

52
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

OBTENCION Y PURIFICACION DE MACROFAGOS
DE CALOSTRO HUMANO. INTERACCION *in vitro*
CON TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUZ MARIA ROCHA RAMIREZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1980



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 GENERAL

	PAG.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
- Planteamiento del Problema.	
- Objetivos.	
- Hipotesis.	
III. MATERIAL Y METODOS	19
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSION	55
VI. CONCLUSIONES	64
VII. BIBLIOGRAFIA	65

1. RESUMEN.

Se ha demostrado que en calostro humano existen mecanismos de resistencia específicos e inespecíficos y se ha propuesto que estos intervienen en la defensa del recién nacido. Dentro de estos mecanismos, elementos celulares como los macrófagos se encuentran en un gran porcentaje.

Por otra parte, estudios en niños lactantes demuestran una baja incidencia de trofozoitos de Entamoeba histolytica (1.2 %), por lo que es probable que macrófagos de calostro humano que llegan al intestino estén implicados en esta baja incidencia. En el presente trabajo se estudió el papel que pudieran desarrollar los macrófagos de calostro humano contra trofozoitos de Entamoeba histolytica.

Se obtuvieron macrófagos de calostro humano por adherencia a vidrio por 3 y 24 horas y las células en ambos periodos se caracterizaron por microscopía óptica y electrónica, así como por pruebas citoquímicas (esterasa no específica y mieloperoxidasa). Se obtuvo 82.15 % de células macrofágicas por adherencia de 24 horas. Estas células se pusieron en contacto con trofozoitos de E. histolytica cepas HK9 y HMI en medio RPMI-1640 en una relación 30:1 macrófago/amiba y se determinó la viabilidad de ambas células en diferentes intervalos de incubación, así como el número de amibas adheridas a macrófagos.

Se observó una disminución en los trofozoitos adheridos a macrófagos y una disminución del 25.58 % en la viabilidad de las amibas en comparación con los testigos, siendo estos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.02$).

La viabilidad de los macrófagos disminuyó 10.3 % en comparación con los testigos, este resultado no fue estadísticamente significativo. Estos resultados sugieren que los macrófagos de calostro humano in vitro interfieren en la viabilidad de los trofozoitos de Entamoeba histolytica.

II. INTRODUCCION.

La amibiasis es una infección entérica asintomática ó sintomática provocada por el protozooario Entamoeba histolytica. Esta parasitosis es prevalente en países con inadecuadas condiciones de sanidad (1,2).

Aproximadamente el 10 % de la población mundial padece de amibiasis, esta infección constituye un problema de salud pública principalmente en países subdesarrollados en donde las condiciones precarias, la pobreza y la sobrepoblación, así como la probable presencia de cepas altamente virulentas de E. histolytica se combinan para generar una incidencia más alta de amibiasis, la cual puede ser asintomática (portadores sanos) ó con manifestaciones clínicas.

En México la amibiasis constituye un importante problema de salud pública. Se estima que 5.6 % de la población se encuentra infectada por E. histolytica, resultando ser uno de los países con mayor incidencia de esta parasitosis, tanto en su forma sintomática como asintomática (3).

Entamoeba histolytica pertenece a la familia Entamoebidae del orden amoebidae, supylum sarcodina (4). Este parásito presenta en su ciclo de vida dos fases: la forma infectante ó quiste y la forma adulta ó trofozoítica.

El trofozoito es una célula pleomórfica de gran movilidad, caracterizada por un ectoplasma hialino ó claro y un endoplasma granular, el cual contiene numerosas vacuolas. Las propiedades de su membrana plasmática le permiten llevar a cabo procesos de fagocitosis y pinocitosis, así como de redistribución de membranas, la cual puede estar inducida por la unión de ligandos externos y adherencia ó asociación a bacterias (5). El trofozoito es ordinariamente uninuclear con un tamaño de 15 a 60 micras; está caracterizado por la ausencia de organelos presentes en otras células eucarióticas típicas, además de -

la presencia de cuerpos cilíndricos, ribosomas y lisosomas; exhibiendo solamente un sistema vacuolado que ocupa casi todo el citoplasma (6,7). Los trofozoitos usualmente viven como comensales en el epitelio del intestino grueso del hospedero, reproduciéndose por un proceso de división binaria ó múltiple (8).

La forma quística mide alrededor de 5 a 20 micras y dependiendo del grado de madurez contiene de uno a cuatro núcleos, así como la presencia de cuerpos cromatoide. Su pared se encuentra constituida de quitina, la cual le permite sobrevivir en condiciones adversas que serían letales para la forma trofozoítica (9). Cuando el quiste maduro es ingerido y llega a nivel de estómago pierde su cubierta de quitina, produciéndose divisiones citológicas, que dan lugar a la formación de un metaquiste tetranucleado del cual emerge una pequeña amiba, que alcanza la luz intestinal, donde aumenta de tamaño y al parecer produce ocho trofozoitos (10).

Estudios han sido encaminados para definir ó señalar los mecanismos operantes en la susceptibilidad y resistencia a infecciones causadas por E. histolytica. Numerosos investigadores han presentado evidencias de que la patogenicidad de una amiba esta directamente relacionada a su asociación a bacterias, sin embargo otros autores están en contra de estas afirmaciones (11, 12). La dependencia de muchas clases de amiba en cultivo sobre su asociación a bacterias y la incapacidad de la amiba para producir lesiones extensivas en conejillos de india libres de bacterias, ha llevado al concepto de que es necesario un sinergismo entre bacteria y amiba para la producción de la enfermedad, aunque se han encontrado abscesos amibianos "estériles".

Durante la fase inicial y la producción de la enfermedad se han implicado diversos factores, los cuales se agrupan de la siguiente manera:

1.- Relacionados al parásito: Virulencia de la cepa, magnitud del inóculo y repetición de infecciones.

2.- Relacionados al hospedero: Estado nutricional, estado fisiológico y factores genéticos.

3.- Factores asociados: Coexistencia de infecciones bacterianas por bacterias enteropatógenas como Shigella, Salmonella y E. coli enteropatógenas, coexistencia de otras parasitosis, alcoholismo, dieta rica en colesterol y almidones.

Ciertamente el factor más frecuentemente mencionado es el estado nutricional del hospedero. Algunas observaciones clínicas sugieren un importante papel de metabolitos exógenos en la enfermedad (13). En la TABLA I, se describen factores nutricionales que afectan la resistencia y susceptibilidad por la amiba, establecida en medios de cultivo, animales de experimentación, y en el hombre. La cuestión de la relación hospedero-parásito en amibiasis - así como la producción de la enfermedad es compleja y controversial; algunos individuos presentan un curso muy agudo y severo de la infección, mientras que otros albergan el parásito por meses y hasta años, sin mostrar los menores signos de la enfermedad; estas observaciones han llevado a sugerir que factores del hospedero y parásito se conjugan para la producción de la enfermedad (14).

En estudios recientes se demostró la participación de la respuesta inmune humoral y celular del hospedero en contra de amibiasis. La respuesta inmune humoral se ha identificado por la presencia de anticuerpos circulantes de tipo IgG detectados en pacientes con infección intestinal; en hamsters infectados experimentalmente, los anticuerpos se detectan después de una semana de la inoculación (15,16).

TABLA I.

FACTORES NUTRICIONALES QUE INFLUYEN EN LA AMIBIASIS (12).

CLASE	AMBIENTE	MEDIO	FACTOR	RESULTADO
Amibas en cultivo				
HUS-100	mezcla de flora bacteriana	Huevo Lock'es	Antagonistas de ac. f6lico.	Inhibici6n del crecimiento.
HUS-106				
En animales de experimentaci6n				
Clases Humanas y de monos	NM**	Modificado de Boeck & Dorholav	Harina de arroz	Disminuci6n de la virulencia.
En Humanos				
NA**	NA**	NA**	Dieta inadecuada	Incremento de la susceptibilidad a la infecci6n.

NM**: No mencionado; NA**: No aplicable.

La cuantificación de los anticuerpos específicos se ha utilizado como procedimiento de diagnóstico ya que se encuentran en el más del 90 % de los pacientes que sufren abscesos hepáticos amibianos y en otras formas severas de amibiasis invasiva y solo en un 6 % de pacientes con evidencias clínicas de amibiasis (17). La utilidad de la detección de anticuerpos anti-amiba en la seroepidemiología esta basada en el conocimiento de que los anticuerpos persisten en suero aún después de una infección subclínica (18).

Existe un punto controversial concerniente a la circulación de anticuerpos en la resolución de la infección, ya que al parecer en individuos con elevados títulos de anticuerpos no tienen estos, un efecto protector. En estudios in vitro se ha observado que los anticuerpos son inefectivos en producir lisis significativa de los trofozoítos en presencia de complemento (19). Según estas observaciones se manifiesta una aparente ineficacia de la respuesta humoral en la infección amibiana; además este parásito es capaz de activar la vía alterna del complemento (20) y este mecanismo puede ser importante en la defensa humoral no específica del hospedero contra la infección amibiana, ya que se ha observado que en hamsters tratados con veneno de cobra para inactivar el complemento, las lesiones hepáticas que se desarrollan son más severas en relación al control (21). Otro factor que puede inhibir el establecimiento de E. histolytica en la luz intestinal es la secreción de IgA (22).

Con respecto a, la inmunidad celular en pacientes con absceso hepático amibiano, está se encuentra abatida en su fase inicial como lo demuestran las pruebas de intradermoreacción con los antígenos de estreptocinasa, estreptorinasa, derivado purificado de protefnas (PPD), así como en la prueba del factor de la migración de macrófagos. La ausencia de inmunidad celular en la fase inicial de la amibiasis y su posterior aparición sugieren un estado tran-

torio de anergia que podría ser provocado por el antígeno amibiano, tal como se describe en otras enfermedades infecciosas (23).

En base a estudios en infecciones amibianas experimentales, se reporta que la inmunidad celular juega un papel importante en la amibiasis, sin embargo las células efectoras involucradas en esta reacción no se han estudiado.

Experimentos previos indican que los macrófagos son importantes en la resistencia del hospedero en contra de infecciones amibianas (24). En un estudio con modelo animal, se indica que los macrófagos obtenidos de exudado peritoneal de ratones, al ponerse en contacto con trofozoítos de *E. histolytica* en una relación 100:1 macrófago/amiba, son citotóxicos para los trofozoítos y esta actividad se ve incrementada cuando los macrófagos son provenientes de animales inmunizados y con presencia de anticuerpos contra amiba (25).

En otros estudios realizados en hamsters a los cuales se les administró suero anti-macrófago y posteriormente se inocularon intrahepáticamente con trofozoítos, se observó que éstos animales desarrollaban un aumento en el tamaño de los abscesos en el hígado y también una diseminación mayor a otros órganos en comparación con los controles (26,27). Asimismo animales tratados con sílice y luego inoculados intrahepáticamente con *E. histolytica* desarrollan abscesos en el hígado y focos metastásicos, lo cual fue estadísticamente significativo en comparación con el grupo testigo de animales (28). Esta severidad de la infección se adjudica a la disminución de macrófagos ya que como es sabido el sílice es citotóxico para el macrófago (29). El papel inhibitor del sílice sobre los macrófagos, también se ha demostrado en otras infecciones parasitarias (30). Los antecedentes descritos anteriormente remar-

can la importancia del macrófago como célula participante en la defensa del -
hospedero. Estos estudios además indican que una de las células efectoras -
responsables en definir la severidad de la amibiasis hepática en animales de -
experimentación es el macrófago.

Por otra parte, se ha considerado que el calostro y la leche humana -
pueden ser factores que se encuentren implicados en la resistencia del recién-
nacido contra E. histolytica ya que estos factores participan como importantes
elementos activos en las defensas del neonato a nivel de tubo digestivo, con--
tra algunos virus y bacterias; debido a su contenido de inmunoglobulinas, espe-
cialmente IgA secretora, así como la existencia de macrófagos, linfocitos T y
B, lisozima, complemento, lactoperoxidasa y lactoferrina (31). Además se cono-
ce que la frecuencia de amibiasis en la etapa neonatal es baja y que está -
baja frecuencia se ha atribuido a diferentes factores como son; los inheren--
tes a las características inmunológicas, pH gástrico, y flora intestinal del -
hospedero. Otros elementos también mencionados son los relativos al ambiente -
como resulta ser la administración de calostro humano; por lo que es de gran -
interés el plantear estudios para cuantificar el efecto que pudieran tener los
distintos componentes del calostro y la leche humana sobre el quiste y el tro-
fozoito de la amiba y aclarar si estos factores son determinantes en la resis-
tencia del recién nacido contra E. histolytica. (32).

La importancia de la leche materna en la nutrición del hombre ha sido -
considerada desde hace mucho tiempo. El hombre a través de su desarrollo ha -
creado gran variedad de productos alimenticios sustitutivos de ella, sin em--
bargo la leche materna mantiene una posición de alimento " primordial " en el
infante.

Se ha demostrado que en calostro y leche maternas existen gran variedad de componentes inmunitarios que involucran elementos celulares y solubles, así como factores que modulan los mecanismos no específicos de defensa del hospedero en contra de microorganismos infecciosos. Estos factores se han implicado en la prevención y evolución de infecciones bacterianas en el neonato y en el desarrollo de la microflora de las mucosas.

Entre las sustancias inmunorreguladoras están el factor inhibidor de la migración de macrófagos, factores para la producción de IgA, interferon y sustancias inmunosupresoras para células T. Entre los componentes celulares del calostro se encuentran macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales (33,34).

Entre los factores solubles del calostro y la leche están el componente secretor, inmunoglobulinas IgA 11 S (secretora), 7 S (sérica), IgM, IgG, IgD e IgE, componentes del complemento, lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y factores quimiotácticos (35).

En estudios recientes se ha mostrado gran interés por el papel protector que puedan desarrollar los componentes celulares del calostro humano (36).

Estos elementos celulares fueron observados por primera vez en 1839 por Alexander Donné, sin embargo fué poca la importancia que se le dió a su estudio. No fué sino hasta el año de 1966 cuando estas células fueron nuevamente estudiadas por Smith y Goldman (37,38). En estos estudios se estableció que la concentración de células de calostro humano está comprendida en un rango de 0.5×10^6 a 10×10^6 células por ml de calostro.

De los elementos celulares identificados en calostro humano los macrófagos conforman el mayor porcentaje, seguidos de los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y células epiteliales.

En la TABLA II se muestran los rangos en la cantidad de células de calostro humano.

TABLA II. COMPONENTES CELULARES DEL CALOSTRO EN EL PRE Y POST-PARTO TEMPRANO (35).

TIPO DE CELULAS	Núm x mm ³		% DE CELULAS TOTALES	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Macrófagos	2140	350-7000	66	37-93
Polimorfonucleares	560	10-900	21	2-41
Linfocitos	240	20-390	11	2-30
Células epiteliales	raro	raro	1-2	-

Las propiedades de los elementos celulares del calostro no están completamente estudiadas, sin embargo algunas de sus características se han determinado, las cuales han servido de apoyo en la diferenciación de estos elementos. En la TABLA III se observan ciertas características de los elementos celulares de calostro humano.

Se sabe que a medida que progresa la lactancia y se inicia el flujo de la leche materna, el número de células tiende a disminuir de forma constante. Se ha observado que durante los dos o tres primeros días de lactancia hay aproximadamente 10^4 a 10^5 linfocitos por ml de calostro y leche (39,40). Los linfocitos de calostro y leche responden in vitro a mitógenos como la fitohemaglutina (PHA); sin embargo se ha observado que existe poca correlación entre la

reactividad a la PHA de células T de sangre periférica y las células T de calostro y leche. El linfocito de calostro y leche puede originar una reactividad importante in vitro contra una amplia variedad de antígenos microbianos - como candidina, estreptocinasa, tuberculina, citomegalovirus y los virus de virus de parotiditis y rubeola (40). Los linfocitos también se caracterizan por una hiporrespuesta a mitógenos no específicos y antígenos de histocompatibilidad de células alogénicas (41). Se sugiere que los linfocitos de calostro y leche representan una población de distintas clonas de linfocitos que podrían derivarse del Tejido Linfode Asociado a Intestino (TLAI) ó Tejido Linfode Asociado a Bronquios (TLAB), de forma semejante a los precursores de IgA en la glándula mamaria durante el período de lactancia.

Por otro lado, aún no se cuenta con suficiente información sobre la actividad biológica de los leucocitos polimorfonucleares, sin embargo algunos autores sugieren la hipótesis de que los leucocitos del calostro podrían jugar un papel activo en la protección de los infantes contra agentes patógenos (42).

Con relación a los macrófagos que como ya se mencionó representan la mayoría de las células de calostro humano, han sido poco estudiados, aunque se han demostrado algunas de sus propiedades como son: su capacidad bactericida, participación de inmunidad mediada por células, fagocitosis, presencia de receptores para Fc y C3b del complemento, así como contenido intracelular de IgA (43).

En otros estudios se indica que los macrófagos de calostro humano son los responsables de la síntesis de algunos productos de resistencia del hospedero y factores propios de la leche (43,44, 45, 46); estos incluyen la biosíntesis y excreción de lactoferrina, componentes del complemento y de manera -

importante como vehículo de almacenamiento y transporte de IgA (47). En algunos estudios se ha probado la habilidad de los fagocitos de la leche (macrófagos y polimorfonucleares), en relación a su actividad fagocítica y muerte de microorganismos, siendo al parecer eficientes fagocitos pero con baja actividad bactericida (48,49).

La función biosintética de la glándula mamaria, así como la magnitud de los productos sintetizados es impresionante (50). Investigadores han presentado evidencias con respecto al sistema inmune local desarrollado en glándula mamaria (51); sin embargo los aspectos inmunológicos de los componentes de secreción no están bien definidos (52). De aquí los esfuerzos concernientes al estudio de las actividades secretoras de la glándula mamaria (calostro y leche), así como la repercusión en la regulación ó inducción de la respuesta inmune del recién nacido.

Existen evidencias que sugieren que la inmunoglobulina IgA secretora en calostro y leche es sintetizada en forma local en glándula mamaria por células plasmáticas específicamente sensibilizadas hacia varios antígenos en el TLA1 y TLAB. En modelos experimentales se demostró que después de una exposición antigénica en la superficie intestinal y/o respiratoria, las células precursoras del TLA1 y TLAB migran a través de la circulación general para llegar a diferentes secreciones constituyendo el sistema común de las mucosas - (53,54).

Estudios han demostrado que componentes calostrales estimulan el crecimiento y maduración de la mucosa intestinal en los niños y que concentraciones mayores de IgA se presentan en secreción nasal y saliva de niños alimentados con leche materna, en sus primeros días de vida en comparación con infantes alimentados con leche no materna (55,56).

TABLA III. PROPIEDADES INMUNOCITOQUIMICAS Y CITOQUIMICAS DE ELEMENTOS CALOSTRALES (43).

	Propiedades Citoquímicas:			Inmunofluorescencia				
	Esterasa no específica	Peroxidasa	Lípidos	IgA	IgM	SC	Lactoperoxidasa.	Lactoalbumina
Linfocitos	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrófagos	+	-	+	+	+	+	+	+
Leucocitos Polimorfonucleares	-	+	+	+	+	+	+	+
Granulos no celulares	-	-	+	+	+	+	+	+

SC: Componente Secretor.

Por otra parte, el neonato está desprovisto de mecanismos bien definidos de inmunidad en mucosas durante las dos primeras semanas de vida post-natal (57). Estudios efectuados después de la alimentación de calostro muestran que existen cantidades reducidas de inmunoglobulina IgA secretora en corriente sanguínea en las primeras 24 horas después del nacimiento (58). Además de que se propone en ciertos estudios, que la lactancia puede determinar la flora intestinal, así como los niveles de inmunoglobulina secretora del recién nacido (59,60). Por otro lado, es bien conocido que los neonatos de ganado vacuno, cerdos y mamíferos que son dependientes exclusivamente de calostro y leche para la adquisición de inmunidad pasiva materna, mueren con rapidez por infecciones entéricas fulminantes en ausencia de ingestión de calostro (61).

La inmunidad en el recién nacido está asociada a la presencia de anticuerpos transmitidos transplacentariamente, ya que el sistema inmune que posee no ha sido lo suficientemente estimulado por el medio externo. Sugiriéndose que la inmunidad en el recién nacido contra E. histolytica, en sus primeros días de vida depende de la presencia de anticuerpos transmitidos transplacentariamente (62). Asimismo la inmunidad en el neonato se puede ver reforzada por la ingestión de calostro a través de elementos como macrófagos, linfocitos e inmunoglobulinas; sin embargo no existen antecedentes que confirmen el papel de estos elementos a nivel de mucosa en humanos.

Se han detectado in vitro actividades específicas antimicrobianas, en calostro y leche humana, contra una gran variedad de agentes bacterianos, virales, hongos y parásitos, así como una intervención en el control de diarreas epidémicas con Escherichia coli en el recién nacido (63,64). También se ha demostrado el contenido de anticuerpos específicos que neutralizan tanto --

Vibrio cholera como enterotoxina de E. coli (65,66). En estudios recientes se han detectado anticuerpos de clase IgA específicos contra Entamoeba histolytica y Salmonella typhi (67,68). La mayor parte, de estas actividades como se puede observar se relacionan con la IgA secretora, que es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor concentración en calostro y leche, siendo está de - 5000mg/dfa de calostro recolectado; en los primeros días consecutivos al parto, para el caso de la IgM es de 70 mg/dfa y para la IgG de 56 mg/dfa. La concentración de inmunoglobulinas en muestras recolectadas después de una semana de iniciada la lactancia se ven disminuidas significativamente, aún cuando el contenido de IgA sigue siendo de cuatro a ocho veces mayor que en suero.

También otras actividades antimicrobianas en calostro y leche han sido detectadas como son el factor bifido (referente a la primera colonización de microorganismos principalmente lactobacilos), los cuales establecen las condiciones para impedir la invasión por otros microorganismos patógenos, y resistencia estafilocócica en ácidos grasos C-18. Asimismo se ha observado un mecanismo citotóxico independiente de anticuerpos para trofozoitos de Entamoeba histolytica y Giardia lamblia los cuales son eliminados al ponerse en contacto con leche humana, posiblemente a través de acción de enzimas presentes en dicho fluido (69).

Estudios in vitro han demostrado que los componentes celulares del calostro y componentes solubles de alguna manera están involucrados en la eliminación de microorganismos (69,70). Por lo que resulta de interés el estudiar el efecto que pudieran tener los macrófagos de calostro humano sobre los trofozoitos de E. histolytica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se ha reportado la presencia de anticuerpos específicos contra Entamoeba histolytica en calostro y leche humana (67). También se ha descrito un mecanismo independiente de anticuerpos en el cual trofozoitos de E. histolytica y Giardia lamblia son eliminados al ponerse en contacto con leche humana (69).

Considerando la baja incidencia de amibiasis en niños alimentados con leche materna (71); es posible que elementos celulares del calostro como los macrófagos y/o sus productos de secreción estén involucrados en la protección contra E. histolytica, lo cual se puede traducir en un aumento de la resistencia a la infección amibiana en niños alimentados con calostro y leche materna y se refuerce el concepto de la baja frecuencia de amibiasis en niños lactantes.

OBJETIVOS.

- 1.- Obtención de macrófagos de calostro humano.
 - a).- Estandarización de la técnica de obtención.
- 2.- Caracterización de macrófagos de calostro humano.
 - a).- Microscopía óptica y electrónica.
 - b).- Pruebas citoquímicas (esterasa no específica y mieloperoxidasa).
- 3.- Interacción macrófago-amiba.
 - a).- Establecer las condiciones del medio de interacción.
 - b).- Determinación de la relación óptima macrófago-amiba.
- 4.- Establecer si los macrófagos de calostro humano ejercen efecto citotóxico sobre los trofozoítos de Entamoeba histolytica.
 - a).- Observación por microscopía óptica.
 - b).- Determinación de la viabilidad de macrófagos y amibas por el método de exclusión de azul de tripán.

HIPOTESIS.

Considerando que el calostro y la leche humana ejercen un efecto lítico sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica, es probable que componentes celulares como los macrófagos y/o sus productos de secreción intervengan en dicho efecto.

III. MATERIAL Y METODOS.

1.- MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

a).- Medio de cultivo axénico para Entamoeba histolytica (TSY-S-33).

Peptona de Biotripticasa-2.6g; Glucosa-1.0g; Cloruro de sodio-0.2 g; Fosfato de potasio monobásico-0.06 g; fosfato de potasio dibásico-0.1 g; L- cistefina-0.1 g; ácido L-ascórbico 0.02 g; citrato férrico-0.0022 g; agua destilada---- 87 ml. Esterilizar a 15 libras por 15 minutos en autoclave, enfriar y agregar 15 ml de suero bovino descomplementarizado y añadir 3 ml de mezcla vitamínica NTCTC-107.

b).- Solución Balanceada de Sales (SBS).

Solución I: Dextrosa-10 g; fosfato de potasio monobásico anhidro-0.66 g; fosfato de sodio dibásico anhidro-0.925 g; rojo de fenol al 0.5 % en agua destilada- 2ml; Aforar con agua destilada-1000 ml. Solución II: Cloruro de calcio-anhidro-1.4 g; cloruro de potasio-4.0 g; cloruro de sodio-80.0 g; cloruro de magnesio anhidro-0.26 g; cloruro de magnesio. $7 H_2O$ - 2.0 g; . Mezclar la solución I y II de la siguiente manera: Solución I- 100 ml; Solución II-100ml; - agua destilada c.b.p. - 1000 ml. Esterilizar por filtración y agregar 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina y 50 ug/ml de gentamicina.

c).- Medio de cultivo celular RPMI-1640.

RPMI-1640 (Sigma) con L-Glutamina - 10.4 g; HEPES (N-2-hidroxy-etil-piperazina etano-ácido-sulfónico)- 2.0 g; NaHCO₃ - 2.0 g; aforar con agua destilada - 1000 ml. Esterilizar por filtración y agregar 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina y 50 ug/ml de gentamicina. Suplementarlo con 10 % de suero fetal bovino (previamente descompletarizado a 56 °C en baño maría por -

30 minutos).

d).- Medio de Cultivo Celular Duibecco modificado (DMEM).

DMEM- con L-Glutamina- 13.4 g; HEPES (hidróxi-etil-piperazina-etano-ácido-sulfónico - 2.08 g; NaHCO₃ - 2.0 g; aforar con agua destilada-1000ml. Se prepara y se suplementa igual que el anterior medio.

e).- Solución de bicarbonato de sodio al 5.6 % (NaHCO₃).

Bicarbonato de sodio-5.6 g; agua destilada- 100 ml. Esterilizar por autoclave.

f).- Solución de ácido clorhídrico 1.0 N (HCl).

Acido clorhídrico- (Q.P.)- 10.8 ml; agua destilada- 1000 ml. Esterilizar por autoclave.

g).- Solución de azul de tripana 0.3 %.

Azul de tripano - 0.3 g; solución salina al 0.85 %- 100 ml.

h).- Solución de Wright al 0.2 %.

Colorante de Wright en polvo- 0.2 g; glicerina (Q.P)- 3 ml; metanol (Q.P)-97 ml. Dejar reposar 24 horas, filtrar antes de usar.

i).- Solución de hematoxilina de Harris.

Hematoxilina en polvo- 5.0 mg; alcohol absoluto-50.0 ml; aluminato de potasio o amonio-100g; agua destilada-1000 ml; óxido de mercurio -2.5 mg. Mantener protegida de la luz y filtrar antes de usar.

j).- Solución para esterasa no específica (Método para detección enzimática para células mononucleares). Naftol AS-D-cloroacetato-0.0025 g; N,N, di-metil-formamida- 0.5 ml; solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.1 0.2 M -----

12.5 ml; FAST-RED (Sigma- N-N-Dietil-4-metoxi-metaniil-amida-hemi-cloruro de zinc- sal de diazonio-) - 20 a 40 mg;. La mezcla es preparada en fresco agregada de 12.5 ml de agua destilada y debe ser desechada después.

k).- Solución de dihidrocloruro de bencidina. (Método para detección enzimática de mieloperoxidasa); identificación de polimorfonucleares. Dihidrocloruro de bencidina - 0.3 g; sulfato de zinc. $7 H_2O$ - 3.8 % - 0.5 ml acetato de sodio. $3 H_2O$ - 1.0 g ; peróxido de hidrógeno al 3 % - 0.7 ml; hidróxido de sodio 1.0 N - 1.5 ml; safranina- 0.2 g. Guardar en la oscuridad y filtrar antes de usar.

2.- TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.

Se utilizaron trofozoitos de Entamoeba histolytica de la cepa HM1 y - HK9, procedentes de la División de Inmunoquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, I.M.S.S. y obtenidas por cortesía del Dr. Antonio Ramírez Vidals.

Las cepas se mantuvieron en cultivo axénico 1Y1-S-33 entre 35 y 39°C - en tubos de vidrio herméticamente cerrados, conforme al método de Diamond y - cols (72). Los trofozoitos se cultivaron en un período de 72 a 96 horas correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento, estos se lavaron dos veces con solución balanceada de sales (SBS) pH 6.8 a 2000 rpm con diámetro de rotor de 10.5 cm durante 5 minutos y se cuantificaron en un hematocitómetro . Se determinó su viabilidad por método de exclusión de azul de tripán.

3.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO.

Las muestras de calostro se obtuvieron en un período de 72 a 96 horas post-parto procedentes de mujeres primíparas y multiparas con un rango de edades entre los 12 y 40 años, internadas en el Hospital General de México de la S.S.A.

Las pacientes no presentaban signos de mastitis ni recibían medicamento alguno al momento de la colección de la muestra. Las muestras de calostro se obtuvieron por expresión manual en tubos estériles con antibiótico (gentamicina 50 ug/ml y penicilina 100 U/ml), previa asepsia de la zona con una solución de cloruro de benzalconio al 1 %. Las muestras se conservaron en hielo hasta su procesamiento el cual fue en un período no mayor de 3 horas.

4.- DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR POR EXCLUSION DE AZUL DE TRIPAN.

La cuantificación de viabilidad se realizó por la técnica de exclusión de azul de tripán de la siguiente manera: Se deposita 0.1 ml de la suspensión celular en un tubo y se añade una solución de azul de tripán al 0.3 %, en un volumen de 0.1 ml (dilución 1:2), se homogeniza la preparación y se observa al microscopio óptico. Para determinar el porcentaje de viabilidad se cuentan el número de células teñidas (células muertas) y el número de células no teñidas.

5.- DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS EXISTENTES EN MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO RECOLECTADAS EN MUJERES MEXICANAS.

En 100 muestras de calostro humano obtenidas se cuantificó el número total de células presentes por ml, de calostro. Esta cuantificación se llevo a

cabo en un hematocitómetro, relacionando la cantidad de células que se determinó con el volumen total de calostro recolectado y se midió la viabilidad por exclusión de azul de tripán.

6.- SEPARACION DE LAS CELULAS ADHERENTES DE LAS MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO.

Las muestras de calostro se trabajaron individualmente, la muestra se diluyó 1:2 con SBS y se centrifugó a 1500 rpm con diámetro del rotor de 10.5-cm, durante 15 minutos a 4 °C. La capa lipídica se separó por decantación y el paquete celular obtenido se lavó dos veces con SBS. Las células se cuantificaron en un hematocitómetro y se determinó su viabilidad por método de exclusión de azul de tripán. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado de suero fetal bovino al 10 % (previamente inactivado a 56 °C en baño maría por 30 minutos), ajustándose a una concentración de 2×10^6 células/ml. En ml de esta suspensión se colocó en tubos de vidrio estériles de fondo plano de 7 cm de altura por 1 cm de diámetro, conteniendo en el fondo un disco de vidrio de 0.8 cm de diámetro por 0.2 cm de espesor.

Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante períodos de 3 y 24 horas. Posteriormente la viabilidad de las células adherentes y no adherentes se cuantificó por método de exclusión de azul de tripán para ambos intervalos de incubación.

7.- DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS ADHERENTES PRESENTES EN LOS DISCOS DE VIDRIO UTILIZADOS PARA EL SISTEMA DE CULTIVO " in vitro " DE LAS CELULAS.

Para la determinación de células adherentes se analizaron 10 muestras-

las muestras se obtuvieron como ya se menciono anteriormente y se ajustaron--
a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado de -
suero fetal bovino al 10 %. Las células se incubaron por periodos de 3 y 24 -
horas; en ambos periodos se separaron células adherentes y no adherentes por-
lavados con SBS, los cuales se recolectaron en tubos de vidrio estériles y --
las células se cuantificaron en un hematocitómetro. Se determinó el número de-
células adherentes y no adherentes con base a la cantidad de células totales-
depositadas en los discos de vidrio.

8.- CUENTA TOTAL Y DIFERENCIAL DE CELULAS EN MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO.

En 10 muestras de calostro humano se cuantificó la concentración ini--
cial de células obtenidas, en un hematocitómetro. Se llevó a cabo también -
una cuenta diferencial, en las muestras, preparando frotis de las mismas y -
tiñendo por la técnica de Wright. Los conteos fueron desarrollados al azar -
contando un total de 100 células.

9.- CARACTERIZACION DE LAS CELULAS OBTENIDAS DE CALOSTRO HUMANO.

Se analizaron 10 muestras de calostro para la caracterización de cé--
lulas adherentes, la cual se realizó de la siguiente manera:

a).- MICROSCOPIA OPTICA: Las células que se obtuvieron por 3 y 24 horas
de incubación, se tiñeron según las técnicas de Wright, hematoxilina de Ha--
rris, y Giemsa. Estas tinciones se llevaron a cabo de acuerdo a los métodos-
ya establecidos en la literatura (73,74). Se realizaron observaciones de -
morfología, determinándose el porcentaje de macrófagos, con base a su aspecto
morfológico típico por conteos al azar de 100 a 200 células .

b).- MICROSCOPIA ELECTRONICA: También se realizaron observaciones a nivel de microscopía electrónica en las células adherentes obtenidas por 3 y 24 horas de incubación. Estas células se obtuvieron por adherencia en cajas petri de vidrio estériles de 5 cm de diámetro por 1 cm de altura; se desprendieron con un gendarme y se lavaron con SBS. El paquete celular se fijó con glutaraldehído al 3 % en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 durante 3- horas después se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1 % durante una hora y media. La muestra se deshidrató en alcoholes de concentraciones ascendentes y se incluyó en resina de EPON, los cortes se realizaron en ultramicrotomo - Raiger OMU 3 y las muestras fueron teñidas por el método de azul de toluidina (0.2 %), observándose al microscopio de luz y posteriormente al microscopio electrónico. Las observaciones de ultraestructuras típicas de células macrofágicas como su núcleo, citoplasma abundante, granulos, pseudopodos, heterocromatina etc, se analizaron para evaluar la caracterización de estas células.

c).- PRUEBAS CITOQUIMICAS: Se realizaron ensayos para la determinación de esterasa no específica y mieloperoxidasa tanto para células adherentes de 3 y 24 horas de incubación.

c.1).- DETERMINACION ENZIMATICA DE ESTERASA NO ESPECIFICA.

Se llevó a cabo la prueba de actividad enzimática de esterasa no específica de acuerdo al método de Yam y cols (75), modificado de la siguiente manera:

Las células adherentes obtenidas de 3 y 24 horas de incubación se lavaron dos veces con SBS y se fijaron en acetona al 100 % durante dos minutos. Posteriormente se lavaron nuevamente con SBS y se tiñeron con una solución stock de naftil- AS-D-cloroacetato en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.2

M pH 7.2 a temperatura ambiente por 45 minutos. La solución se eliminó por lavados con solución amortiguadora de Tris-HCl y las células se contrastaron con hematoxilina de Harris por dos minutos y fueron lavados después con agua caliente. Las preparaciones de las células aún húmedas son montadas en glicerol-gelatina para lectura al microscopio óptico. La interpretación de la prueba es llevada a cabo por la presencia de granulos rojizos en el citoplasma de las células cuando la reacción es positiva. Los ensayos se efectuaron por duplicado y las lecturas se realizaron por conteos de 100 a 200 células observadas al azar. Los controles de estas pruebas fueron frotis sanguíneos tratados bajo las mismas condiciones.

c.2).- DETERMINACION ENZIMATICA DE MIELOPEROXIDASA.

Las células adherentes obtenidas de 3 y 24 horas se lavaron dos veces con SBS y se fijaron con una mezcla de etanol-formol (90:10) durante dos minutos. Posteriormente se lavaron y se trataron con una solución de dihidrocloruro de bencidina al 9.3 % durante dos minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron hasta eliminar la solución y se montaron en aceite balsámico de Canadá para su observación al microscopio óptico. La lectura positiva se basa en la presencia de granulos azules dentro del citoplasma de las células, los conteos se realizaron iguales a los establecidos para la esterasa no específica, así como el número de ensayos llevados a cabo y también con respecto a los controles.

10.- DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA EL SISTEMA DE INTERACCION MACROFAGO-AMIBA.

Para llevar a cabo la interacción de macrófagos y amibas fue necesari-

rio ajustar algunos parámetros de importancia como:

a).- DETERMINACION DEL MEDIO DE INTERACCION.

b).- DETERMINACION DE LA RELACION CELULA-PARASITO PARA LA INTERACCION.

Para desarrollar este primer punto se realizaron ensayos de determinación de viabilidad tanto para amibas como para macrófagos de la siguiente manera:

a.1).- Determinación de la viabilidad de Entamoeba histolytica en diferentes medios de cultivo: Los trofozoitos de E. histolytica de las cepas HK9 y HMI se ajustaron a una concentración de 7.5×10^4 trofozoitos/ml en diferentes medios de cultivo como: medio de cultivo celular RPMI-1640, medio de cultivo celular Dulbecco modificado y medio para amibas TYI-S-33. Las suspensiones se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante intervalos de 0 - hrs, 1, 2, 3, 6, y 24 horas. Se prepararon controles de amibas resuspendidas en su medio original (TYI-S-33) bajo las mismas condiciones experimentales.

Se realizaron determinaciones de viabilidad durante cada intervalo de incubación mediante el método de exclusión de azul de tripán en un hematocitómetro. Se efectuaron un promedio de 4 experimentos para cada cepa de amiba y las determinaciones en cada intervalo de tiempo se hicieron por duplicado.

a.2).- Determinación de la viabilidad de macrófagos obtenidos de calostro humano en diferentes medios de cultivo: Células adherentes ajustadas en una concentración de 1×10^6 células/ml se pusieron en diferentes medios de cultivo: medio RPMI-1640, medio Dulbecco modificado y medio TYI-S-33. Se evaluó la viabilidad de las células adherentes en los diferentes medios de cultivo, por el método de exclusión de azul de tripán durante diferentes intervalos de 0, 1, 2, 3, 6 y 24 horas. Se estableció un control de macrófagos-

en medio RPMI-1640 bajo las mismas condiciones experimentales. Se llevaron a cabo un promedio de 4 experimentos y las cuantificaciones de viabilidad en cada intervalo se realizaron por duplicado.

b).- Determinación de la relación célula-parásito: Los trofozoitos de *E. histolytica* de las cepas HK9 y HMI se lavaron dos veces con SBS a 2000 rpm (diámetro de rotor 10.5 cm) durante 5 minutos y se cuantificaron en un hematocitometro y la viabilidad se determinó por método de exclusión de azul de tripán. Los trofozoitos se resuspendieron en medio RPMI-1640 ajustándose a diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla siguiente:

CONCENTRACION DE MACROFAGOS/ml	CONCENTRACION DE AMIBAS/ml	RELACION MACROFAGO-AMIBA
1×10^6	25×10^4	4:1
1×10^6	4×10^4	25:1
1×10^6	3×10^4	30:1
1×10^6	2×10^4	50:1
1×10^6	1×10^4	100:1

Las suspensiones de trofozoitos se agregaron en las concentraciones respectivas a una cantidad fija de células adherentes (1×10^6 células/ml) y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 15 minutos. Controles se amibas en medi RPMI-1640 y macrófagos en el mismo medio se prepararon y se incubaron en las mismas condiciones. Posteriormente se lavaron con SBS y se

fijaron con metanol al 70 % durante 10 minutos; estas preparaciones se lavaron nuevamente con SBS y se tñieron por la técnica de Wright. Las observaciones se llevaron a cabo por microscopía óptica realizándose ensayos por duplicado con un promedio de 4 experimentos para ambas cepas de amibas.

11.- CINÉTICA DE INTERACCIÓN MACROFAGO-AMIBA.

Para evaluar la cinética de interacción macrófago y amibas se cuantificó la viabilidad de ambos elementos así como la adherencia de los trofozoitos de Entamoeba histolytica por observaciones al microscopio óptico. Estas evaluaciones se realizaron de la forma siguiente: Las células adherentes, mantenidas en incubación por 24 horas se lavaron dos veces con SBS y se cuantificó la viabilidad por método de exclusión de azul de tripán. Amibas en medio RPMI-1640 en una concentración de 3×10^4 amibas/ml se adicionaron a las células (relación 30:1 macrófago/amiba); estas preparaciones se incubaron a 37 ° C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante diferentes intervalos 0, 5, 15, 30, 45 minutos; 1, 2, 3, y 4 horas. Se prepararon controles de amibas y macrófagos - solos únicamente resuspendidos en medio RPMI-1640 y tratados bajo las mismas condiciones.

a).- Determinación de la viabilidad de macrófagos y amibas por el método de exclusión de azul de tripán. Durante cada intervalo de tiempo se valoró la viabilidad de ambas células por el método de exclusión de azul de tripán en un hematocitómetro. Estas determinaciones se llevaron a cabo en ambas cepas de amibas HK9 y HM1 con un promedio de 4 experimentos.

b).- Determinación del número de amibas que permanecen adheridas a macrófagos: Durante cada intervalo de incubación las preparaciones se lavaron -

dos veces con SBS y se fijaron con metanol al 70 % durante 10 minutos. Las preparaciones se tiñeron por la técnica de Wright y se realizaron conteos al azar, del número de amibas adheridas a macrófagos y observables al microscopio óptico. Al igual que en el punto anterior, estos ensayos se realizaron por duplicado siendo un promedio de 4 experimentos.

Por otra parte, los resultados de estos estudios se expresaron como el promedio de 4 experimentos de repetición en donde cada evaluación se analizó por duplicado, aplicandose un estudio estadístico de t de Student para el caso de los ensayos de interacción macrófago-amiba. En cada experimento se corrieron muestras diferentes de calostro humano.

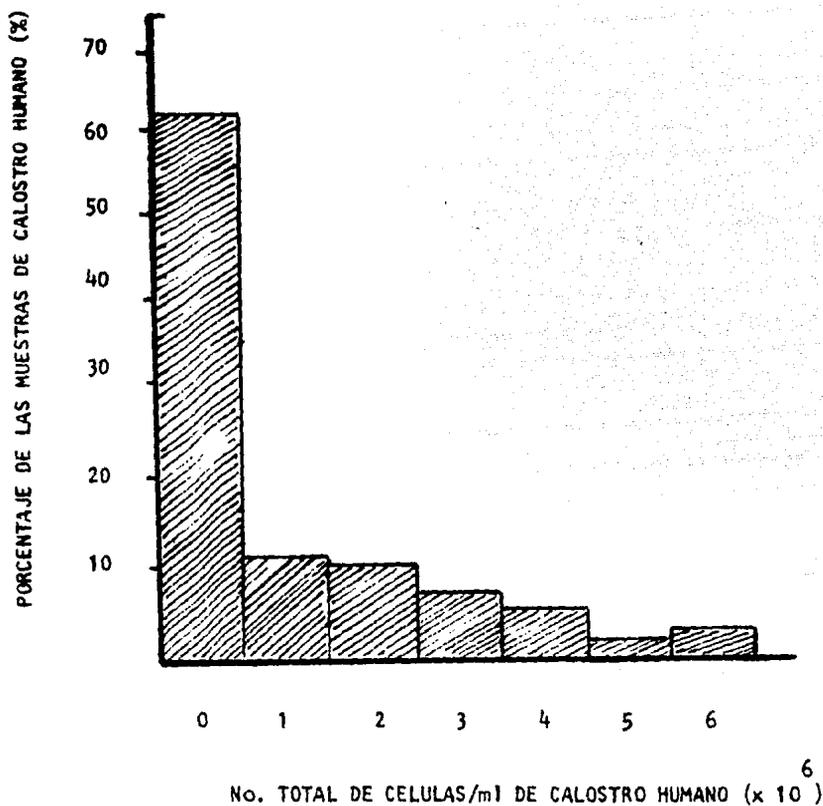
IV. RESULTADOS.

1. DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS EXISTENTES EN MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO RECOLECTADAS DE MUJERES MEXICANAS.

Se determinó que un 38 % de las muestras analizadas (38 muestras de 100 muestras), presentaban contenido celular, observándose que la población con contenido celular presentaba grandes variaciones en relación a la cantidad de células presentes. En la GRAFICA 1 se muestran las variaciones establecidas en la cantidad de células, en las muestras con contenido celular, también se observa que un gran porcentaje de las muestras analizadas no contenían células (62 %). Se cuantificó un promedio de 2.5×10^6 células/ml de calostro en las muestras analizadas, con un rango de 0 a 6×10^6 células/ml de calostro.

2.- SEPARACION DE LAS CELULAS ADHERENTES DE LAS MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO A LAS 3 y 24 HORAS DE INCUBACION.

Este experimento permitió valorar el tiempo de incubación más adecuado para purificación de macrófagos de calostro. En la TABLA IV, se muestran los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de macrófagos adherentes y otras células (polimorfonucleares y linfocitos), encontrados a las 3 y 24 horas de incubación. Se obtuvo un alto porcentaje de macrófagos adherentes en cultivos de 3 horas, sin embargo existieron algunos casos en los cuales las muestras de calostro mostraron contaminación con leucocitos polimorfonucleares (como se apreciará más adelante). Los cultivos con tiempos de incubación por 24 horas también presentaron un alto porcentaje de macrófagos, pero a diferen-



GRAFICA 1. DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE CELULAS EN MUESTRAS - DE CALOSTRO HUMANO. El calostro humano se diluyó 1:2 - con SBS y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos - a 4°C. El paquete celular obtenido se cuantificó en un hematocitómetro.

**TABLA IV. SEPARACION DE LAS CELULAS ADHERENTES DE LAS MUESTRAS
 DE CALOSTRO HUMANO A LAS 3 y 24 HORAS.**

PORCENTAJE DE CELULAS (%)		TIEMPO DE INCUBACION DE LAS CELULAS *					
		3 HORAS		24 HORAS			
%	MØs	% PMN	% L	% MØs	% PMN	% L	
PROMEDIO + d.s	74 + 5.53	17.9 + 5.9	8.1 + 2.66	82.8 + 2.26	11.4 ± 2.44	3.4 + 3.1	

6

* Las células de calostro humano se ajustaron a un número de 2×10^6 células/ml en medio de RPMI-1640 suplementado y se incubaron por 3 y 24 horas. En cada tiempo se cuantificaron las diferentes poblaciones celulares presentes (macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos). El promedio de los resultados esta representado por 10 muestras analizadas + la desviación estandar. MØs: Macrófagos; PMN: Leucocitos polimorfonucleares; L: Linfocitos; d.s: desviación estandar.

cia de los cultivos de 3 horas un porcentaje relativamente bajo de contaminación con leucocitos polimorfonucleares. De estos resultados podemos deducir - que el tiempo más adecuado para la purificación de macrófagos de calostro humano es el de 24 horas de adherencia.

3.- CUANTIFICACION DE CELULAS ADHERENTES A LOS DISCOS DE VIDRIO UTILIZADOS PARA EL SISTEMA DE CULTIVO " in vitro " DE LAS CELULAS.

Con el objeto de determinar que cantidad de células de calostro se adhieren al vidrio a las 3 y 24 horas de incubación se realizó este experimento. Los resultados se indican en la TABLA V, donde se puede observar que solamente un 50 % de las células de calostro añadidas se adhieren al vidrio. Se denota -- también que la adherencia y la viabilidad tienden a disminuir a las 24 horas - de incubación.

4.- CUENTA TOTAL Y DIFERENCIAL DE CELULAS EN MUESTRAS DE CALOSTRO - HUMANO.

Los resultados obtenidos se presentan en la TABLA VI, en donde se puede observar que hay un marcado predominio de los macrófagos en las muestras de calostro analizadas, conforme a lo ya reportado en la literatura (76).

5.- CARACTERIZACION DE LAS CELULAS ADHERENTES OBTENIDAS DE CALOSTRO HUMANO.

Con el afán de caracterizar las células adherentes obtenidas de calostro humano como células macrofágicas se usaron dos criterios:

a).- Microscopía óptica: En la TABLA VII se pueden observar los porcentajes de macrófagos identificados por morfología en microscopía óptica, para--

TABLA V. CUANTIFICACION DE CELULAS ADHERENTES A LOS DISCOS DE VIDRIO UTILIZADOS PARA EL SISTEMA DE CULTIVO "In vitro" DE LAS CELULAS.

No. DE EXPERIMENTOS	TIEMPO DE INCUBACION		DE LAS CELULAS *	
	3 HORAS		24 HORAS	
	No. de Células/ml	Viabilidad (%)	No. de Células/ml	Viabilidad (%)
I	1.5×10^6	90	1×10^6	85
II	1.6×10^6	85	1.2×10^6	82
III	1.0×10^6	80	0.8×10^6	79
IV	1.4×10^6	80	1.1×10^6	75
Promedio \pm d.s.	$1.375 \times 10^6 \pm 0.22$	83.75 ± 4.08	$1.02 \times 10^6 \pm 0.147$	80.5 ± 3.69

* Las células de calostro humano se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI-1640. Estas células fueron depositadas en discos de vidrio estériles; se cuantificó en número de células adherentes y no adherentes en un hematocritómetro, determinándose su viabilidad por método de exclusión de azul de tripan. Los resultados son un promedio de 4 experimentos + la desviación estándar (d.s).

TABLA VI. CUENTA TOTAL Y DIFERENCIAL EN MUESTRAS DE CALOSTRO HUMANO

MUESTRAS	CELULAS x 10 ⁶ /ml	% PMN	% L	% MØs
1	2.25	45	8	47
2	2.2	35	5	60
3	2.65	32	4	64
4	2.2	41	3	56
5	2.22	20	4	76
6	1.7	22	5	73
7	1.0	45	7	48
8	0.85	50	6	44
9	0.55	35	8	57
10	2.7	27	2	71
	1.832 ± 1.5	35.2 ± 10.15	5.2 ± 6.13	59.6 ± 11.32

*

Las células se obtuvieron de calostro por dilución de la muestra 1:2 con SBS y fue centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El paquete celular fue lavado dos veces con SBS y las células se resuspendieron en 10 ml de SBS y se cuantificaron en un hematocitómetro. Se realizó una cuenta diferencial por frotis teñido por la técnica de Wright.

MØs: Macrófagos; PMN: Polimorfonucleares; L; Linfocitos.

tiempos de 3 y 24 horas. Dentro de las características morfológicas que se tomaron en cuenta para estas células fueron las ya reportadas por otros autores (77), como es la forma irregular de su núcleo así como de su tamaño y un citoplasma altamente vacuolizado, con numerosos materiales granulares. Estos aspectos morfológicos se representan en las FIGURAS 1 y 2, bajo las diferentes condiciones de cultivo de las células 3 y 24 horas.

b).- Microscopía electrónica: Los estudios en microscopía electrónica de las células obtenidas se representan en las FIGURAS 3 y 4. Estas células se consideraron como macrofágicas por la presencia de estructuras típicas como su núcleo central perfectamente definido, citoplasma abundante, presencia de heterocromatina, así como la presencia de pseudopodos y granulaciones. En estos estudios se observaron numerosos materiales granulares y presencia de numerosos glóbulos de grasa.

c).- Pruebas citoquímicas

c.1).- Determinación enzimática de esterasa no específica: Dentro de la TABLA VIII, se pueden observar los resultados obtenidos en la determinación de esta enzima; los porcentajes más bajos se obtuvieron de células adherentes que incubaron por 24 horas.

c.2).- Determinación enzimática de mieloperoxidasa; - Con la finalidad de determinar el porcentaje de polimorfonucleares se analizó la presencia de mieloperoxidasa en células de calostro humano. Los resultados indicaron un alto porcentaje de positividad en células adheridas por 3 horas a diferencia de 24 horas, como se puede apreciar dentro de la misma TABLA VIII.

Al establecer una comparación entre el porcentaje de macrófagos obtenidos con base a los criterios de evaluación: microscopía óptica y electrónica, así como de pruebas citoquímicas de las células mantenidas en incubación por-

TABLA VII. CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE LAS CELULAS ADHERENTES
 OBTENIDAS DE CALOSTRO HUMANO.

MUESTRAS	TIEMPO DE INCUBACION DE LAS CELULAS *					
	3 HORAS			24 HORAS		
	% MØs	% PMN	% L	% MØs	% PMN	% L
1	75	22	3	86	13	1
2	78	20	2	88	10	2
3	80	17	3	76	22	2
4	78	32	0	90	7	3
5	74	20	6	80	17	3
6	67	33	0	83	14	3
7	71	28	1	76	20	4
8	77	20	3	80	18	2
9	76	22	2	79	16	5
10	75	25	0	82	18	0
Promedio + d.s.	75.1 ± 3.78	23.9 ± 5.43	2 ± 1.74	82 ± 4.53	15.5 ± 4.49	2.5 ± 1.13

* Las células adherentes obtenidas de calostro humano por 3 y 24 horas de incubación--
 se lavaron dos veces con SBS y se fijaron con metanol al 70 % durante 10 minutos. -
 las células se tiñeron por la técnica de Wright y la determinación de porcentaje -
 de macrófagos se llevo a cabo por conteos de 100 y 200 células observadas al azar.
 MØs: Macrófagos; PMN: polimorfonucleares; L: Linfocitos.
 d.s: desviación estandar.

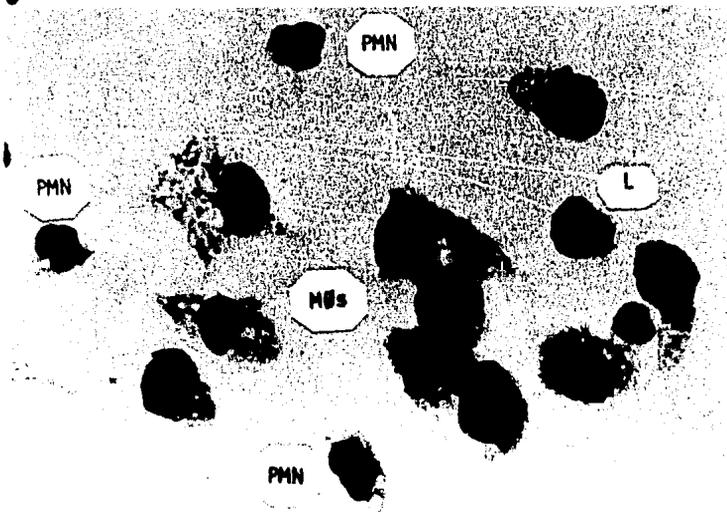


FIGURA 1. CELULAS ADHERENTES DE CALOSTRO OBTENIDOS EN 3 HORAS DE INCUBACION. Células de calostro humano en una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI-1640, se pusieron a adherir a discos de vidrio de 0.8 cm x 0.2 cm incubando 3 horas las células a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 5 %. Las células adheridas en este período se lavaron dos veces y se tiñeron por la técnica de Wright (100 x).
MΦs; macrófagos; PMN: Polimorfonucleares; L: Linfocitos.

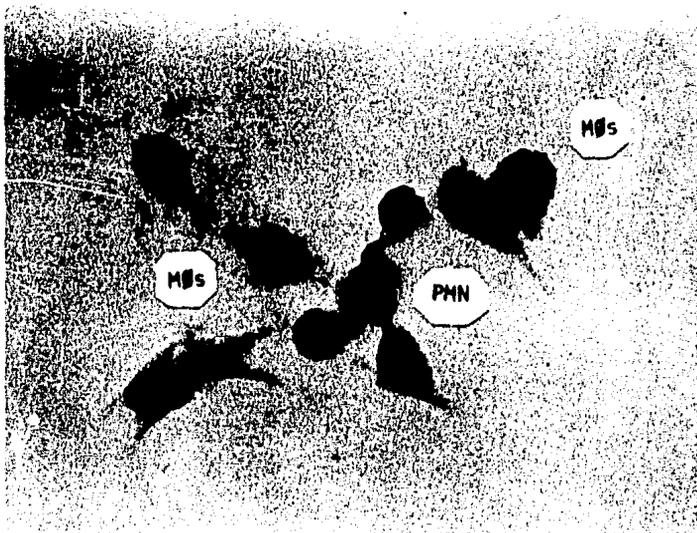


FIGURA 2. CELULAS ADHERENTES DE CALOSTRO OBTENIDAS EN 24 HORAS DE INCUBACION. Una suspensión de células - en una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 se adhirieron a discos de vidrio de 0.8 cm x 0.2 cm y las células adherentes después de 24 horas se lavaron y se tiñeron por la técnica de Wright (100 x).
MΦs: macrófagos; PMN: Polimorfonucleares; L: Linfocitos.



FIGURA 3.

MACROFAGOS DE CALOSTRO HUMANO CARACTERIZADOS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA. Células de calostro humano se adherieron a cajas petri por 3 horas; las células adherentes se desprendieron con un gendarme y el paquete celular obtenido se fijó con glutaraldehído al 3%. La muestra fue tratada para microscopía de transmisión.

PS: Pseudopodo; VG: vacuolas de grasa; Ht: heterocromatina; N: núcleo. (x 10,000).



FIGURA 4. MACROFAGOS DE CALOSTRO HUMANO CARACTERIZADOS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA. Células de calostro humano se adherieron en cajas petri por 24 horas; las células adherentes se desprendieron con un gendarme y se fijaron con glutaraldehído al 3 %. La muestra se trató para microscopía de transmisión. Son observados numerosos glóbulos de grasa y algunos organelos. (x 10,000).
N: Núcleo; Hc: heterocromatina; VG: vacuola de grasa; - PS: pseudopodos.

TABLA VIII. CARACTERIZACION CITOQUIMICA DE LAS CELULAS ADHERENTES OBTENIDAS DE CALOSTRO HUMANO.

MUESTRAS	TIEMPO		INCUBACION DE LAS CELULAS *	
	3 horas		24 horas	
	P R U E B A S		C I T O Q U I M I C A S	
	Positividad a esterasa no es pecífica. (%)	Positividad a mieloperoxidasa (%)	Positividad a esterasa no es pecífica. (%)	Positividad a mieloperoxidasa (%)
1	75	90	10	20
2	65	50	15	18
3	90	29	25	25
4	85	35	35	12
5	70	27	17	17
6	65	36	15	15
7	63	25	20	8
8	65	45	18	25
9	70	35	15	18
10	72	25	21	12
Promedio d.s.	72 + 9.05	39.7 + 18.72	17.1 + 6.88	16.6 * 4.72

* Las células obtenidas por adherencia a vidrio, como anteriormente se mencionó (material y métodos), se fijaron y se trataron con los sustratos correspondientes para la determinación de estas enzimas. Las lecturas se realizaron por conteos de 100 a 200 células observadas al azar. d.s: desviación estandar.

intervalos de 3 y 24 horas, el promedio de las evaluaciones indicaron que el cultivo por 24 horas representa una población rica en macrófagos, de alrededor del 82.15 % siendo un 17.85 % \pm 5 % en contaminación con otras células y que en cultivos de 3 horas se obtienen porcentajes más bajos alrededor del 70 % \pm 5 %, lo que un 30 % de contaminación con otras células.

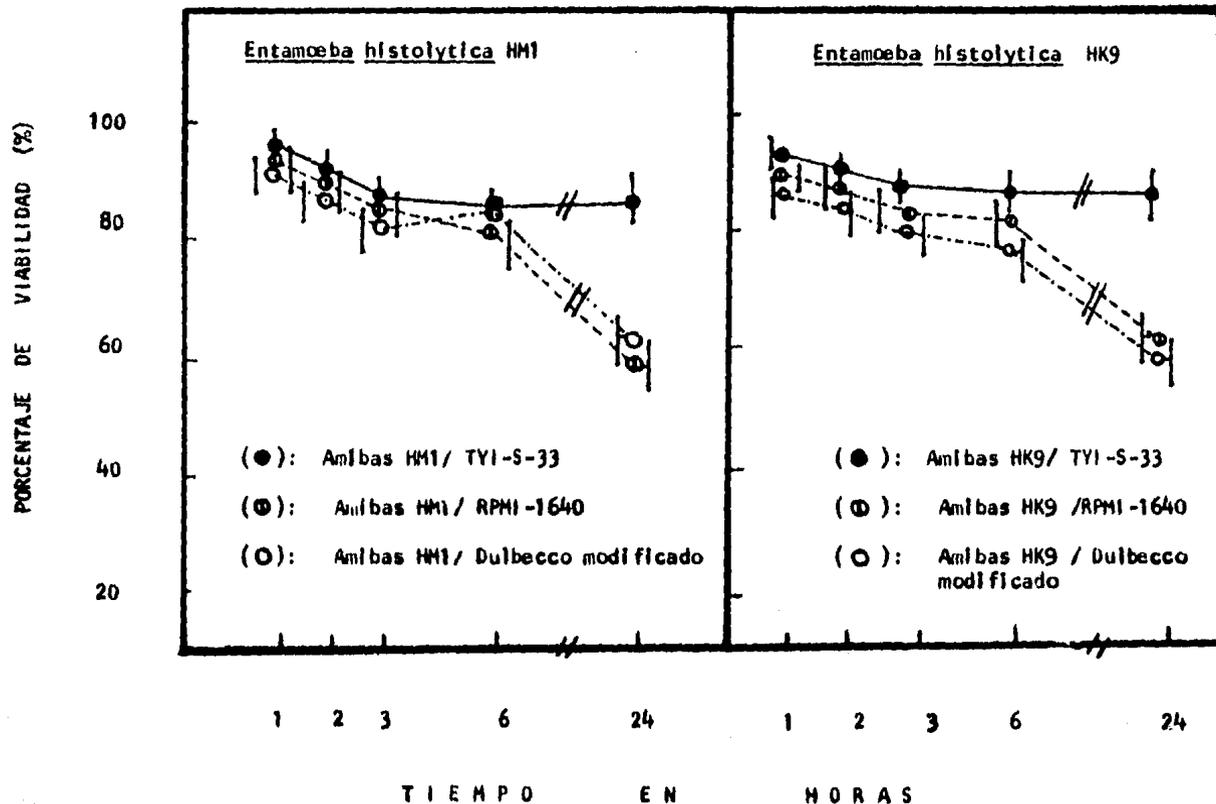
Con base a lo anterior se consideró recomendable procesar células adherentes después de periodos de incubación de 24 horas dado su alto contenido en macrófagos, establecido por los diferentes criterios que se llevaron a cabo.

6.- DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA EL SISTEMA DE INTERACCION MACROFAGO-AMIBA.

Este experimento permitió valorar la viabilidad tanto de los macrófagos como de las amibas en los diferentes medios, para llevar a cabo el desarrollo de la interacción. Los resultados son los siguientes:

a).- Determinación de la viabilidad de Entamoeba histolytica en diferentes medios: Los porcentajes de viabilidad de los trofozoitos de E. histolytica, se representan en la GRAFICA 2. Como se puede observar en ambas cepas de amiba HK9 y HM1, se mantiene la viabilidad muy semejante a la de los controles, hasta periodos de 6 horas, sin embargo la viabilidad desciende hasta casi un 60 % después de 24 horas, para el medio RPMI-1640 como para el medio de Dulbecco modificado. Estos medios no se consideraron adecuados para mantener la viabilidad de los trofozoitos de E. histolytica por largos periodos de tiempo.

b).- Determinación de la viabilidad de macrófagos en diferentes medios de cultivo: Los resultados de viabilidad de macrófagos se representan en la GRAFICA 3, donde se puede observar que la viabilidad se mantiene constante (entre un rango de 65 a 80 %), durante intervalos de 24 horas de incubación para



GRAFICA 2. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE Entamoeba histolytica CEPAS HM1 y HK9 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. Las amibas en una dosis de 7.5×10^6 trofozoítos/ml de medio de cultivo: TYI-S-33; RPMI-1640 y Dulbecco modificado, se incubaron en diferentes intervalos. La viabilidad se valoró en cada intervalo de incubación por el método de exclusión de azul de tripan. Cada punto representa un promedio de 4 experimentos.

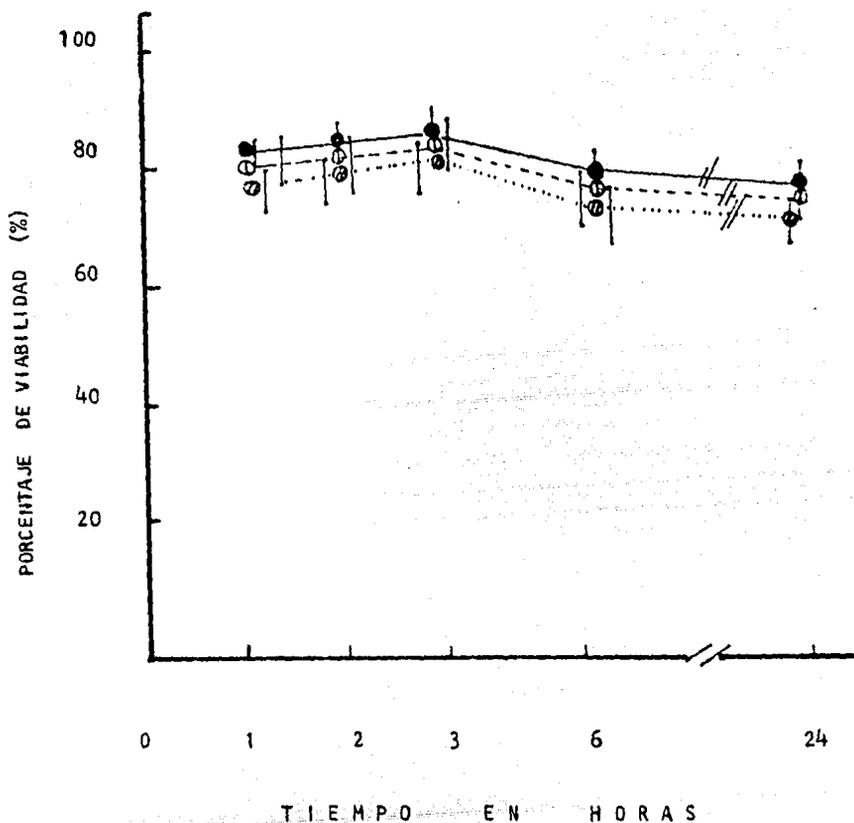
los medios ensayados, en comparación con los controles; sin embargo en el medio de TYI-S-33 donde se observaron desgranulaciones y lisis de las células en períodos de 3 horas.

Comparando estos resultados para establecer el medio de interacción más adecuado, se determinó que el medio RPMI-1640 era el más adecuado ya que mantiene la viabilidad de ambos elementos, teniendo en consideración que los tiempos de interacción serían cortos, ya que en períodos de incubación por 24 horas las amibas disminuyen su actividad y viabilidad; por lo que no se obtendrían resultados confiables de la interacción macrófago-amiba.

c).- DETERMINACION DE LA RELACION CELULA-PARASITO PARA EL SISTEMA DE INTERACCION MACROFAGO-AMIBA.

Este experimento se hizo con el fin de obtener una relación adecuada para la interacción macrófago-amiba de manera que el fenómeno se observará adecuadamente. Los resultados que se obtuvieron fueron: que a las relaciones más bajas de 50:1 y 100:1 macrófago/amiba se observaron bajo el microscopio óptico campos escasos que tuvieran amibas. Estas preparaciones presentaban aspectos semejantes al control de macrófagos (macrófagos solos), por lo cual se descartaron para los experimentos posteriores. En las relaciones de 30:1 y 25:1 se obtuvo un mejor equilibrio entre el número de amibas y macrófagos permitiendo una observación más clara del fenómeno de interacción macrófago-amiba en el sistema experimental en discos de vidrio. A las relaciones más altas de amibas 4:1 los campos fueron totalmente cubiertos por las amibas impidiendo una visualización clara y objetiva de la interacción.

Con base a lo anterior se determinó que la relación 30:1 macrófago-amiba era la más adecuada para llevar a cabo el modelo experimental de la interac---



GRAFICA 3. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. Los macrófagos en una concentración de 1×10^6 células/ml, se resuspendieron en diversos medios y la viabilidad se cuantificó en cada intervalo por método de exclusión de azul de tripán. Cada punto representa un promedio de 4 experimentos.
 (●): Macrófagos/RPMI-1640; (⊕): Macrófagos/Dulbecco modificado; (⊙): macrófagos/TYI-S-33.

ción entre estas células.

7.- GENETICA DE INTERACCION MACROFAGO- AMIBA.

Este experimento se planteo con la finalidad de investigar que efectos se presentaban en el contacto de dos células fagocíticas durante varios intervalos de incubación. En las FIGURAS 5 y 6 se observa la interacción, observándose un máximo de formación de rosetas entre los 15 y 30 minutos. Posteriormente ya no es posible apreciar este fenómeno (45 minutos, 1 y 3 horas), ya que el número de amibas tiende a disminuir notablemente.

El fenómeno de interacción de macrófagos y amibas solamente involucró --- una interacción a nivel de contacto (sobre la base de la formación de rosetas) ya que por el sistema utilizado no fue posible apreciar o medir eventos más detallados como pudo haber sido la fagocitosis. Un porcentaje bajo de, alrededor del 15 % de los macrófagos en contacto con las amibas formaron rosetas, esto puede indicar la existencia de poblaciones heterogeneas en los macrófagos obtenidos de calostro humano.

En lo que se refiere al comportamiento de las amibas en presencia de macrófagos se observaron fenómenos de endocitosis realizados por las amibas sobre el macrófago; es decir hubo emisión de pseudópodos e intento de fagocitosis durante casi todo el desarrollo de la interacción. Como ya se mencionó por el sistema in vitro llevado a cabo no pudo ser determinado si había fagocitosis de macrófagos por la amiba.

Con base a lo anterior, los parámetros evaluados en la interacción de macrófagos y amibas fueron los siguientes:

a).- Determinación del número de amibas que permanecen adheridas a macrófagos. En la GRAFICA 4 se observa una disminución progresiva en número de

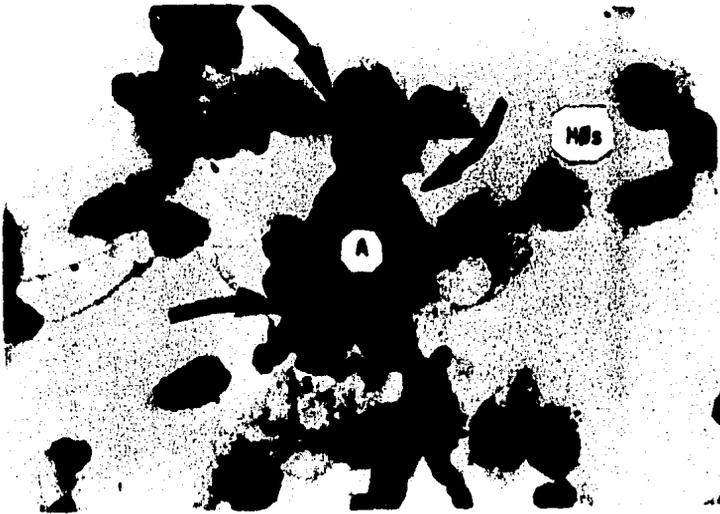


FIGURA 5. INTERACCION DE MACROFAGOS Y AMIBAS. Amibas y macrófagos-se incubaron en una relación 30:1 macrófago/amiba; en diferentes intervalos de incubación, las muestras se tiñeron por la técnica de Wright (100 x). Tiempo correspondiente a 15 minutos de interacción.

(↗): Endocitosis; (A): Amiba; (MΦs): Macrófagos.

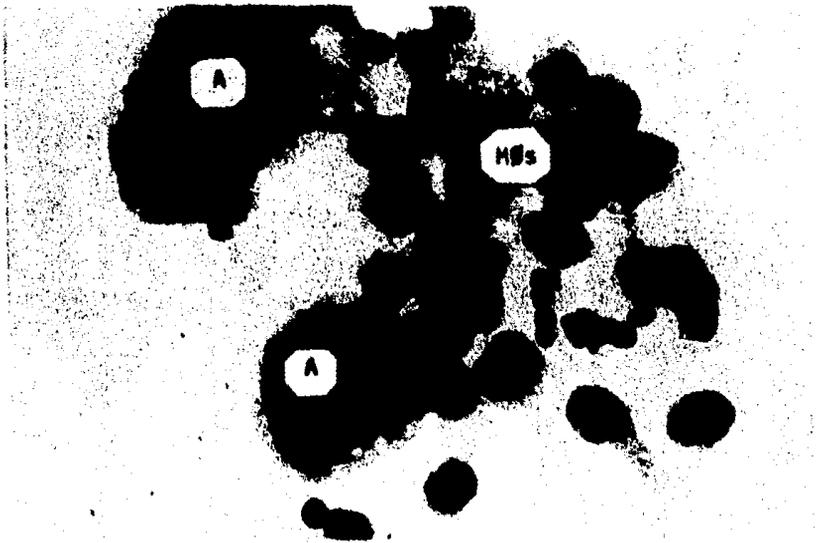


FIGURA 6. INTERACCION DE MACROFAGOS Y AMIBAS. Amibas y macrófagos se incubaron en una relación 30:1 macrófago/amiba en diferentes intervalos de incubación; las muestras se tiñeron por la técnica de Wright (100 x). Tiempo correspondiente a 30 minutos de interacción.

(A): Amiba; (MΦs): macrófagos.

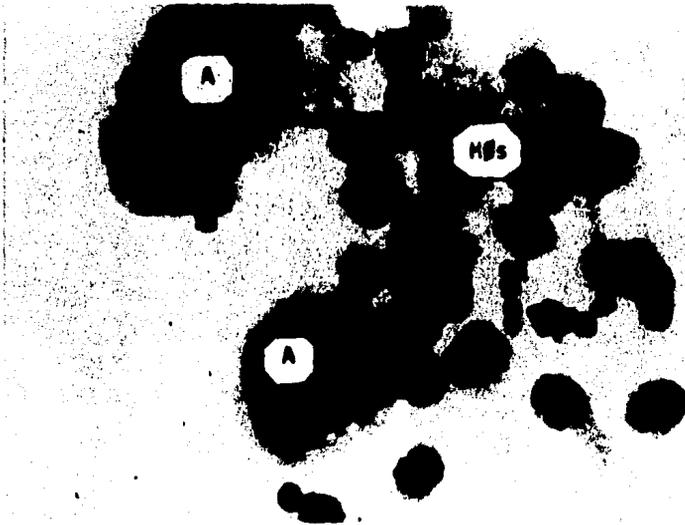


FIGURA 6. INTERACCION DE MACROFAGOS Y AMIBAS. Amibas y macrófagos se incubaron en una relación 30:1 macrófago/amiba en diferentes intervalos de incubación; las muestras se tiñeron por la técnica de Wright (100 x). Tiempo correspondiente a 30 minutos de interacción.

(A): Amiba; (MΦs): macrófagos.

trofozoitos durante el desarrollo de la interacción. A los 5 minutos de incubación no se observaron cantidades apreciables de amibas; detectandose que a los 15 minutos hay un incremento de la adherencia de las amibas que tiende a disminuir rápidamente en los tiempos posteriores de 30, 45, 60 y 180 minutos, en comparación con los testigos.

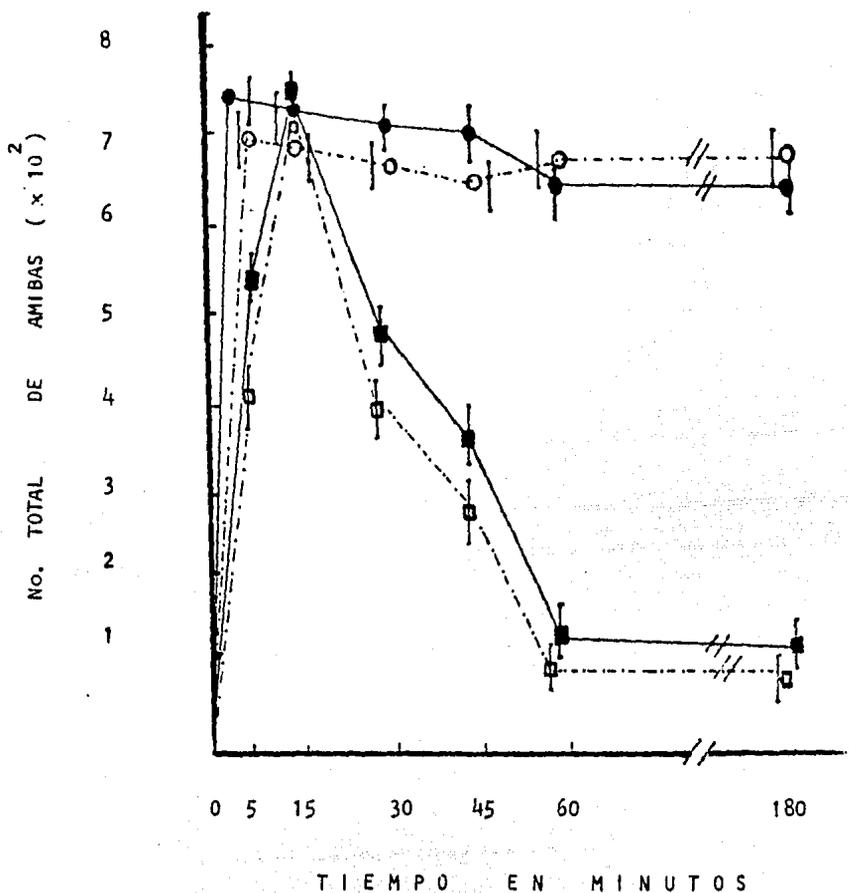
También se evaluó el número de macrófagos totales durante el transcurso de la interacción con la finalidad de comparar los cambios producidos en estas células y determinar los posibles efectos durante su enfrentamiento; no se obtuvieron grandes diferencias en el número de macrófagos con respecto a los testigos.

b).- Determinación de la viabilidad de macrófagos y amibas durante el desarrollo de la interacción macrófago-amiba.

Como se puede observar en la GRAFICA 5 hay una disminución en la viabilidad de las amibas conforme transcurre el tiempo, está se evaluó en un 25.58% con relación a los testigos. Estos resultados fueron analizados estadísticamente por aplicación de la prueba t de Student, siendo significativos ($p < 0.02$) en comparación con los testigos.

En la GRAFICA 6 se puede observar la viabilidad de macrófagos en presencia de amibas, se observó una disminución en la viabilidad de macrófagos, la cual se determinó en 10.3 % en comparación con los testigos; sin embargo a diferencia de la obtenida en las amibas esta disminución fue menor y los resultados no fueron estadísticamente significativos.

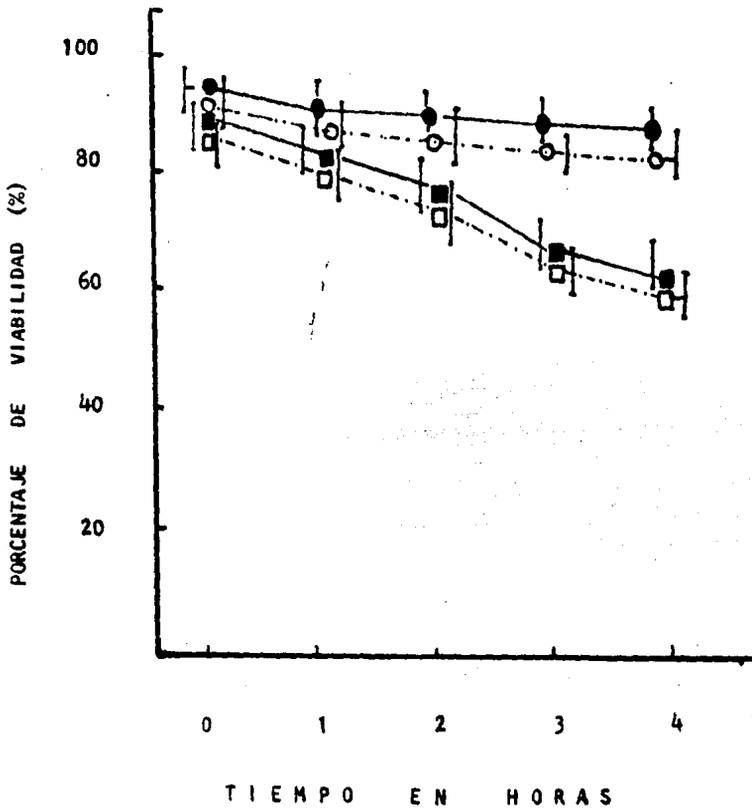
Por otra parte, con relación a la determinación de viabilidad y comportamiento de las dos cepas de amiba HK9 y HM1 no se establecieron diferencias en los resultados obtenidos.



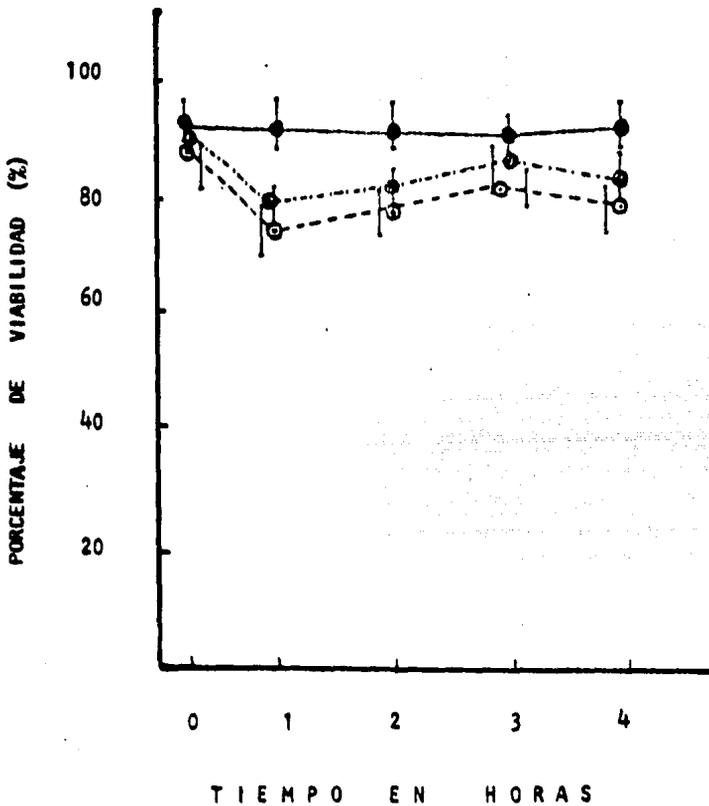
GRAFICA 4. DETERMINACION DEL NUMERO DE AMIBAS QUE PERMANECEN ADHERI-

CAS A MACROFAGOS. Amibas y macrofagos se incubaron en medio RPMI-1640 en un relación 30:1 macrofago/amiba. Las muestras se tiñeron por la técnica de Wright y el conteo se realizó al azar del número de amibas.

(■): Amibas HM1 + macrofagos; (□): Amibas HK9 + macrofagos; (●): Amibas HM1; (○): Amibas HK9.



GRAFICA 5. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE Entamoeba histolytica HK9 y HM1 EN PRESENCIA DE MACROFAGOS. Los trofozoitos de Entamoeba histolytica se adicionaron a macrófagos en una relación 30:1 macrófago/amiba. La viabilidad de las amibas se valoró por el método de exclusión de azul de tripán en un hematocitómetro.
 (●): Amibas HM1; (○): Amibas HK9; (■): Amibas - HM1 + macrófagos; (□): Amibas HK9 + macrófagos.



GRAFICA 6. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE MACROFAGOS EN PRESENCIA Entamoeba histolytica CEPAS HK9 y HM1. Trofozoítos de E. histolytica se adicionaron a macrófagos en una relación 30:1 macrófago/amiba, incubandose por diferentes intervalos. La viabilidad se cuantificó por método de exclusión de azul de tripán.

(●): Macrófagos/RPMI-1640; (●): Macrófagos + Amibas HM1; (○): Macrófagos + Amibas HK9.

V. DISCUSION.

Interesados en conocer el fenómeno de Interacción de macrófagos y amibas, con base a las evidencias que sugieren su participación en modelos animales, se planteó en la primera fase de este trabajo el estudiar macrófagos de calostro humano. Primeramente se determinó la cantidad de células totales encontradas en calostro humano, donde se obtuvo un promedio de 2.5×10^6 células/ml con un rango de 0 células/ml a 12×10^6 células/ml, de calostro este rango fue menor al establecido en otros estudios realizados en mujeres estadounidenses y europeas, donde es reportado un rango de 0.5×10^6 a 12×10^6 células/ml con un promedio de 3.1×10^6 células/ml de calostro (76,77). De las muestras analizadas solo un 38 % presentaban cantidades importantes de células, observándose gran variación en el contenido celular. Al respecto se menciona en ciertos estudios que estas variaciones pueden deberse a varios factores como: ausencia ó presencia de infecciones sistémicas, niveles hormonales, estado nutricional, estado de hidratación, estado emocional, administración de medicamentos y un probable estado subclínico de mastitis (78). En las muestras analizadas, la variación en la cantidad de células la atribuimos principalmente a factores de tipo nutricional y factores propios del hospedero como son el número de hijos y la edad. Se observó que en mujeres primíparas, casi siempre había ausencia de células y que conforme es mayor la edad (entre 35 y 40 años), el número de células tiende a disminuir progresivamente. Considerando la variabilidad en el número de células en las muestras de calostro se juzgó importante ajustar a un número constante de células utilizando un sistema de adherencia a discos de vidrio de 0.8 cm x 0.2 cm evitando el problema de la variación en la cantidad de células obtenidas en muestras de calostro humano.

Por otra parte, para la obtención de macrófagos de calostro humano en la mayoría de la literatura se reporta que para su separación, los tiempos óptimos de adherencia son de 3 y 2 horas de incubación (79). En nuestro estudio, este intervalo de adherencia, tuvo un elevado número de polimorfonucleares (23.9 %), por lo cual para la realización de este trabajo se manejaron tiempos de adherencia de 3 y 24 horas, con la finalidad de obtener una población más pura de macrófagos. Cabe señalar esta alta proporción en células polimorfonucleares en las muestras analizadas a las 3 horas de incubación (23.9 %) a diferencia de las identificadas en otros estudios 15 % (79). Posiblemente la causa de esto se deba a que, aunque se excluyeron en este estudio pacientes con signos clínicos de mastitis; no se descarta la posibilidad de la existencia de una infección subclínica que influya en el aumento de la producción de estas células. Incubando las células por periodos de 24 horas, la contaminación con células polimorfonucleares disminuyó a 17.85 % teniendo también el antecedente de que la vida media de una célula polimorfonuclear es más corta que la de una célula macrofágica, por tal motivo se trabajó este tiempo para los experimentos posteriores.

Fue de gran importancia también caracterizar las células adherentes de calostro humano para demostrar que la población purificada fueron macrófagos.

Se utilizó la caracterización ya establecida en otros estudios (80), en los que se indica que no se debe valorar la morfología, sino que es necesario evaluar y comparar con otros parámetros de tal manera que se determine un valor más representativo del porcentaje de células macrofágicas de calostro humano. En estos estudios se menciona que estas células de calostro humano presentan numerosos glóbulos de grasa, que en algunas ocasiones obstaculizan su identificación clara por morfología típica; estos aspectos tienen que ser considerados cuando se comparan con células obtenidas de otras fuentes.

Los parámetros de evaluación que se tomaron en cuenta para este trabajo fueron el tiempo de incubación, la morfología y la determinación de esterasa no específica y mieloperoxidasa.

Mediante la observación por microscopía óptica se obtuvo un porcentaje aceptable de macrófagos (82 %), en células adherentes por 24 horas. La morfología observada a nivel de microscopía electrónica sirvió de apoyo para la confirmación de la purificación macrofágica, aunque no se cuantificó el porcentaje en cultivos. de células obtenidas por 24 horas, se observó un mayor número de macrófagos. Estos resultados fueron correlacionados con los obtenidos en las pruebas citoquímicas.

Los resultados que se obtuvieron en la determinación de esterasa no específica a las 3 horas fueron porcentajes altos (72 %); sin embargo a las 24 horas este porcentaje de positividad disminuyó a 17.1 %. Estos resultados difieren con los obtenidos por criterio morfológico, sin embargo debe ser considerado que cuando se realiza una determinación citoquímica pueden interferir varios factores como: son las condiciones propias en el manejo de las células así como algunos componentes del medio de cultivo. Posiblemente estos resultados bajos en la determinación de esterasa no específica (90 a 95 %), reportados ya en la literatura (79), se deban a la inhibición de la enzima por el período largo de incubación de las células (24 horas), efecto ya observado en otros estudios (81).

Con respecto a la determinación de mieloperoxidasa los resultados fueron altos a las 3 horas (39.7 %) y bajos a las 24 horas (16.6 %). Esta enzima se encuentra localizada de forma más característica en células polimorfonucleares, lo cual permite de manera indirecta conocer el porcentaje de estas células en el cultivo. Estos resultados nos indicaron que existe un porcentaje relativamente bajo de polimorfonucleares a las 24 horas (16.6 %), evaluado median

te este criterio. Una observación con relación a esta enzima fue que a diferencia de la esterasa no específica su actividad es más estable, ya que es posible detectarla (aunque en porcentajes bajos) en periodos de 24 horas. Con base a las pruebas citoquímicas se cuantificó un 55.2 % correspondiente a macrófagos con una contaminación de 41.8 % en células polimorfonucleares y 3 % en linfocitos. Cabe mencionar que estos parámetros no son específicos y solamente sirven de apoyo para evaluar la caracterización de estas células, ya que existen otros parámetros de caracterización más específicos reportados en algunos trabajos-- (82,83), como es la identificación de anticuerpos monoclonales, liberación de IgA, marcadores de superficie determinado por inmunofluorescencia y citoquímica, así como la determinación de sus receptores característicos; sin embargo los parámetros llevados a cabo en este trabajo fueron de gran utilidad en la caracterización de estas células. Por balance de todos los criterios evaluados se-- encontró que las células separadas y purificadas de calostro humano por cultivos de 24 horas contenían aproximadamente 83 % de macrófagos, con 10 % de células polimorfonucleares y 8 % de linfocitos.

Conociendo las características de las células macrofágicas del calostro humano nos interesó conocer la actividad de las mismas frente a agentes infecciones como de Entamoeba histolytica, sin embargo se considero necesario establecer las condiciones óptimas tanto para amibas como para macrófagos. Este primer paso fue problemático ya que ambas células son susceptibles a cambios-- en diferentes medios, aun en lo referente a su medio original. Los resultados-- demuestran que el medio de cultivo celular RPMI-1640 suplementado es adecuado para la observación de la interacción de macrófagos y amibas; sin embargo es importante hacer destacar que la incubación de las amibas por 24 horas en el medio, este llega a ser tóxico. También es importante señalar que por esta razón se limitó el tiempo de interacción a 4 horas únicamente en donde la viabi-

lidad de ambas células es adecuada (80 a 90 %) de acuerdo a la evaluación realizada por método de exclusión de azul de tripán.

Para el caso del medio TYI-S-33 que es el medio de cultivo de las amibas no fue factible utilizarlo, ya que como lo demuestran los resultados se logró mantener la viabilidad de los macrófagos (75 a 79 %) hasta las 24 horas. Sin embargo se observó que las células después de 3 horas de incubación en este medio se desprendían de los discos (donde se mantenían adheridas), por lo que se dificultaba el contacto de macrófagos y amibas, siendo que uno de los objetivos era el establecer una interacción sobre un soporte (disco) y no en suspensión ya que en una superficie fija es más factible el contacto de ambas células. Además de que este modelo de interacción in vitro se acerca más a la realidad ya que las amibas al invadir un organismo, esta invasión la realizan en un medio formado de superficies celulares y no en suspensión. Por el mismo desprendimiento la relación célula-parásito no se mantenía estable; también se observó que las células posteriormente se degranulaban y se lisaban. Por estas razones se decidió que la interacción de macrófagos y amibas se realizará en el medio de RPMI-1640.

En cuanto a la determinación de la viabilidad en el proceso de interacción macrófago-amiba se ve una disminución en los trofozoitos del 25.58 % a diferencia de los macrófagos que mantiene una viabilidad del 75 a 80 %, la cual se determinó por el método de exclusión de azul de tripán; sin embargo estudios a nivel de microscopía electrónica confirmarían la muerte del parásito.

Es interesante hacer notar que no se valoró la lisis de la amiba por el macrófago, o la fagocitosis; solo la viabilidad, en la cual se observó una disminución. Esta disminución en la viabilidad podría explicarse por el hecho de que el macrófago se active y actúe en función de una célula secretora liberan-

do factores como el interferon, hidrolasas lisosomales, proteinasas, metabolitos de ácido araquidónico e intermediarios de oxígeno reactivo (84,85,86); estos últimos intervienen en la actividad de ciclos metabólicos de reacciones de oxidación sobre la cadena respiratoria en conjunción con los gránulos lisosomales de la célula. Estos factores pueden aumentar la capacidad microbicida de los macrófagos ya estudiado en otras infecciones parasitarias (87). Además existen evidencias de que los trofozoitos de E. histolytica son susceptibles a intermediarios de oxígeno reactivo (88); se puede sugerir que algunos de estos factores pueden estar involucrados en la disminución de la viabilidad observada en las amibas.

En la evaluación de la viabilidad se empleo el método de exclusión de azul de tripán, este ha sido utilizado en la determinación de la viabilidad desde hace mucho tiempo, ya que en células vivas el colorante puede ser excluido por micropinocitosis; no así en células donde la membrana esta dañada, sin embargo hay que tomar en consideración que esta prueba tiene varios inconvenientes; ya que se ha observado que algunas células no se tiñen completamente por lo que es difícil indicar si la célula está o no viva, este porcentaje de células puede interferir en el criterio de evaluación por lo que es importante evaluar también otros parámetros como sería la funcionalidad de la célula.

Otro hecho muy relacionado con la viabilidad es la adherencia de la amiba sobre el macrófago durante la cinética de interacción, esta adherencia se ve disminuida y puede ser explicada debido a que en el momento de la interacción del macrófago con la célula blanco este sea capaz de liberar mediadores y se ha mencionado que el macrófago de calostro humano puede liberar importantes cantidades de IgA (89); que podrían interferir con la adherencia del parásito, por la competencia de receptores de tipo oligosacáridos presentes.

Por otra parte, no hubo diferencias entre las cepas estudiadas de E. histolytica HK9 y HM1; es decir los efectos determinados (viabilidad y adherencia) no están relacionados con la virulencia de la amiba, aunque es factible que como estas cepas se mantienen por mucho tiempo en cultivo pierden su virulencia.

En varios estudios se considera que los macrófagos participan en la inducción de la respuesta inmune y como célula efectora de la inmunidad del hospedero, además se indican algunos efectos del macrófago sobre el control de amibiasis en animales de experimentación (90). Los estudios que se han venido realizando con la finalidad de demostrar la importancia del macrófago en la infección amibiana han sido apoyados en modelos in vitro y en animales de experimentación, estos estudios han sido realizados de manera indirecta ya sea depletando la población ó suprimiéndola por diferentes agentes como el sílice carbón activado, tinta china; para posteriormente medir la respuesta provocada por la inoculación con el antígeno amibiano.

La susceptibilidad o resistencia al desarrollo de abscesos hepáticos se estudió en ratones congénitamente atímicos (nu/nu) y ratones (nu/+) a los cuales se les administró sílice y posteriormente se les indujo el desarrollo de abscesos hepáticos mediante la inoculación intrahepática con trofozoitos de E. histolytica observando un incremento en la susceptibilidad lo que confirma que la resistencia a la amibiasis depende de los macrófagos y en menor grado de los linfocitos T (91).

En estudios que utilizaron un modelo de interacción con macrófagos peritoneales obtenidos de ratones de laboratorio, remarcan la importancia del macrófago en la infección causada por E. histolytica en una relación 100:1 macrófago/amiba (25). Estudios similares con macrófagos activados y normales de exuda

do peritoneal de ratones al ponerse en contacto con trofozoitos de E. histolytica en una relación de 250:1 macrófago/amiba se observó que son citotóxicos-- (92). También estudios utilizando macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y activando estas células por medio de linfoquinas y antígeno amibiano se demostró que los macrófagos en una relación de 10:1 macrófago/amiba matan al 67 % de los trofozoitos a las 3 horas y después de las 18 horas de contacto mueren un 97 %, observando también que 47 % de los macrófagos mueren (93).

Con base a los resultados obtenidos en este estudio se puede decir que se cubrieron solamente parte de los objetivos; principalmente en lo que se refiere a la primera fase de este trabajo (obtención y caracterización de macrófagos de calostro humano). En lo que respecta a la interacción macrófago-amiba, es importante mencionar que solo se pudo deducir un efecto de interferencia de estas células sobre la viabilidad de las amibas, sin embargo sería importante cuantificar aspectos más objetivos como sería actividades funcionales (fagocitosis y medición del efecto citotóxico, si es que lo hay), por medio del uso de marcadores específicos.

Para completar el estudio realizado en este trabajo sería importante también el determinar anticuerpos anti-amiba en las muestras de calostro con la finalidad de investigar si los macrófagos se encuentran activados y si estos son más eficaces para eliminar trofozoitos de Entamoeba histolytica.

Para finalizar es importante hacer destacar la trascendencia de la alimentación con calostro y leche materna en el recién nacido, ya que además de los ingredientes nutricionales son administrados anticuerpos, componentes celulares como macrófagos, y sustancias bactericidas ó inhibidores específicos que pueden intervenir en la probable respuesta inmune humoral y celular del recién nacido.

Con base a los estudios realizados en este trabajo es factible que los -

macrófagos esten implicados en la protección del recién nacido contra infecciones causadas por Entamoeba histolytica y sea un factor primordial al cual se deba la baja frecuencia de amibiasis en niños lactantes.

Por lo anteriormente mencionado y sobre la base de los antecedentes---
descritos, así como los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo si-
guiente:

V. CONCLUSIONES

- 1.- Los macrófagos de calostro humano in vitro interfieren con la via-
bilidad de los trofozoitos de Entamoeba histolytica.
- 2.- La interacción in vitro de macrófagos y amibas es un fenómeno
dosis-dependiente.
- 3.- En las interacciones de macrófagos y amibas realizados con--
los dos tipos de cepas HK9 y HM1, los efectos observados son
similares.
- 4.- Este modelo de interacción de macrófagos de calostro humano y
amibas sugiere una función importante (antiparasitaria) de los
macrófagos y su probable participación en la protección del -
reción nacido.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ADAMS, E.B. Mac. LEOD. (1977). Invasive amebiasis II. Amebic abscess and complications. Medicine. (Baltimore). 56:325.
- 2.- SEPULVEDA, B. (1982). Amebiasis host-pathogen biology. Rev. Infec. Dis. 4: 1247.
- 3.- GUTIERREZ, G., LUSLOW, A., ESPINOZA, G., HERRERA., MUÑOS, S., RUTTO NI, O., N. y SEPULVEDA B. (1976). Encuesta serológica Nacional. Investigación de anticuerpos en contra de E. histolytica en la República Mexicana. En: Conferencia Internacional sobre amebiasis. B. Sepulveda y L.S. Diamond. (Editores). I.M.S.S. Méx. p. 559.
- 4.- LEVINE, N.D. CBRLISS, S.O. COX. (1980). A newly revised classification of protozoa. J. Protozool. 27:37.
- 5.- KUDO, R.P. (1966). Protozoology Charles C. Thomas, Springfield Ill. (New York). p. 518.
- 6.- DUTCH, K. & LAMAN, V. (1964). An electromicroscopic study of E. histolytica (Rodhain). Exp. Cell. Res. 17:310.
- 7.- GONZALES-ANGULO, A., TREVIÑO, N., ZAVALA, B.S. y KABUR. (1965). Morfología de los trofozoítos de E. histolytica estudio en microscopio electrónico. Bol. Estud. Med. Biol. 23:169.
- 8.- SHAFFER J. G. SCATLAM, T.M. & IRALU, V. (1961). Observations on cells divisions of Entamoeba histolytica in culture. Amer. J. Trop. Med. 64:12.
- 9.- ARROYO-BEGOVICH, A., CARBEZ-TREJO., A. y RUIZ-HERRERO. J. (1972). Composición de la célula quística de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx). 3: (supl): 265.
- 10.- MARTINEZ PALOMO, A. (1982). The biology of Entamoeba histolytica.

Ed. John Willey, Sons. L.T.D. Lectchworth. Inglaterra. p. 115.

11.- WITTNER, M., and ROSEBAUM, R.M. (1970). Role of Bacteria in Modifying virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19:755.

12.- BRANDT, H. and TAMAYO, R.P. (1970). Pathology of human Amebiasis. Human Pathology. 1:351.

13.- COX, J.C., and NAIRN, R.C. (1974). Technical Method., Serodiagnosis by Immunofluorence with Lyophilized, Entamoeba. J. Clin. Pathol. 27:1018.

14.- CAPEL, B.J.A. (1975). The defined antigen substrate (DASS) system and some of this aplications. Annals. Y. Acad. Sci. 254:108.

15.- MADDISON, S.B, KAGAN, I.G. NORMAN, B. (1968). Reactivity of human - immunoglobulins in amebiasis. J. Immunology. 110:217.

16.- LEE. E., PALACIOS, O, KRETSCHMER. R. (1970). Localización del anticuerpo antiamebiano en las inmunoglobulinas del suero humano. Arch. Invest. Med. (Méx). 1 (Supl). s 101.

17.- ARELLANO, M.T. ORTIZ-ORTIZ, L. (1974). Algunas propiedades de la - globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amebiano. Arch. Invest. Med. (Méx). 5 (Supl). s-487

18.- SEPULVEDA, B. (1976). Inmunología de la Amibiasis. En. B. Sepulveda and L.S. Diamond (ed). Memorias de la conferencia Internacional sobre Amibiasis. I.M.S.S. México, p. 668.

19.- KRUPP, L.M. POWELL, S.J. (1971). Study of antibody response in - amebiasis persistence after succesful treatment. Am. J. Trop. Hyg. 20:491.

20.- ORTIZ-ORTIZ, L. CAPIN, N.R. SEPULVEDA, B. ZAMACONA, G. (1978). Activation of alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34:10.

21.- CAPIN, R. CAPIN, N., CARMONA, N., ORTIZ-ORTIZ, L. (1980). Efecto -

de la remoción del complemento sobre la inducción del absceso hepático en hamsters. Arch. Invest. Med. (Méx). 11 (supl) 5173.

22.- STOKES, C. R., SOOTHILL, J.F. TURNER, W.N. (1975). Immune exclusion in function of IgA. Nature. 225:745.

23.- KANTOR, F.S. (1975). Infection, anergy and cell mediated immunity - N. Engl. J. Med. 292: 745.

24.- GHARIDIAN, E., MEEROVITH. E. (1982). In vitro Amoebicidal Activity of Immune Cells. Infec. Immun. 36: 243.

25.- SALAS, E.C. (1979). Efecto citotóxico de los macrófagos sobre Entamoeba histolytica. Tesis de maestría. CINVEST- I.P.N.

26.- GHARIDIAN, E., and E. MEEROVITH. (1983). Role of macrophage host - defense against hepatic amoebiasis in the hamster. Infec. Immun. 42:1017.

27.- GHARIDIAN, E., and E. MEEROVITH. (1982). Macrophage requirement - for host hepatic amoebiasis in the hamster. Parasite. Immunol. (Oxf). 4:219.

28.- GHARIDIAN, E., and E. MEEROVITH. (1983). Passive transfer of - immunity against amoebiasis in the hamster. Parasite Immunol. (Oxf). 5:369.

29.- GHARIDIAN, E. and KONGSHAVN, L. (1984). Effect of Silica on Resis-- tance of Mice to Entamoeba histolytica infection. Infec. Immun. 45:399.

30.- LEVY., M.H. AND E.F. WERLOCK. (1969). Effect of intravenous sili- ca on immune functions of murine host. J. Immunol. 115: 41.

31.- FOMON, S.J., ZIEGLER, E.E., VAZQUEZ, D.H. (1977). Human Milk and Small Premature Infant. Am. J. Dis. Child. 131:463:

32.- JASSO, GUTIERREZ, L., FLORES, HUERTA, S. (1980). Amibiasis en el - recién nacido. peculiaridades e incógnitas. Arch. Invest. (Méx). 11 (Supl). 287.

33.- PITT, J. The milk mononuclear phagocyte (1979). Pediatrics. 64:745.

- 34.- AHLSTEDT, S., B. CARLSSON, L.A. HANSON & R.M. GOLDBLUM. (1975). Antibody production by human colostrum cells. I. Immunoglobulins class, specificity, and quantity. *Scand. J. Immunol.* 4: 535.
- 35.- OGRA, P.L. MARK, F. THEODORE, C. (1984). Inmunología de la leche---materna e Interacción madre e hijo. *Revista de Infectología. Vol. IV. No. 11.* pág. 281.
- 36.- PITTARD, B.W. (1979). Breast milk Immunology. *Am. J. Dis. Chil.* 133:83.
- 37.- DONNE, A. (1968). *Cours of microscope. Atlas. No. 1 (Bailliere; Parfs). p. 1844.*
- 38.- SMITH, C.W. and GOLDMAN. (1968). The cells of human colostrum I. In vitro studies of morphology and functions. *Pediatrics. Res.* 2:103.
- 39.- FISHAUT, M. THEODORE, C. and OGRA, P.L. (1978). In Immunology of GI tract. Editor, W.A. Strober Humana Press. Inc. Clifton, New Jersey p 25.
- 40.- MESTECKY, J.S.S. CRAGO, G.T. LAVEN, and J.R. Mc. GHEE (1981). Immunoglobulin-containing cells and non cellular elements in human colostrum. In *The Mucosal Immune System in Health and Disease. Edited by P.L. Ogra and J. Bienestock. 81 st Ross Conference on Pediatrics Reserch. Ross. Laborato---ries, Columbus, Ohio. p. 86.*
- 41.- PARMELY, M.J. and WILLIAMS, S.B. (1979). In Immunology of Breast - milk. Editors, P.L. Ogra and D.H. Dayton Raveri. Press, New York p 173.
- 42.- MURILLO, G.J. & GOLDMAN, A.S. (1970). The cells of colostrum II. Synthesis of IgA and B.C. *Pediatrics. Res.* 4:71.
- 43.- GEORGE. T. LAVEN, SYLVIA, S. CRAGO, WILLIAMS. H. KUTTEN, JIRI ME--TESCKY. (1981). Hemolytic plaque formation by cellular and no cellular ele---ments of colostrum. *J. Immunology.* 127: 5: 1967.

- 44.- JOHNSON, D.F., G.L. FRANCE, D.J. MARMER AND R.W. STEELE. (1980). Bactericidal mechanisms of human breast milk leucocytes. *Infect. Immun.* 28:314.
- 45.- MCRH, J.A. (1973). The posible induction and/or acquisition of celular hypersensitivity associated with ingestion of colostrum. *J. Pediatrics.* 82:1062.
- 46.- OGRA, S.S.D. WEINTRAUB. and P.L. OGRA. (1977). Immunologic aspects -- of human colostrum and milk III. Fate and adsorption of cellular and soluble-components in the gastrointestinal tract of the newborn. *J. Immunology.* 119: 245.
- 47.- WEAVER, E.A. TSUDA, R.M. GOLDBLUM, A.S. GOLDMAN, DAVIS, C.V. (1982). Relationship between phagocytosis and immunoglobulin A. Release from Colostral Macrophage. *Infect. Immun.* 38(3); 1073.
- 48.- ROBINSON, J.E. HARVEY., B.A.M., SOOTHILL and J.F. (1978). Phagocytosis and killing of bacteria and yeast by human milk cells after opsonization in aqueous phase milk. *Br. Med. J.* 1:1443.
- 49.- HO, P.C. and LAWTON, J.W.M. (1978). Phagocytosis and killing of *E. coli* and *C. albicans*. *J. Pediatr.* 93:918.
- 50.- A.K. LANCELLS. (1979). *Immunology of Ruminants*. Editor Csiro. Mc. (España). p. 491.
- 51.- PARMELY, M.S. and BEER, A.E. (1977). Colostral cells mediated immunity and the concept of common secretory immune system. *J. Dairy. Sci.* 60:665.
- 52.- MAYER. G. and KEIN.M. (1961). Histology and Citology of the mammary gland. In: *Milk: The Mammary Gland and its secretion*. S.K. and A.T. (Cowie). Editors Academic Prees, New. York and London. p. 47.
- 53.- GOLDBLUM, R.M. AHLSTEDT. S. CARLSSON, B. (1975). Antibody forming - cells in human colostrum after oral immunization. *Nature.* 252:797.

- 54.- ROUX, M.E., Mc. WILLIAMS, J. M. PHILLIPS-QUAGLIATA, P. WEISZ, CARRINGTON & M.E. LAM. (1977). Origin of IgA secretion plasma cells in the mammary gland. J. Exp. Med. 146:1311.
- 55.- HERD, V.D. HANSEN.H. (1977). Effects of colostrum on growth intestinal mucosa. Pediatrics. Res. 146:406.
- 56.- ROBERTS, S.A. FREED, D.L.H. (1977). Neonatal IgA secretion enhanced by breast feeding. Lancet. 2:1131.
- 57.- HANSON. L.A. AHLSTEDT, B. ANDERSON, J.R. CRUZ, U. DAHLGREN, S.P. FALLSTROM, O. PORRAS, C. SVANBORG. EDEN, T. SODERSTROM and B. WETTERGREN. (1984) The immune response of the mammary gland and its significance for the neonate. Ann. Aller. 53:576.
- 58.- HANSON, L.A. CARLSSON, B. ANDERSSON, B. DAULGREN, U.P. FALLSTROM, O. PORRAS, C. SVANBORG. EDEN, T. SODERSTROM, and B. WETTERGREN. (1980). The secretory IgA sytem in the neonatal period. Ciba. Found. Symp. 77:187.
- 59.- WEAVER, E.A. GOLDBLUM R.M. DAVIS, C.P. GOLDMAN. S.A. (1983). Enhanced immunoglobulin A. Release from colostrual cells during phagocytosis. Infect. Immun. 34: (2):496.
- 60.- PORTER, P., D.E. NOKAES & W.D. ALLEN. (1970). Secretory IgA and antibodies to Escherichia coli in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary tract of the young pig. Immunology. 18:245.
- 61.- HANSON, L.A. AHISTEDT, L. CARLSSON, B. (1985). Protective Factors in milk and the Development of Immune Sytem. Pediatrics. 75 (Supl):172.
- 62.- TEJERINA, J., JASSO, L. AUBANEL, M. GUTIERREZ, TRUJILLO G. (1973). Transmisión transplacentaria de anticuerpos contra E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx). 4 (Supl)1; 181.
- 63.- SVIRSCKY-GROOS, S. (1968). Pathogenic strains of E. coli (0:111)

among prematures and the use of human milk in controlling the out break of -
diarrhea. Ann. Pediatrics. 190:109.

64.- TASSOWATZ, B. KOTSICH, A. (1961). Human milk and its action of -
protection in the newborn. Ann. Pediatrics. 8:285.

65.- STOLIAR, O.A. PELLEY, R.P. KANIECK, GREEN. E. (1976). Secretary -
IgA against enterotoxins in breast milk. Lancet. 1:1258.

66.- HOLMGREN, J. HANSON. L.A. CARLSSON. B. (1976). Neutralizing antibo-
dies against Escherichia coli and Vibrio cholera enterotoxins in human milk
in developing country.Scand. J. Immunol. 5: 867.

67.- ACOSTA, G., COTE, V., ISIBASI, A. KUMATE, J. (1985). Anticuerpos
anti- Entamoeba histolytica de clase IgA en calostro de mujeres mexicanas.
Revista de Inmunología (España). 4:(1):24.

68.- AGUIRRE, ZARCO, M.P. (1985). Tesis de Licenciatura; Determinación de
anticuerpos de clase IgA contra LPS de Salmonella typhi en calostro y suero -
de madres en puerperio por analisis inmunoenzimatico. C.M.N. I.M.S.S.

69.- GUILLIN, F.D. REINER, D.S. (1983). Human milk kills parasite -
protozoa. Science. 221; (1):290.

70.- DONNA, R. MORGAN, HERBERTS, L. DUPONT, BERNARD, GOINK and STEVE -
KOHL. (1984). Cytotoxicity of human Peripheral Blood and Colostral leukocytes
Against Shigella Species. Infect. Immun. 46; (1); 25.

71.- MARTUSCELLI, A. y VILLA MICHAEL, M. (1969). Amibiasis intestinal-
aguda en los lactantes. Rev. Invest. Salud. Pub. 29:197.

72.- DIAMOND L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of E. histo-
lytica - like amebae. J. Parasitol. 54:1.047.

73.- LENNETE, E.H., E.H. SPULDING., TRUANT. J. P.(1981). Manual de Mi-
crobiología Clínica. Editores. Salvat. México. p. 958.

74.- KABAT, A. ELVEN., MANFRED, MAYER, M. *Inmunoquimica Experimental* (1980) Ed. Fornier. 2. Ed. Barcelona. p. 516.

75.- CRAGO, S.S., S.J. PRINCE, T.G. PRETLOW, J.R. MCGREE & METESCKY. (1979). Human colostrum cells I. Separation and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* 38:585.

76.- YAM, L.T., CROSBY, C.Y., W.H. (1971). Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Amer. J. Clin. Path.* 55:283.

77.- BLAU, H., PASSWELL, M. LERANON. J. DAVISON, I. KOHEN, and B. RAMOT. (1983). Studies on human milk macrophages: effect of activation on phagocytosis and secretion on prostaglandin E₂ and isozyme. *Pediatr. Res.* 17:241.

78.- RAMADAN, M.S., SALAH, M.M., EID. S. Z. (1972). The effect of breast infection on the composition of human milk. *J. Reprod. Med.* 9:84.

79.- XANTHOU, M, MANDYLA, H, (1982). Antibody Dependent Cytotoxicity of Human colostrum Phagocyte. *Pediatr. Res.* 16:

80.- SMITH, CW. and GOLDMAN, A.S. (1977). Macrophages from colostrum. *Exp. Cells. Res.* 66:317.

81.- SCHAMLZL, F & BRAUMSTEINER, H. (1970). The cytochemistry of monocytes macrophages. *Ser. Haemat* 111. 93.

82.- COBIAN LEYVA, F. and J. CLEMENTE. (1984). Phenotypic characterization and functional activity of human milk macrophages. *Immunol. Letters.* 8: 249.

83.- RAO, G.R. RAWIS, W.E. PEREY, D.Y. E., TOMPKINS, W.A. (1980). Macrophage microbicidal activity. Correlation between Phagocytosis-associated Oxidative Metabolites and Killing of *Candida* by Macrophages. *J. Exp. Med.* 152: 85.

84.- OGRA, S.S. and OGRA.P.L. (1979). In *Immunology of Breast milk.*

Editors. P.L. and D.H. Ravasi, New York p. 185.

85.- CUMMING, P. NANCY., R. MARIANNE., NEIFERT, MICHAEL, J. PABST and B. RICHARD D and JOHNSTON. (1985). Oxidative metabolic response and microbicidal activity of human milk macrophages: Effect of Lipopolysaccharide and Muramyl Dipptide. *Inf. Immun.* 49:435.

86.- NATHAN, CARL., NOGUEIRA, CHAWANEE., JUAN GBHANNICH, JOAN, ELIS and -- ZANVIL, COHN. (1979). Activation of macrophage in vitro and vivo. Correlations between Hydrogen Peroxide Release and Killing of Trypanosoma cruzi. *J. Exp. Med.* 149:1056.

87.- PEARSON, D. RICHARD., SULLIVAN, A. JAMES., DENISE, ROBERTS, ROSEANN, ROMITO and MANDELL GERALD, L. (1983). Interaction of Leishmania donovani Promastigotes with Human Phagocytes. *Infect. Immun.* 40:411.

88.- MASATAKA, SASADA, and RICHARD, B. JOHNSON, J. (1981).

Suceptibility of Entamoeba histolytica to oxygen intermediates. *Mol. Bioch Paras.* 3:381.

89.- PITTARD, A.B. POLMAR, S.H. FANAROFF, A.J. (1977). The milk macrophage A potencial vehicle for immunoglobulin transport. *J. Reticuloendothel. Soc. Res.* 76:674.

90.- GHARIDIAN, E., E. MEEROVITH. (1982). Monocyte Function amoebiasis. *Indian. J. Med. Res.* 76:674.

91.- STERN, B.J. GRAYBILL, J.R. DRUTZ, D.J. (1984). Murine amebiasis: The role of macrophage in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 33: 372

92.- NOYOLA, G. FERNANDO. (1984). Efecto citotoxico de los macrófagos activados sobre Entamoeba histolytica. Tesis de Maestria CINVESTAT. I.P.N.

93.- SALATA, R. PEARSON, R.D. MURPHY, C.F. RAUVIN. (1983). The interaction of Entamoeba histolytica with human immune cells: killing of virulent amebae

by macrophage (Abstract). Clinical Research. 31:374 A