Gupta, A. K., Datta, D. V. and Chhuthani, P. N. 1979b. Cellular reactions to amoebic antigen in invasive amoebiasis: A preliminary communication. *Ind. J. Med. Res.* 69, 412-416.
- Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., Gill, N. J. and Koshy, A. 1981. Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amoebic liver abscess. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 807-810.
- Garbed, S. L., O'Morchoe, P. J., and O'Morchoe, C. C. 1980. A simultaneous comparison of the cells of blood, renal hilar and thoracic duct lymph in the dog. *Anat. Rec.* 198, 255-261.
- Garside, P., Behnke, J. M. and Rose, R. A. 1989. The immune response of male DSN hamsters to a primary infection with *Ancylostoma ceylanicum*. *J. Helminthol.* 63, 251-260.
- Gärtner, I. 1980. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll). *Immunology* 40, 133-136.

- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. 1982. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 4, 219-225.
- Ghadirian, E., Meerovitch, E. and Kongshavn, P. A. L. 1983. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect. Immun.* 42, 1017-1019.
- Ghadirian, E. and Kongshavn, P. A. L. 1984. Effect of silica on resistance of mice to *E. histolytica* infection. *Infect. Immun.* 45, 399-402.
- Ghadirian, E. and Kongshavn, P. A. L. 1985. The effect of splenectomy on resistance of mice to *E. histolytica* infection. *Parasite Immunol.* 7, 479-487.
- Ghadirian, E. and Denis, M. 1992. *In vivo* activation of macrophages by IFN γ to kill *E. histolytica* trophozoites *in vitro*. *Parasite Immunol.* 14, 397-404.
- Gil-R., M. E., Cats, S., López-Osuna, M., Rosenstein, Y. J., Romo, R., Cervera, J., and Kretschmer, R. R. 1984. Increased leucocyte histamine release by *E. histolytica* antigen in patients with amebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 6, 211-222.
- Gill, H. S. and Luckins, A. G. 1987. *Hyalomma anatolicum anatolicum*: the role of humoral factors in the acquisition of host resistance. *Exp. Parasitol.* 64, 430-437.
- Gill, N. J., Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., Bhushnurmath, S. R. and Dilawari, J. B. 1982. Monocyte functions in human amoebiasis. *Ind. J. Med. Res.* 76, 674-679.
- Gleich, G. J., Loegering, D. A., and Maldonado, J. E. 1973. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* 137, 1459-1471.
- Gleich, G. J., Loegering, D. A., Kueppers, F., Bajaj, S. P. and Mann, K. G. 1974. Physicochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* 140, 313-332.
- Gleich, G. J., Loegering, D. A., Mann, K. G. and Maldonado, J. E. 1976. Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 57, 633-640.

- Gleich, G. J., Olson, G. M. and Herlich, H. 1979. The effect of antiserum to eosinophils and susceptibility and acquired immunity of the guinea-pig to Trichostrongylus colubriformis. *Immunology* 37, 873-880.
- Gleich, G. J., Schroeter, A. L., Marcoux, J. P., Sachs, M. I., O'Connell, E. J. and Kohler, P. F. 1984. Episodic angioedema associated with eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* 310, 1621-1626.
- Gleich, G. J. and Adolphson, C. R. 1986. The eosinophil leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* 39, 177-253.
- Glynn, A. A. and Michaels, L. 1990. Bronchial biopsy in chronic bronchitis and asthma. *Thorax* 15, 142-153.
- Goetzi, E. J., Wasserman, S. I. and Austen, K. F. 1975. Eosinophil polymorphonuclear leukocyte function in immediate hypersensitivity. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 99, 1-4.
- Goetzi, E. J. and Austen, K. F. 1977. Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A): cellular origin, structure and function. *Monogr. Allergy* 12, 189-197.
- Golan, D. E., Brown, C. S., Cianci, C. M., Furlong, S. T. and Caulfield, J. P. 1986. Schistosomula of Schistosoma mansoni use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilize red cell membrane components. *J. Cell Biol.* 103, 819-828.
- Gollasch, Dr. 1889. Zur Kenntniss der asthmatischen sputums. *Fortschr. Med. (Berlin)* 7, 361-365.
- Gosset, P., Prin, L., Capron, M., Auriault, C., Tonnel, A.-B. and Capron, A. 1986. Presence of factors chemotactic for granulocytes in hypereosinophilic syndrome sera: relation with alterations in eosinophil migration. *Clin. Exp. Immunol.* 65, 654-663.
- Goudot-Crozel, V., Caillol, D., Djabali, M. and Dessen, A. J. 1989. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kD glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J. Exp. Med.* 170, 2065-2080.
- Gough, J. 1961. Postmortem differences in "asthma" and in chronic bronchitis. *Acta Allergol.* 16, 391-399.

- Grantham, J. G., Meadows, J. A. and Gleich, G. J. 1986. Chronic eosinophilic pneumonia. Evidence for eosinophil degranulation and release of major basic protein. *Am. J. Med.* 80, 89-94.
- Green, S. J. and Nacy, C. A. 1994. L-arginine-derived nitric oxide is an antimicrobial effector molecule. *Amer. Soc. Microbiol. News* 60, 83-86.
- Greenberger, P. A. 1984. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 645-653.
- Greenberger, P. A. and Patterson, R. 1988. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. [Editorial] *J. Allergy Clin. Immunol.* 81, 646-650.
- Greene, B. M. and Colley, D. G. 1976. Eosinophils and immune mechanisms. III. Production of the lymphokine eosinophil stimulation promoter by mouse T lymphocytes. *J. Immunol.* 116, 1078-1083
- Griffin, J. L. 1972. Human amebic dysentery. Electron microscopy of *E. histolytica* contacting, ingesting and digesting inflammatory cells. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 21, 895-906.
- Grimaldi, M. C., D Ippolito, S., Pica, A. and Della Corte, F. 1983. Cytochemical identification of the leukocytes of torpedoes (*Torpedo marmorata Risso* and *Torpedo ocellata Rafinisque*). *Basic Appl. Histochem.* 27, 311-317.
- Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129, 2739-2743.
- Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J. I. Sullivan, J. A. and Mandell, G. L. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* 143, 83-93.
- Guerrero, M., Ríos, D. and Landa, L. 1976. Interaction between trophozoites of *E. histolytica* and lymphocytes of patients with invasive disease. En: Proc. Int. Conf. Amebiasis, (B. Sepúlveda, L. S. Diamond, eds.). IMSS, México, D. F., MEXICO, pp. 529-539.
- Gundel, R. H., Gerritsen, M. E. and Wegner, C. D. 1989. Antigen coated Sepharose beads induce airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in *Cynomologus* monkeys. *Am. Rev. Resp. Dis.* 140, 629-633.

- Gundel, R. H., Gerritsen, M. E., Gleich, G. J. and Wegner, C. D. 1990. Repeated antigen inhalations results in a prolonged airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Appl. Physiol.* 68, 779-786.
- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. and Greenwood, B. M. 1985. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.* 7, 625-632.
- Hajos, K. 1928. Beitrage zue Eosinophilie-Frage II. Mitteilung Die Verteilung der eosinophilen Zellen nach Protein-injektionen und im anaphylaktisierten Meerschweinchen. *Z. Ges. Exp. Med.* 48, 383-388.
- Halwig, J. M., Greenberger, P. A. and Patterson, R. 1984. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol. Allergy Pract.* VI, 292-301.
- Hamadto, H. A., Kamal, K. A., Shaheen, H. and Zakaria, M. S. 1990. Total leucocyte count, eosinophilia and cellular immune response in schistosomiasis pre and post praziquantel therapy. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 20, 667-672.
- Hamann, K. J., Ten, R. M., Loegering, D. A., Jenkins, R. B., Heise, M. T., Schad, C. R., Pease, L. R., Gleich, G. J. and Barjer, R. L. 1990. Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics* 7, 535-546.
- Hansel, T. T., Pound, J. D., Pilling, D., Kitas, G. D., Salmon, M., Gentle, T. A., Lee, S. S. and Thompson, R. A. 1989. Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J. Immunol. Meth.* 122, 97-103.
- Hansel, T. T., de Vries, I. J. M., Iff, T., Rihs, S., Wandzilak, M., Betz, S., Blaser, K. and Walker, C. 1991. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Meth.* 145, 105-110.
- Hansel, T. T. and Ch. Walker. 1993. 11. Experimental techniques with human eosinophils. En: *Immunopharmacology of Eosinophils*, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 218-235.
- Hardy, W. R. and Anderson, R. E. 1968. The hypereosinophilic syndromes. *Ann. Intern. Med.* 68, 1220-1229.

- Harrell, L. W. and Deardorff, T. L. 1990. Human nanophyctiasis: transmission by handling naturally infected coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Infect. Dis. 161, 146-148.
- Harries, A. D., Fryatt, R., Walker, J., Chiodini, P. L. and Bryceson, A. D. 1986. Schistosomiasis in expatriates returning to Britain from the tropics: a controlled study. Lancet i, 86-88.
- Harries, J. 1982. Amoebiasis: a review. J. Roy. Soc. Med. 75, 190-197.
- Harris, W. G. and Bray, R. S. 1976. Cellular sensitivity in amoebiasis: Preliminary results of lymphocyte transformation in response to specific antigen and to mitogen in carrier and disease states. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 340-343
- Henderson, W. R., Harley, J. B., Fauci, A. S. and Chi, E. Y. 1988. Hyper-eosinophilic syndrome human eosinophil degranulation induced by soluble and particulate stimuli. Br. J. Haematol. 69, 13-21.
- Hinson, K. F. W., Moon, A. J. and Plummer, N. S. 1952. Bronchopulmonary aspergillosis. A review and a report of eight new cases. Thorax 7, 317-333.
- Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Korenaga, M., Mita, S., Tominaga, A. and Takatsu, K. 1991. *In vivo* administration of antibody to murine IL-5 receptor inhibits eosinophilia of IL-5 transgenic mice. Int. Immunol. 3, 135-139.
- Hodges, M. K., Weller, P. F., Gerard, N. P., Ackerman, S. J. and Drazen, J. M. 1988. Heterogeneity of leukotriene C4 production by eosinophils from asthmatic and from normal subjects. Am. Rev. Resp. Dis. 129, 207-208.
- Hogg, J. C. and Eggleston, P. A. 1984. Is asthma an epithelial disease? Am. Rev. Resp. Dis. 138, 207-208.
- Hökansson, L., Carlson, M., Stalenheim, G. and Venge, P. 1990. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 85, 743-750.
- Horobin, R. W. and Walter, K. J. 1987. Understanding Romanowsky staining. I: The Romanowsky-Giemsa effect in blood smears. Histochemistry 86, 331-336.

- Hsu, S. Y. L., Hsu, H. F., Penick, G. D., Hanson, H. O., Schiller, H. J. and Cheng, H. F. 1975. Mechanism of immunity of schistosomiasis: histopathologic study of lesions elicited in rhesus monkeys during immunizations and challenge with cercariae of Schistosoma japonicum. J. Reticuloendothel. Soc. 18, 167-185.
- Huber, H. L. and Koessler, K. K. 1922. The pathology of bronchial asthma. Arch. Intern. Med. 30, 689-760.
- Huldt, G., Davies, P., Allison, A. C. and Schorlemmer, H. U. 1979. Interactions between E. histolytica and complement. Nature 277, 214-216.
- Hyder, S. L., Cayer, M. L. and Pettey, C. L. 1983. Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. Tissue Cell 15, 437-455.
- Iscoe, N. N., Senn, J. S., Till, J. E. and McCulloch, E. A. 1971. Colony formation by normal and leukemia human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. Blood 37, 1-5.
- Ishizeki, K., Nawa, T., Tachibana, T., Sakakura, Y. and Lida, S. 1984. Hemopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach, Misgurnus anguillicaudatus. Cell Tissue Res. 235, 419-426
- James, S. L. and Sher, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 155, 21-35
- James, S. L. and Nacy, C. 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites. Curr. Opin Immunol. 5, 518-523.
- Jarumilinta, R. and Kradolfer, F. 1964. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58, 375-381.
- Johnson, G. R., Nicholas, W. L., Metcalf, S., McKenzie, I. F. and Mitchell, G. F. 1979. Peritoneal cell population of mice infected with Mesocostoides corti as a source of eosinophils. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 59, 315-322.
- Jones, W. T. 1846. The blood-corpuscle considered in its different phases of development in the animal series. Memoir I Vertebrata. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 136, 63-87.

- Kanner, R. E. and Hammar, S. P. 1977. Chronic eosinophilic pneumonia. Ultrastructural evidence of marked immunoglobulin production plus macrophagic ingestion of eosinophils and eosinophilic lysosomes, leading to intracytoplasmic Charcot-Leyden crystals. *Chest* 71, 95-98.
- Kano, S., Kasuya, S. and Ohtomo, H. 1989. Eosinophilia in mouse regulated by multiple factors following repeated stimulations with *Ascaris* eggs into the peritoneal cavity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89, 54-59.
- Kapp, A., Czech, W., Krutmann, J. and Schöpf, E. 1991. Eosinophil cationic protein in sera of patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24, 555-558.
- Kassuku, A., Christensen, N. O., Nansen, P. and Monrad, J. 1986. Clinical pathology of *Schistosoma bovis* infection in goats. *Res. Vet. Sci.* 40, 44-47.
- Katzen, D. R., Leiferman, K. M., Weller, P. F. and Leung, D. Y. 1986. Hypereosinophilia and recurrent angioneurotic edema in a 2½-year-old. *Am. J. Dis. Child.* 140, 60-64.
- Kay, A. B., Stechschulte, D. J. and Austen, K. F. 1971. An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J. Exp. Med.* 133, 602-619.
- Kay, A. B. 1990. 4. Eosinophil chemotactic factors in asthma and allergy. En: *Eosinophils, Allergy and Asthma*. A. B. Kay, ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 31.
- Kelenyi, G. and Nemeth, A. 1969. Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leucocytes of vertebrates. 1. A study of avian, reptile, amphibian and fish leucocytes. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 20, 405-422.
- Kiezerbaum, F., Villalta, F. and Tai, P. C. 1986. Role of inflammatory cells in Chagas' Disease. III. Kinetics of human eosinophil activation upon interaction with parasites (*Trypanosoma cruzi*). *J. Immunol.* 136, 662-666.
- Kimani, G., Tonnesen, M. G. and Henson, P. M. 1988. Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells *in vitro* by platelet-activating factor. *J. Immunol.* 140, 3161-3166.
- Klebanoff, S. J., Agosti, J. M., Jorg, A. and Waltersdorff, A. M. 1989. Comparative toxicity of the horse eosinophil peroxidase-H₂O₂ system and granule basic proteins. *J. Immunol.* 143, 239-244.

- Klementsson, H., Andersson, M. Baumgarten, C. R., Venge, P. and Pipkorn, U. 1990. Changes in non-specific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin. Exp. Allergy* 20, 539-547.
- Kloprogge, E., deLeeuw, A. J., deMonchy, J. G. R. and Kauffman, H. F. 1989. Hypodense eosinophilic granulocytes in normal individuals and patients with asthma: Generation of hypodense cell population *in vitro*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83, 393-400.
- Knight, R. 1977. An *in vitro* model for measuring the cytopathic effect of *E. histolytica*. *J. Parasitol.* 63: 388-389.
- Koenderman, L., Kok, P. T. M., Hamelink, M. L., Verhoeven, A. J. and Bruijnzeel, P. L. B. 1988. An improved method for the isolation of eosinophilic granulocytes from peripheral blood of normal individuals. *J. Leuk. Biol.* 44, 79-86.
- Kohi, F., Miyagawa, H., Argawal, D. K., Bewtra, A. K. and Townley, R. G. 1990. Generation of leukotriene B4 and C4 from granulocytes of normal controls, allergic rhinitis, and asthmatic subjects. *Ann. Allergy* 65, 228-232.
- Korenaga, M., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Sato, Y., Takatsu, K. and Tada, I. 1991. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 72, 502-507.
- Kretschmer, R. R., Sepúlveda, B., Almazán, A. and Gamboa, F. 1972. Intradermal reactions to an antigen (histolyticin) obtained from axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Trop. Geogr. Med.* 24, 275-281.
- Kretschmer, R. R. 1986. Immunology of amebiasis. En: Amebiasis. (A. Martínez-Palomo, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 96-197.
- Kretschmer, R. R. and López-Osuna, M. 1990. Effector mechanisms and immunity to amebas. En: Amebiasis: Infection and disease by *E. histolytica*, R. R. Kretschmer, ed., CRC Press, Boca Raton, FL., pp 105-122.
- Kretschmer, R. R. 1993. Immunology of Amoebiasis and Giardiasis. En: Clinical Aspects of Immunology, (P. J. Lackmann, K. Peters, F. S. Rosen and M. J. Walport, eds.), 5th ed., Blackwell Scientific Publ. Oxford, pp. 1613-1626.

- Kretschmer, R. R. y López-Osuna, M. 1994. Cap. 9. Mecanismos efectores e inmunidad antiamebiana. En: Amibiasis. Infección y Enfermedad por Entamoeba histolytica. Kretschmer, R. R. ed., Trillas, México, pp. 135-154.
- Lacour, J.-P., C. Perrin, I. Bodoktt and J.-P. Prtonne. 1990. Lettres. Syndrome myalgies-hyperéosinophilie après prise de L-tryptophane. La Presse Med. 18: 1326-1327.
- Lammas, D. A., Mitchell, L. A. and Wakelin, D. 1989. Genetic control of eosinophilia. Analysis of production and response to eosinophil differentiation factor in strains of mice infected with Trichinella spiralis. Clin. Exp. Immunol. 77, 137-143.
- Lammas, D. A., Mitchell, L. A. and Wakelin, D. 1990. Genetic influences upon eosinophilia and resistance in mice infected with Mesocostoides corti. Parasitology 101, 291-299.
- Landa, L., Capin, R. y Guerrero, M. 1976. Estudios sobre inmunidad celular en la amibiasis invasora. En: Proc. Int. Conf. Amebiasis, (B. Sepúlveda and L.S. Diamond, eds.), IMSS, México, D. F., MEXICO, pp. 661-666.
- Lanham, J. G., Elkan, K. B., Pusey, C. D. and Hughes, G. R. 1984. Systemic vasculitis with asthma and eosinophilia: A clinical approach to the Churg-Strauss syndrome. Medicine 63, 65-81.
- Latif, A. A., Maina, J. N., Dhadialla, T. S. and Nokoe, S. 1990. Histological reactions to bites of Amblyomma variagatum and Rhipicephalus appendiculatus (Acari: Ixodidae) fed simultaneously on naive or sensitized rabbits. J. Med. Entomol. 27, 316-323
- Laufer, P., Fink, J. N., Bruns, W. T., Unger, F. G., Kalbfleisch, J. H., Greenberger, P. A. and Patterson, R. 1984. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. J. Allergy Clin. Immunol. 74, 44-47.
- Laycock, S. M., Smith, H. and Spicer, B. A. 1986. Airway hyperreactivity and blood, lung and airway eosinophilia in rats treated with Sephadex particles. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 81, 363-367.
- Leiferman, K. M., Peters, M. S. and Gleich, G. J. 1986. The eosinophil and cutaneous edema. J. Am. Acad. Dermatol. 15, 513-517.

- Leiferman, K. M. 1991. A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 15, 1101-1112.
- Letonja, T. and Hammerberg, C. 1987. *Taenia taeniaeformis*: early inflammatory response around developing metacestodes in the liver of resistant and susceptible mice. II. Histochemistry and Cytochemistry. *J. Parasitol.* 73, 971-979.
- Lin, J. Y. and Chadee, K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148, 3999-4005.
- Lin, J. Y., Keller, K. and Chadee, K. 1993. *Entamoeba histolytica* proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages. *Immunology* 78, 291-297.
- Linder, A., Venge, P. and Denschl, H. 1987. Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as markers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* 42, 583-590.
- Lindor, L. J., Loegering, D. A., Wassom, D. L. and Gleich, G. J. 1981. Recovery of eosinophils from the peritoneal cavity of the guinea pig. *J. Immunol. Meth.* 41, 125-134.
- Linthicum, D. S. 1975. Ultrastructure of Hagfish blood leukocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 64, 241-250.
- López-Osuna, M., Contreras, B. A. and Kretschmer, R. 1986. *In vitro* interaction of polymorphonuclear leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 17 (S1), 247-249.
- López-Osuna, M. and Kretschmer, R. R. 1989. Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.* 11, 403-411.
- López-Osuna, M., Pérez-Tamayo, R., Frenk, P. and Kretschmer, R. 1990. *Entamoeba histolytica* and eosinophils. II. Testicular lesions produced by amebas in eosinophilic rats. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 21 (S1), 263-265.
- López-Osuna, M., Arellano, J. and Kretschmer, R. R. 1992. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Parasite Immunol.* 14, 579-586.

- López-Osuna, M. 1995. The role of Leucocytes in the control of *E. histolytica* infection. En: Amoebiasis and Giardiasis, N.L. Pal, ed., Advances of Parasitology. Enviado a publicación.
- Mahmoud, A. A. F., Kellermeyer, R. W. and Warren, K. S. 1974. Production of monospecific rabbit anti-human eosinophil serum and demonstration of a blocking phenomenon. N. Engl. J. Med. 290, 417-420.
- Mahmoud, A. A. F., Kellermeyer, R. W. and Warren, K. S. 1977. Monospecific antigranulocyte sera against human neutrophils, eosinophils, basophils and myeloblasts. Lancet ii, 1163-1166.
- Malmberg, H. and Holopainen, E. 1979. Nasal smear as a screening test for immediate-type nasal allergy. Allergy 34, 331-337.
- Marom, Z. V. I., Shelhamer, J. H., Bach, M. K., Morton, D. R. and Kaliner, M. 1982. Slow reacting substances, leukotriene C₄ and D₄, increase the release of mucus from human airways *in vitro*. Am. Rev. Resp. Dis. 126, 449-451.
- Marshall, G. M. and White, L. 1989. Effective therapy for a severe case of the idiopathic hypereosinophilic syndrome. Am. J. Pediatr. Hematol./Oncol. 11, 178-183.
- Marshall, T., Shult, P. and Busse, W. W. 1988. Release of lysosomal enzyme beta-glucuronidase from isolated human eosinophils. J. Allergy Clin. Immunol. 82, 550-555.
- Masuyama, K., Samejima, Y. and Ishihawa, T. 1988. Eosinophils in nasal secretion. Acta Otolaryngol. (Stockholm.) Suppl. 458, 181-189.
- Mateo, M. R., Roberts, E. D. and Enright, F. M. 1984. Morphologic, cytochemical, and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). Am. J. Vet. Res. 45, 1046-1053.
- Maxwell, M. H. 1978. The fine structure of granules in eosinophil leucocytes from aquatic and terrestrial birds. Tissue Cell 10, 303-317.
- Maxwell, M. H. 1979. The ultrastructure of eosinophil granules of the black-necked crowned crane. J. Anat. 128, 53-63.

- McCaul, T. F., Poston, R. N. and Bird, R. G. 1977. *E. histolytica* and *E. invadens*: chromium release from labeled human liver cells in culture. *Exp. Parasitol.* 43:342-352.
- McCoy, J. J., Mann, B. J. and Petri, W. A. Jr. 1994. Minireview. Adherence and cytotoxicity of *E. histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect. Immun.* 62, 3045-3050.
- McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A. B. 1981. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite Immunol.* 3, 359-373.
- McLaren, D. J., Peterson, C. G. and Venge, P. 1984. *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins *in vitro*. *Parasitology* 88, 491-503.
- Meerovitch, E. and Chadee, K. 1988. 11. *In vivo* models for pathogenicity in Amebiasis. En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. (J. I. Ravdin, ed.), John Wiley and Sons, N. Y., pp. 177-190.
- Meeusen, E., Gorrell, M. D., Rickard, M. D. and Brandon, M. R. 1989. Lymphocyte subpopulations of sheep in protective immunity to *Taenia hydatigena*. *Paras. Immunol.* 11, 169-181.
- Meseguer, J., Lozano, M. T. and Agulleiro, B. 1985. Ultrastructure of the renal granulopoietic tissue of the *Rana ridibunda* tadpole. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 391-401.
- Metcalf, D., Parker, J. W., Chester, H. M. and Kincade, P. W. 1974. Formation of eosinophilic-like granulocytic colonies by mouse bone marrow cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.* 84, 275-290.
- Metcalf, D., Cutler, R. L. and Nicola, N. A. 1983. Selective stimulation by mouse spleen conditioned medium of human eosinophil colony formation. *Blood* 61, 999-1005.
- Metcalf, J. A., Gallin, J. I., Nauseef, W. M., Root, R. K. 1986. Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press, N.Y. pp. 10-11.
- Milbourne, E. A. and Howell, M. J. 1990. Eosinophil responses to *Fasciola hepatica* in rodents. *Int. J. Parasitol.* 20, 705-708.

Miller, F., de Harven, E. and Palade, G. E. 1966. The structure of eosinophil leukocyte granules in rodents and man. *J. Cell Biol.* 31, 349-362.

Mitchell, G. F. 1979. Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. *Adv. Immunol.* 28, 451-511.

Miyasato, M., Iryo, K., Kasada, M. and Tsuda, S. 1988. Varied density of eosinophils in patients with atopic dermatitis reflecting treatment with antiallergic drug. *J. Invest. Dermatol.* 90, 589 (Abstr).

Modigliani, R., Muschart, J.-M., Galian, A., Clauvel, J.-P. and Piel-Desruisseaux, J.-L. 1981. Allergic granulomatous vasculitis (Churg-Strauss syndrome). Report of a case with widespread digestive involvement. *Dig. Dis. Sci.* 26, 264-270.

Moneret-Vautrin, D. A., Hsieh, V., Wayoff, M., Gruyot, J. L., Monton, C. and Maria, Y. 1990. Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome a precursor of the triad: nasal polyposis, intrinsic asthma, and intolerance to aspirin. *Ann. Allergy* 64, 513-515.

Moqbel, R., MacDonald, A. J., Cromwell, O. and Kay, A. B. 1990. Release of leukotriene C₄ (LTC₄) from human eosinophils following adherence to IgE- and IgG-coated schistosomula of *S. mansoni*. *Immunology* 69, 435-442.

Murray, A. B. 1970. Nasal secretion eosinophilia in children with allergic rhinitis. *Ann. Allergy* 25, 142-148.

Murray, A. B. 1971. Nasal secretion eosinophilia in children with grass pollen hay fever. *Can. Med. Assoc. J.* 104, 599-600.

Murray, H. W., Aley, S. B. and Scott, W. A. 1981. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 381-391.

Nadel, J. A. 1983. Bronchial reactivity. *Adv. Intern. Med.* 28, 207-223.

Neusser, E. 1892. Klinisch-haematologische mittheilungen. *Wien Klin. Wochenschr.* 5, 41-46 y 64-68.

Nolan, C. R., Anger, M. S. and Kelleher, S. P. 1986. Eosinophiluria- a new method of detection and definition of the clinical spectrum. *N. Engl. J. Med.* 315, 1516-1519.

Oda, M., Satouchi, K., Ikeda, I., Sakakura, M., Yasunaga, K. and Saito, K. 1990. The presence of platelet-activating factor associated with eosinophil and/or neutrophil accumulations in the pleural fluids. *Am. Rev. Resp. Dis.* 141, 1469-1473.

Ogilvie, B. M., Askenase, P. W. and Rose, M. E. 1980. Basophils and eosinophils in three strains of rats and in athymic (nude) rats following infection with the nematodes *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*. *Immunology* 39, 385-389.

Ogushi, F., Ozaki, T., Kawano, T. and Yasuoka, S. 1987. PGE₂ and PGF_{2α} content in bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients with eosinophilic pneumonia. *Chest* 91, 204-206.

Olivieri, D., Pesci, A. and Bertorelli, G. 1990. Eosinophilic alveolitis in immunologic interstitial lung disorders. *Lung (Suppl.)* 168, 964-973.

Olsson, I. and Venge, P. 1972. Cationic proteins of human granulocytes. 1. Isolation of the cationic proteins from the granules of leukaemic myeloid cells. *Scand. J. Haematol.* 9, 204-214.

Olsson, I., Venge, P., Spitznagel, J. K. and Lehrer, R. 1977. Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules. Comparison of the constituents of eosinophilic and neutrophilic leukocytes. *Lab. Invest.* 36, 493-500.

Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., and Capin, N. R. 1975. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 127-134.

Otto, G. F. 1935. Blood studies on *Trichuris* infested and worm free children in Louisiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 693-704.

Owen, W. F., Rothenberg, M. E., Peterson, J., Weller, P. F., Silben, D., Sheffer, A. L., Stevens, R. L., Soberman, R. J. and Austen K. F. 1989. Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J. Exp. Med.* 170, 343-348.

Parrillo, J. E. and Fauci, A. S. 1978. Human eosinophils: purification and cytotoxic capability of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome. *Blood* 51, 457-473.

- Parwaresch, M. R., Walle, A. J. and Arndt, D. 1976. The peripheral kinetics of human radiolabelled eosinophils. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 21, 57-66.
- Patterson, R., Greenberger, P. A., Radin, R. C. and Roberts, M. 1982. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann. Intern. Med.* 96, 286-291.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A. 1991. Downregulation of Th₁ cytokine production accompanies induction of Th₂ responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.
- Perez, G. L., Peters, M. S., Reda, A. M., Butterfield, J. H. and Leiferman, K. M. 1990. Mast cells, neutrophils and eosinophils in prurigo nodularis. *J. Invest. Dermatol.* 94, 565 (Abstr).
- Pérez-Tamayo, R. and Brandt, H. 1971. Amebiasis . En: *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*, (R. A. Marcial-Rojas, ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 145-188.
- Pérez-Tamayo, R. 1986. Pathology of Amebiasis. En: *Amebiasis*, (A. Martínez-Palomo, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 45-94.
- Pérez-Tamayo, R., Becker, I., Montfort, I. and Pérez-Montfort, R. 1990. Pathobiology of amebiasis. En: *Amebiasis. Infection and Disease by Entamoeba histolytica*, (R. R. Kretschmer, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fl., pp. 123-157.
- Pérez-Tamayo, R., Becker, I., Montfort, I., Ostoa-Saloma, P. and Pérez-Montfort, R. 1991. Role of leucocyte and amebic proteinases in experimental rat testicular necrosis produced by *E. histolytica*. *Parasitol. Res.* 77, 192-196.
- Peters, M. S., Schroeter, A. L. and Gleich, G. J. 1983. Immunofluorescence identification of eosinophil granule major basic protein in the flame figures of Wells' syndrome. *Br. J. Dermatol.* 109, 141-148.
- Pincus, S. H., Butterworth, A. E., David, J. R., Robbins, M. and Vadas, M. A. 1981. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula of *S. mansoni*: lack of requirement for oxidative metabolism. *J. Immunol.* 126, 1794-1799.

Pittman, F. E., El-Hashimi, W. K. and Pittman, J. C. 1973. Studies of human amebiasis. II. Light and electron-microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. *Gastroenterology* 65, 588-603.

Pittman, F. E., Pittman, J. C. and El-Hashimi, W. K. 1976. Human amebiasis: light and electron microscopic findings in colonic mucosal biopsies from patients with acute amebic colitis. En: Proc. Int. Conference Amebiasis, eds. B. Sepúlveda and L. S. Diamond, IMSS, MEXICO, p.398.

Prathap, K. and Gilman, R. 1970. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. *Amer. J. Pathol.* 60, 229-239.

Prin, L., Capron, M., Gosset, P., Wallaert, B., Kusnierz, J. P., Bletry, O., Tonnel, A. B. and Capron, A. 1986. Eosinophilic lung disease: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 63, 249-257.

Quinones, G.-E., Simon, G. T. and Kay, J. M. 1986. Electron microscopy of chronic eosinophilic pneumonia. *Clin. Invest. Med.* 9, 238-243.

Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Salata, R. A., Guerrant, R. L. and Hewlett, E. L. 1985. N-acetyl- β -galactosamine-inhibitable adherence lectin to *E. histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 151, 804-815.

Ravdin, J. I. 1986. Pathogenesis of diseases caused by *E. histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8, 247-260.

Reed, S. L., Curd, G. J., Gigli, I., Gillin, F. D. and Braude, A. I. 1986. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *E. histolytica*. *J. Immunol.* 136, 2265-2270.

Reed, S. L. and Braude, A. I. 1988. 33. Extraintestinal disease: clinical syndromes, diagnostic profile, and therapy. En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. Ed. J. I. Ravdin, J. Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 511-532.

Reinbach, G. 1893. Über dan Verhalten der Leukocyten bei malignen tumoren. *Arch. Klin. Chir.* 46, 486-562.

- Riedlinger, J., Grecis, R. K. and Wakelin, D. 1986. Antigen-specific T-cell lines transfer protective immunity against Trichinella spiralis in vivo. *Immunology* 58, 57-61.
- Ring, A. M. 1975. Wright-Giemsa modified stain. En: *Model Laboratory Procedure Manual (Hematology)*. Lab. Med. 6, 28.
- Roberts, R. L. and Gallin, J. I. 1985. Rapid method for isolation of normal human peripheral blood eosinophils on discontinuous Percoll gradients and comparison with neutrophils. *Blood* 65, 433-440.
- Rockey, K. H., Donnelly, J. J., Stromberg, B. E. and Soulsby, E. J. 1979. Immunopathology of Toxocara canis and Ascaris suum infections of the eye: the role of the eosinophil. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18, 1172-1184.
- Rogers, R. M., Christiansen, J. R., Coalson, J. J. and Patterson, C. D. 1975. Eosinophilic pneumonia physiologic response to steroid therapy and observations on light and electron microscopic findings. *Chest* 68, 665-671.
- Rothenberg, M. E., Owen, W. F. Jr., Silberstein, D. S., Soberman, R. J., Austen, K. F. and Stevens, R. L. 1987. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science* 237, 645-647.
- Salata, R. A., Cox, J. and Ravdin, J. I. 1985. Interaction of human leucocytes and Entamoeba histolytica: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J. Clin. Invest.* 76, 491-499.
- Salata, R. A., Pearson, R. D. and Ravdin, J. I. 1985. Interaction of human leukocytes and Entamoeba histolytica. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J. Clin. Invest.* 76, 491-496.
- Salata, R. A., Martínez-Palomo, A., Murray, H. W., Canales, L., Treviño, N., Segovia, E., Murphy, C. F. and Ravdin, J. I. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against E. histolytica. *J. Immunol.* 136, 2633-2639.
- Salata, R. A. and Ravdin, J. I. 1986. The interaction of human neutrophils and Entamoeba histolytica: increased cytopathogenicity for liver cell monolayers. *J. Infect. Dis.* 154, 19-26.

Salata, R. A., Cox, J. and Ravdin, J. I. 1987. The interaction of human T-lymphocytes and *E. histolytica*: killing of virulent amoeba by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol.* 9, 249-261.

Salata, R. A. and Ravdin, J. I. 1988. The interaction of polymorphonuclear leukocytes and *Entamoeba histolytica*. En: *Amebiasis. Human infection by E. histolytica*, (J. I. Ravdin, ed), John Wiley and Sons, N. Y., pp. 464-470.

Salata, R. A., Ahmed, P. and Ravdin, J. I. 1989. Chemoattractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. *J. Parasitol.* 75, 644-646.

Salvato, G. 1968. Some histological changes in chronic bronchitis and asthma. *Thorax* 23, 168-172.

Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 568-575.

Sanderson, C. J., López, A. F. and Brunn-Moreno, M. 1977. Eosinophils and non lymphoid K cells kill *T. cruzi* epimastigotes. *Nature* 268, 340-341.

Sanderson, C. J., Warren, D. J. and Strath, M. 1985. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation *in vitro*. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. *J. Exp. Med.* 162, 60-74.

Sanderson, C. J. 1993. 2. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. En: *Pharmacology of Eosinophils*, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 11-24.

Sanjar, S., McCabe, P. and Reynolds, N. 1991. Recombinant human IL-5 (rh-IL-5) induces a rapid and selective blood eosinophilia in the guinea pig. *Am. Rev. Resp. Dis.* 143, A14.

Sasaki, Y., Araki, A. and Koga, K. 1977. The mast cell and eosinophil in nasal secretion. *Ann. Allergy* 39, 106-109.

Savanat, T., Viriyanond, P. and Nimitmongkol, N. 1978. Blast transformation of lymphocytes in amebiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 705-710.

Schlecht, H. and Schwenker, G. 1912. Über die Beziehungen der Eosinophile zur Anaphylaxie. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 108, 405-428.

- Schriber, R. A. and Zucker-Franklin, D. 1974. A method for the induction of blood eosinophilia with simple protein antigens. *Cell. Immunol.* 14, 470-474.
- Sedgwick, J. B., Geiger, K. M. and Busse, W. W. 1990. Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 142, 120-125.
- Sekizawa, K., Aizawa, T. Tamura, G., Sasaki, H. and Takishima, T. 1991. Mechanism of interleukin 5-induced hyperresponsiveness of airway smooth muscle in guinea pigs. *Am. Rev. Resp. Dis.* 143, A14.
- Sher, R. and Glover, A. 1976. Isolation of human eosinophils and their lymphocyte-like rosetting properties. *Immunology* 31, 337-341.
- Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V., Campos-Rodríguez, R. and Martínez-Palomo, A. 1992. Morphologic characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. *Arch. Med. Res. (Méx.)* 23, 203-207.
- Shulman, L. E. 1990. The eosinophilia-myalgia syndrome associated with ingestion of L-tryptophan. *Arthritis Rheumatol.* 33:913-917.
- Shult, P. A., Graziano, F. M., Wallow, I. H. and Busse, W. W. 1985. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.* 106, 638-645.
- Silberstein, D. S. and David, J. R. 1987. The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunol. Today* 8, 380-385.
- Silva, P. M. R., Martins, M. A., Carneiro, R. S. B. and Vargaftig, B. B. 1989. Late eosinophil mobilization induced by PAF acether in the pleural cavity of rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22, 1281-1285.
- Silver, R. M. 1991. Unraveling the eosinophilia-myalgia syndrome. *Arch. Dermatol.* 127, 1214-1216.
- Slifman, N. R., Peterson, C. G. B., Gleich, G. J., Dunette, S. L. and Venge, P. 1989. Human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil protein X are likely the same protein. *J. Immunol.* 143, 2317-2322.

- Smith, H. J., Snowdon, K. E., Finley, G. G. and Laflamme, L. F. 1990. Pathogenesis and serodiagnosis of experimental Trichinella spiralis spiralis and Trichinella spiralis nativa infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 54, 355-359.
- Sokol, R. J., Hudson, G., Brown, M. J., Wales, J. and James, N. T. 1988. Hypereosinophilic syndrome : Case report and morphometric study. *Acta Haematol.* 79, 107-111.
- Sokol, R. J., Hudson, G., Wales, J. and James, N. T. 1991. Ultrastructural morphometry of human leucocytes in health and disease. *Electron Microsc. Rev.* 4, 179-195.
- Songsiridej, V., Peters, M. S., Dor, P. J., Ackerman, S. J., Gleich, G. J. and Busse, W. W. 1985. Facial edema and eosinophilia: Evidence for eosinophil degranulation. *Ann. Intern. Med.* 103, 503-506.
- Specks, U. and DeRemee, R. A. 1990. Granulomatous vasculitis, Wegener's granulomatosis, and Churg-Strauss syndrome. *Rheumatol. Dis. Clin. NA* 16, 377-397.
- Spina, D., McKenniff, M. G., Coyle, A. J., Seeds, E. A. M., Tramontana, M., Perretti, F., Manzini, S. and Page, C. P. 1991. Effect of capsaicin on PAF-induced bronchial hyperresponsiveness and pulmonary cell accumulation in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1268-1274.
- Spry, C. J. 1971a. Mechanism of eosinophilia. V. Kinetics of normal and accelerated eosinopoiesis. *Cell Tissue Kinet.* 4, 351-364.
- Spry, C. J. 1971b. Mechanism of eosinophilia. VI. Eosinophil mobilization. *Cell Tissue Kinet.* 4, 365-374.
- Spry, C. J., Tai, P.-C. and Ogilvie, B. M. 1980. Hypereosinophilia in rats with Trichinella spiralis infections. *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 1-7.
- Spry, C. J. F. 1982. The hypereosinophilic syndrome: Clinical features, laboratory findings and treatment. *Allergy* 37, 539-551.
- Spry, C. J. F. 1985. Synthesis and secretion of eosinophil granule substances. *Immunol. Today* 6, 332-335.
- Spry, J. F. C. 1988. Eosinophils. A comprehensive review and Guide to the Scientific and Medical Literature. Oxford University Press, Oxford, p. 4.

- Spry, C. J. F. 1993. 1. The natural history of eosinophils. En: Immunopharmacology of Eosinophils, H. Smith and R. M. Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 5-9.
- Steinbach, K. H., Shick, P., Trepel, F., Raffler, H., Dohrmann, J., Heilgeist, G., Heltzel, W., Li, K., Past, W., van der Woerd de Lange, J. A., Theml, H., Fliedner, T. M. and Begemann, H. 1979. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut* 39, 27-38.
- Stern, J. B., Sobel, H. J. and Rotchford, J. P. 1984. Wells' syndrome: is there collagen damage in the flame figures? *J. Cutan. Pathol.* 11, 501-504.
- Stern, J. J., Graybill, J. R. and Drutz, D. J. 1984. Murine amebiasis: The role of the macrophage in host defense. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 372-380.
- Sturrock, R. F., Kimani, R., Cottrell, B. J., Butterworth, A. E., Seitz, H. M., Siongok, T. K. and Houba, V. 1983. Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *S. mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 363-371.
- Sugane, K. and Oshima, T. 1980. Recovery of large numbers of eosinophils from mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 799-802.
- Sugane, K. and Oshima, T. 1985. Induction of a marked eosinophilia by cylophosphamide in *Toxocara canis* infected SJL mice. *Parasite Immunol.* 7, 255-263.
- Sugane, K. 1988. Eosinophilia in *Ascaris suum*-reinfected mice. *J. Helminthol.* 62, 51-57.
- Sun, F. F., Crittenden, N. J., Czuk, C. I., Taylor, B. M., Stout, B. K. and Johnson, H. G. 1991. Biochemical and functional differences between eosinophils from animal species and man. *J. Leukoc. Biol.* 50, 140-150.
- Swygert, L. A., E. F. Maes, L. E. Sewell, L. Miller, H. Falk, E. M. Kilbourne. 1990. Eosinophilia-myalgia syndrome. Results of national surveillance. *J. Amer. Med. Assoc.* 264, 1698-1703.
- Tai, P.-C., Spry, C. J. F. 1977. Purification of normal human eosinophils using the different binding capacities of blood leucocytes for complexed rabbit IgG. *Clin. Exp. Immunol.* 28, 256-260.

- Tai, P.-C., Spry, C. J. F., Peterson, C., Venge, P. and Olsson, I. 1984. Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 309, 182-184.
- Tai, P.-C., Sun, L. and Spry, C. J. 1991. Effect of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 312-316.
- Taniguchi, H., Mita, H., Saito, H., Yui, Y., Kajita, T. and Shida, T. 1985. Increased generation of leukotriene C from eosinophils in asthmatic patients. *Allergy* 40, 571-573.
- Tchernitchin, A. N. 1973. Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophils in the mechanism of estrogen action. *J. Steroid. Biochem.* 4, 277-282.
- Tomoo, O. 1961. Standardization of techniques for infecting mice with *T. canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. *J. Parasitol.* 47, 652-656.
- Topozada, H. H. and Talaat, M. A. 1975. Human nasal epithelium and cellular elements in chronic allergic rhinitis. Electron-microscopy study. *J. Oto-Rhino-Laryngol. Rel. Special. (ORL)* 37, 333-343.
- Tsuda, S., Miyasato, M., Nakama, T., Nakano, S., Kasada, M. and Sasai, Y. 1989. Evidence of eosinophil degranulation in the peripheral circulation of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 92, 534 (Abstr).
- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F., and Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *Amer. J. Pathol.* 117, 81-91.
- Tsutsumi, V. and Martínez-Palomo, A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Amer. J. Pathol.* 130, 112-119.
- Undritz, E., Lang, E. M. and Van Oye, E. 1956. La réaction peroxydasique des eosinophiles comme moyen de taxonomie (classification) des mammiferes. *Le Sang* 27, 513-515.
- Vadas, M. A., David, J. R., Butterworth, A., Pisani, N. T. and Siongok, T. A. 1979. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils,

and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol. 122, 1228-1236.

Vadas, M. A., David, J. R., Butterworth, A. E., Houba, V., Sturrock, R., David, L., Herson, R., Siongok, T. A. and Kimani, R. 1980. Functional studies on purified eosinophils and neutrophils from patients with Schistosoma mansoni infections. Clin. Exp. Immunol. 39, 683-694.

Vadas, M. A. 1981. Cyclophosphamide pretreatment induces eosinophilia to non parasite antigen. J. Immunol. 127, 2083-2086.

Vaux, D. L., Lalor, P. A., Cory, S. and Johnson, G. R. 1990. *In vivo* expression of interleukin 5 induces an eosinophilia and expanded Ly-1B lineage populations. Int. Immunol. 2, 965-971.

Velázquez, J. R., Llaguno, P., Fernández-Díez, J., Rosas, S., Arellano, J., López-Osuna, M. y Kretschmer, R. 1993. Un modelo experimental de eosinofilia. II Reunión Nacional de Investigación Médica, Oaxtepec, Mo., MEXICO. 10-13 Nov., Memorias No. 257. Arch. Med. Res. 25, 54.

Velázquez, J. R., P. Llaguno, J. Fernández-Díez, M. Pérez, J. Arellano, M. López-Osuna and R. R. Kretschmer. 1995. Antigen induced eosinophilia protects gerbils (Meriones unguiculatus) against experimental amebic abscess of the liver. Arch. Med. Res. En prensa.

Venge, P. 1990. The human eosinophil in inflammation. Agents and Actions 29, 122-124.

Venge, P. 1993. 4. Human eosinophil granule proteins : Structure, Function and Release. En: Immunopharmacology of Eosinophils, H. Smith and R. M. Cook, eds., Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 43-55.

Volovitz, B., Osur, S. L., Bernstein, J. M. and Ogra, P. L. 1988. Leukotriene C4 release in upper respiratory mucosa during natural exposure to ragweed-sensitive children. N. Engl. J. Med. 82, 414-418.

Voss, M. J., Bush, R. K., Mischler, E. H. and Peters, M. E. 1982. Association of allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. J. Allergy Clin. Immunol. 69, 539-546.

- Waller, P. C., Wood, S. M., Rawlins, M. D., Breckendrige, A. M. 1990. Medicinal L-tryptophan and eosinophilia-myalgia syndrome in the U. K. Symposium Europ. Pharmacovigilance, Strasbourg.
- Walls, R. S. and Beeson, P. B. 1972. Mechanism of eosinophilia. IX. Induction of eosinophilia in rats by certain forms of dextran (36532). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 689-693.
- Walls, R. S. 1976. Lymphocytes and specificity of eosinophilia. S. Afr. Med. J. 50, 1313-1318.
- Wang, W., Keller, K. and Chadee, K. 1992. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. Infect. Immun. 60, 3169-3174.
- Ward, R. E. and McLaren, D. J. 1988. *Schistosoma mansoni*: evidence that eosinophils and/or macrophages contribute to skin-phase challenge attrition in vaccinated CBA/Ca mice. Parasitology 96, 63-84.
- Ward, R. E. and McLaren, D. J. 1989. *Schistosoma mansoni*: migration and attrition of challenge parasite in naive rats and rats protected with vaccine serum. Parasite Immunol. 11, 125-146.
- Watanabe, N., Katakura, K., Kobayashi, A. Okumura, K. and Ovary, Z. 1988. Protective immunity and eosinophilia in IgE-deficient SJA/9 mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis* and *Trichinella spiralis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 4460-4462.
- Waters, L. S., Taverne, J., Tai, P. C., Spry, C. J., Targett, G. A. and Playfair, J. H. 1987. Killing of *Plasmodium falciparum* by eosinophil secretory products. Infect. Immun. 55, 877-881.
- Weeks, A. M. and Glomski, C. A. 1978. Cytology of the bone marrow in the Mongolian gerbil. Lab. Anim. 12, 195-202.
- Wegner, C. D., Clarke, C. C., Torcellini, C. A. and Gundel, R. H. 1989. Effect of single and multiple inhalations of platelet activating factor on airway cell composition and responsiveness in monkeys. Ann. Rev. Resp. Dis. 139, A94.
- Weil, G. J. and Chused, T. M. 1981. Eosinophil autofluorescence and its use in isolation and analysis of human eosinophils using flow microfluorometry. Blood 57, 1099-1104.

- Weiss, J. W., Drazen, J. M., Coles, N., McFadden, E. R., Weller, P. F., Corey, E. J., Lewis, R. A. and Austen, K. F. 1982. Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans. *Science* 216, 196-198.
- Weller, P. F. and Austen, K. F. 1983. Human eosinophil arylsulfatase B. Structure and activity of the purified tetrameric lysosomal hydrolase. *J. Clin. Invest.* 71, 114-123.
- Weller, P. F., Bach, D. S. and Austen, K. F. 1984. Biochemical characterization of human eosinophils Charcot-Leyden crystal protein lysophospholipase. *J. Biol. Chem.* 259, 15100-15105.
- Weller, P. F. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* 324, 1110-1118.
- Wells, G. C. and Smith, N. P. 1979. Eosinophilic cellulitis. *Br. J. Dermatol.* 100, 101-109.
- Wiedermann, G., Scheiner, O., Stemberger, H. and Kollaritsch, H. 1984. Cytotoxic action of *E. histolytica*: Influence of humoral defense mechanisms. *Proc. 11th. Int. Conf. Trop. Med. Mal.* 9,166.
- Wiggin, C. J. and Gibbs, H. C. 1990. Adverse immune reactions and the pathogenesis of *Ostertagia ostertagi* infections in calves. *Am. J. Vet. Res.* 51, 825-832.
- Williams, R. B. and Gwaltney, J. M. 1972. Allergic rhinitis or virus cold? Nasal smear eosinophilia in differential diagnosis. *Ann. Allergy* 30, 189-194.
- Wolford, S. T., Shroer, R. A., Gallo, P. P., Gohs, F. X., Brodeck, M., Falk, H. B., and Ruhren, R. 1987. Age-related changes in serum chemistry and hematology values in normal Sprague-Dawley rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 8, 80-88.
- Yamaguchi, Y., Suda, T., Shiozaki, H., Miura, Y., Hitoshi, Y., Tominaga, A., Takatsu, K. and Kashara, T. 1990. Role of IL-5 in IL-2 induced eosinophilia. *In vivo* and *in vitro* expression of IL-5 mRNA by IL-2. *J. Immunol.* 145, 873-877.
- Yazdanbakhsh, M., Eckmann, C. M., De Boer, M. and Roos, D. 1987. Purification of eosinophils from normal blood, preparation of eosinoplasts and characterization of their functional response to various stimuli. *Immunology* 60, 123-129.

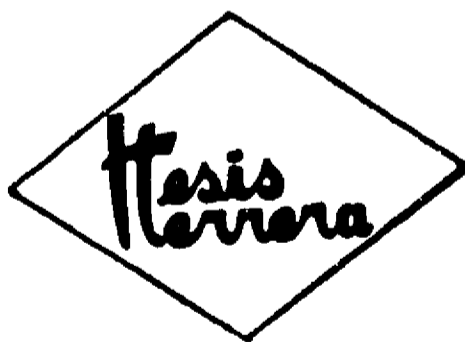
Yazdanbakhsh, M., Eckmann, C. M., Koenderman, L., Verhoeven, A. J. and Roos, D. 1987. Eos do respond to fMLP. *Blood* 70, 379-383.

Zabel, P. and Schlaak, M. 1991. Cyclosporin for hypereosinophilic syndrome. *Ann. Hematol.* 62, 230-231.

Zhang, T., Cieslak, P. R. and Stanley, S. L. Jr. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *E. histolytica* antigen. *Infect. Immun.* 62, 1166-1170.

Zinkham, W. H. 1978. Visceral larva migrans. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. *Am. J. Dis. Child.* 132, 627-633.

Zinkl, J. G. 1981. The leukocytes. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)* 11, 237-263.



Tel. 658 - 73 - 44