

302927



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
INCORPORADA A LA UNAM.

EFFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE
MONOCITOS (FILM) PRODUCIDO POR *Entamoeba histolytica* SOBRE
LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN MACRÓFAGOS
HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO EN

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ERIKA NAYELLI LEANDRO ZARAGOZA

ASESORES: DRA. GUADALUPE RICO ROSILLO
DR. GUILLERMO DEL REY PINEDA

MEXICO. D. F.

2000

276648



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional CMN S-XXI. Bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Rico Rosillo esta investigación fue financiada por CONACYT (3206-9607).

DEDICATORIA

➤ Quiero agradecerte Dios Mío por tu amor infinito, ya que me has brindado la confianza y fortaleza para alcanzar una de mis grandes metas en esta etapa de mi vida, así como el haber puesto en mi camino a personas tan importantes y apreciadas que hicieron posible el que yo pudiera terminar este trabajo.

También expresar mi más sincero cariño y gratitud por sus consejos, enseñanza y sobre todo la paciencia en la elaboración de esta tesis especialmente a la Dra. Guadalupe Rico Rosillo y al Dr. Roberto Kretschmer por haberme permitido realizar mi trabajo experimental.

Agradezco también a todo el personal de laboratorio de la Unidad de Investigación de Inmunología por haberme orientado en el equipo de computo por el apoyo recibido en conocimiento y por brindarme su amistad.

GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

- A toda mi familia que ha contribuido en mi formación profesional e hicieron posible la realización de mi meta y por el espíritu de unión que ha existido siempre y por el apoyo incondicional y moral especialmente a mis Padres. ¡ Los Amo Mucho!.

- A todos los profesores que contribuyeron en mi formación profesional, El Dr. *Guillermo del Rey Pineda asesor de tesis* y a los *Jurados por ser nuestros guías*.

- A todo mis compañeros de licenciatura con los cuales pasé los mejores momentos de estudiante.

- A todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis.

ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
BCG	Bacilo Calmette Guérin
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
FILM	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos
FM	Fagocitos mononucleares
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GalNAc	N-acetil Galactosamina
IR	Índice de refracción
rhIFN-γ	Interferon gama recombinante humano
LPS	Lipopolisacárido
MIF	Factor inhibidor de macrófagos
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenindinucleótido
NO	Óxido Nítrico
NO$_2$	Nitritos
NO$_3$	Nitratos
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa Inducible
eNOS	Óxido Nítrico Sintetasa Constitutiva
PMNeos	Polimorfonucleares eosinófilos
PMNn	Polimorfonucleares neutrófilos
PMA	Phorbol 12-Myristate 13- Acetate

ÍNDICE

	Pag
RESUMEN	1
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	3
Historia	4
Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	12
Trofozoíto	12
Quiste	14
Ciclo de vida	16
Epidemiología	17
Amibiasis	19
Amibiasis intestinal	19
Absceso hepático	20
Inmunidad	20
Inmunidad humoral	21
Inmunidad celular	22
Interacción in vitro entre las amibas y las células inflamatorias	23
Óxido nítrico (NO)	34
CAPÍTULO II OBJETIVO E HIPÓTESIS	37
CAPÍTULO III ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	39
CAPÍTULO IV MATERIAL Y MÉTODO	41
Obtención del FILM	41
Preparación de células	41

RESUMEN

Los reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI; incluyendo óxido nítrico) recientemente han mostrado ser el principal agente lítico usado por macrófagos activados de roedores contra *E. histolytica in vitro* (Bose y col., 1995). En nuestro laboratorio hemos identificado un factor inhibidor de la locomoción de monocitos humanos (FILM), termoestable, de peso molecular pequeño (583 Da), producido por *E. histolytica* en cultivos axénicos, que literalmente cancela la producción de reactivos intermediarios de oxígeno (H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot O_2$) en polimorfonucleares (PMN) y fagocitos mononucleares (FM) sin dañar a las célula (Rico y col., 1992).

En el presente trabajo evaluamos el efecto del FILM o péptido sintético sobre la producción de RNI [(óxido nítrico (NO)] producido por macrófagos humanos, así como en una línea celular premonocítica U-937 activados con LPS, rhIFN- γ y rhTNF- α .

Los fagocitos mononucleares (FM) se obtuvieron de sangre periférica humana por el método de Böyum y se estimularon con rhIFN- γ (100u/pozo), rhTNF- α (1ng/pozo), LPS (10ng/pozo) así como con FILM ó su péptido sintético (10 μ g/pozo). La producción de NO se determinó en sobrenadantes de 24, 48 y 72 hrs mediante la reacción de Griess (Ding y col., 1988).

La producción de NO en macrófagos humanos tuvo un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) cuando se estimularon con rhIFN- γ (0.084-0.427 μ M) al compararse con las células en reposo. Cuando estas células fueron estimuladas con rhTNF- α la producción de NO fue (0.06-0.229 μ M). El FILM y el péptido sintético son capaces de inducir algo de NO por sí mismos. En algunos experimentos se utilizó la doble estimulación mediante LPS (lipopolisacárido de *E. coli* B4:0111) para detectar cantidades mayores de NO.

El FILM y el péptido sintético fueron capaces de inhibir la producción de NO aproximadamente en un 50% en macrófagos humanos así como en la línea celular premonocítica U-937.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

HISTORIA.

La amibiasis como una enfermedad ha existido, con toda la probabilidad, desde que el hombre empezó a poblar la corteza terrestre y, en sentido biológico evolutivo, el parásito debe habernos precedido por un largo periodo.

A pesar de que existen descripciones acerca de disenterías en escritos chinos, hebreos, griegos y hasta sánscritos, resulta difícil probar que correspondan a la enfermedad producida por la *Entamoeba*, ya que también pudieron haber sido causadas por otros agentes patógenos (Vaidya y col., 1982).

En 1828 el médico inglés James Annesley publicó una obra en dos volúmenes titulada *Investigaciones acerca de las causas, naturaleza y tratamiento de las enfermedades predominantes en la India*, donde describe la disentería hepática o la disentería complicada con absceso hepático, sin mostrarse seguro de si el absceso era la consecuencia de la disentería y dejaba entrever, incluso, la posibilidad de que la enfermedad intestinal tuviese como resultado final el absceso.

En 1846, un médico inglés al servicio del ejército indio publicó un libro en el que se encuentran observaciones detalladas de autopsias practicadas a personas fallecidas de amibiasis. En la mencionada publicación, el autor se refiere a la hepatitis primaria como la forma insidiosa supurativa, que hace su aparición en etapas avanzadas de la enfermedad como complicaciones de la disentería.

En 1856, el médico mexicano Miguel Jiménez publicó su libro "*Lecciones dadas en la escuela de medicina de México*," que trataba acerca de las clases impartidas por él en 1855, en cuyo texto, desde el comienzo puede leerse: "Tengo que dar una atención más esmerada y volver con frecuencia al examen de los abscesos del hígado por dos razones principales, la primera por ser enfermedad muy común en nuestro país, lo que hace que todos los años se multipliquen en nuestras salas las ocasiones para estudiarlos en todas sus circunstancias, y la segunda, por que no estando aún fijadas las reglas de su tratamiento no es preciso buscar en la cabecera del enfermo los medios para combatir una enfermedad tan mortífera".

La historia moderna de la amibiasis comenzó en el año 1875 cuando el médico ruso Fedor Aleksandrovich Lösch publicó en el *Virchows Archiv für Pathologisch Anatomie* un artículo titulado "Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso". Lösch se basó en el caso de un granjero ruso de 24 años el cual trató durante 6 meses hasta su muerte en abril de 1874. Se trataba de un caso típico de disentería amibiana con moco, sangre y numerosas amibas móviles con eritrocitos en su interior. Describió algunas características del núcleo y diferenció el ectoplasma del endoplasma incluso hace notar la disposición central del nucléolo (Martínez-Palomo, 1989).

Además del descubrimiento del agente casual y de la magistral descripción de la enfermedad, Lösch no se conformó sólo con ello, sino que intentó reproducir la disentería en forma experimental. Trato de reproducir la enfermedad en perros mediante la administración de materia fecal proveniente del paciente con amibiasis por vía tanto oral como rectal. Las inyecciones se aplicaron durante tres días consecutivos, pero, al parecer, sólo uno de cuatro animales desarrolló el padecimiento a los ocho días de la inoculación y en la necropsia 18 días después de la última inyección existían ulceraciones amibianas en el intestino. No obstante, Lösch siempre puso en duda que la amiba fuese el principal y único agente causal de la disentería, a pesar de que en sus observaciones establece claramente la relación entre cantidad de amibas y gravedad del padecimiento.

El investigador ruso denominó *Amoeba coli* a los parásitos descubiertos por él, por haberlos encontrado precisamente en el colon; Lösch consideró que las amibas habían prolongado la disentería pero que, con toda seguridad, no eran responsables de la misma, en virtud de las diferencias que existían entre las manifestaciones clínicas de su enfermo y las del perro infectado experimentalmente. En el primero, la enfermedad se manifestaba por fiebre y una gran repercusión general, en tanto que el animal de laboratorio sólo había desarrollado ligeros síntomas sin repercusión alguna.

En 1886, durante su estancia en Egipto, Robert Koch estudió cinco casos de disentería, dos de ellos complicados con absceso hepático. Este investigador no solamente encontró amibas en las ulceraciones colónicas, sino que además pudo observar que éstas se ubicaban en la profundidad de las ulceraciones intestinales y en los abscesos hepáticos, incluso llegó a encontrarlas en las paredes y en los

capilares. Fue el primero en mostrar al parásito en preparaciones con procedimientos tintoriales.

En 1886 Esteban Kartulis publicó sus observaciones en 150 pacientes egipcios con disentería, en los cuales demostró la presencia de amibas. No logró reproducir la enfermedad en forma experimental mediante inoculación en conejos o en conejillos de indias. Como consecuencia de la publicación de estas investigaciones se alargó aún más la polémica acerca de si la amiba era o no el agente causal de la disentería. No obstante, en 1887 la tenacidad científica de Kartulis lo llevó a continuar sus estudios y a demostrar la presencia de amibas en un grupo de 20 enfermos que padecían de lo que hasta entonces se conocía como absceso hepático tropical.

En tanto aparecían las publicaciones de Koch y Kartulis, Jaroslav Hlava, que trabajaba en Praga, informó haber encontrado también amibas, semejantes a las descritas en la literatura, en 60 casos de disentería; asimismo, informó que había inyectado por vía rectal heces contaminadas del paciente con el parásito, con lo que había logrado reproducir el padecimiento en dos de 17 perros. El artículo de Hlava apareció en checo y se presentó en forma de compendio en alemán, por el propio Kartulis, en 1887. Desafortunadamente, en dicho escrito se tomó la palabra *uplavaci*, que en checo significa en “disentería,” como el apellido del autor del artículo y como un hecho curioso, dicho error perduró en la literatura durante 50 años; así apareció en todas las citas bibliográficas hasta que, en 1938 el inglés Dobell aclaró la confusión (Stillwell, 1955).

En 1890 todavía nadie se atrevía a señalar a la amiba como agente patógeno. Ese mismo año William Osler observó el primer caso de absceso hepático en los Estados Unidos de América, en un médico de 29 años de edad que residía en Panamá. En dicho paciente se demostraron amibas en las materias fecales, pero el propio Osler dudó de la posible relación etiopatológica del parásito y en su escrito dice, textualmente: "no es posible hablar con certeza de una relación de causa- efecto en vista de que el parásito se ha llegado a demostrar en casos donde no existe lesión alguna". Si bien es cierto que la publicación de Osler no aportó un beneficio directo al conocimiento de la enfermedad, sí tuvo, indirectamente, un papel trascendente, toda vez que despertó el interés de un sin número de investigaciones por esta parasitosis, lo que propició la aparición de un nutrido grupo de publicaciones, algunas de las cuales resultaron fundamentales, como la de Simon, quien demostró por primera vez la presencia de amibas en el esputo de un paciente con absceso abierto a bronquios.

De todas estas investigaciones, la de más trascendencia fue la publicada por William Councilman, profesor asociado de patología de Johns Hopkins y Henry La Fleur, quienes reconocieron a la amibiasis como entidad patológica definida, ocasionada por un germen específico al que dieron el nombre de *Amoeba dysenteriae*. Tales autores consideraron que esta designación resultaba más adecuada que la de *Amoeba coli* introducida por Lösch. Además se debe mencionar que Councilman y La Fleur indicaron la posibilidad de que en un momento dado pudieran existir otras especies de amibas en el intestino grueso.

En 1893 se publicó en Europa otro hallazgo de gran importancia, fruto de los estudios de dos investigadores alemanes, Quincke y Ross que pusieron de

manifiesto la existencia de otra especie de amiba distinta de la patógena - hasta entonces conocida - cuyo citoplasma contenía en sus vacuolas material de desecho, pero que no podía fagocitar eritrocitos. Los autores llegaron a demostrar experimentalmente que dicha amiba no era capaz de producir lesiones. Esta especie corresponde a la que hoy conocemos como *Entamoeba coli*. Sin embargo, a pesar de todas estas investigaciones, la patogenicidad de la amiba no se encontraba igual de clara para todos los estudios del tema, y había quienes consideraban, incluso, que todas las especies del parásito que habitan el intestino son o pueden convertirse en patógenas. No fue sino hasta 1913, que se demostró mediante un estudio de experimentación en humanos voluntarios, que la inoculación de quistes de *Entamoeba dysenteriae* a unos y de *Entamoeba coli* a otros, ocasionaba la enfermedad a los primeros, en tanto que la contaminación resultaba inocua cuando se utilizaba la segunda especie. Otro hecho casi simultáneo con los anteriores, que vino a sorprender a los investigadores, fue el hallazgo de Shiga, en 1898, y confirmado dos años después por Flexner, de un nuevo agente causal en la producción de la disentería en el hombre.

Los estudios acerca de la *Entamoeba histolytica* llevaron a los investigadores a encontrar otras especies de amibas. De esta forma, Von Provozad descubrió la *Iodamoeba butschlii* y Hartmanni la *Entamoeba minuta*, considerada esta última durante muchos años como una subespecie de la *histolytica*. La *Endolimax nana* fue descrita por Wenyon y O' Connors en 1917, en tanto que el hallazgo de la *Entamoeba fragilis* fue hecho por Jeeps y Dobell en 1918, aunque los protozoólogos dudan en aceptar a esta última como una amiba. En 1913 Kuenen y Swellengrebel informaron que la *Entamoeba histolytica* tiene tres fases en su ciclo de vida: la invasora propiamente dicha, la comensal o minuta y la cística tetrágena.

En tanto existían aún ciertos grupos en querrela, unos discutiendo aspectos taxonómicos y otros el comensalismo de las especies amibianas, se continuaban realizando investigaciones transcendentales acerca del diagnóstico de la enfermedad. En 1938, Faust desarrolló la importante técnica del sulfato de cinc, con el propósito de concentrar las amibas en la materia fecal. Diez años más tarde, Ritchie introdujo la técnica de sedimentación con éter.

Los primeros intentos por cultivar la *Entamoeba histolytica* estuvieron a cargo de Musgrave Clegg en 1925, en medios con agar sangre que contenían una sola especie de bacterias. A pesar de éstos y otros intentos que a principios de siglo se hicieron para cultivar el protozoario, no fue sino hasta 1925 cuando Boeck y Drbohlav lo lograron en un medio donde la amiba se desarrollaba fácilmente, aunque en asociación con bacterias (Boeck y Drbohlav, 1925). Finalmente, Diamond logró producir medio axénico que ha permitido el desarrollo del parásito en cultivo libre de contaminación, hecho que ha favorecido notablemente los estudios experimentales y el mejor conocimiento de la *Entamoeba histolytica* (Diamond, 1961).

A pesar del descubrimiento de los procedimientos encaminados a la concentración del parásito en la materia fecal y de la introducción de técnicas de tinción destinadas a reconocer las diferentes especies de *Entamoeba*, el diagnóstico de la enfermedad amibiana llegaba a tener -y en ocasiones todavía es así- un alto grado de dificultad. Por ello, a partir de 1914 se introdujeron varias pruebas serológicas orientadas al diagnóstico de la amibiasis invasora. Izar encontró una reacción de fijación de complemento, mediante el empleo como antígeno de un extracto acuoso de heces que contenían el parásito. Más tarde, Craig utilizaría

extractos alcohólicos, en tanto Stone empleaba antígenos obtenidos del lavado de quistes (Thompson, 1968).

Uno de los problemas con los que aún se tropezaba entonces, era la presencia de bacterias que interferían con la producción de antígenos amibianos puros. En 1942, Rees logró un indudable progreso al encontrar una reacción de fijación de complemento con antígenos de *E. histolytica* cultivada en medio con una sola especie bacteriana. Finalmente, en 1970, Morris, Powell y Elsdon-Dew introdujeron la prueba de aglutinación del látex (Morris, 1970).

Todos estos estudios serológicos, destinados al diagnóstico de la amibiasis invasora, pusieron de manifiesto que los anticuerpos aparecen únicamente como resultado del contacto con la amiba, cuando ésta ha traspasado la pared intestinal y circula por el organismo del huésped. Los estudios resultan negativos cuando el parásito se encuentra confinado en la luz intestinal. Los anticuerpos, como apuntó Elsdon-Dew (1976), persisten durante largos periodos y producen reacciones positivas aún cuando la infestación activa haya dejado de existir (Sargeunt, 1978).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *E. histolytica*

E. histolytica pertenece a:

Especie. *histolytica*.

Genero. *Entamoeba*.

Familia: *Endamoebidae*.

Orden: *Amoebida*.

Subclase: *Gymnamoebia*.

Clase: *Lobosea*.

Superclase: *Rhizopoda*

Subphylum: *Sarcodina*.

Phylum: *Sarcomastigophora*.

(Martínez-Palomo y col., 1997)

La *E. histolytica* puede existir en dos formas: trofozoíto y quiste (Ravdin, 1995).

TROFOZOÍTO.

El Trofozoíto de *E. histolytica* tiene una forma muy variable, su contorno puede ser redondo, irregular o alargado, aerobio facultativo de 10-40 μm de diámetro, muy activo, pleomórfico, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son el citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias, aparato de Golgi, sistemas de lisosomas primarios y secundarios. Se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (Martínez- Palomo, 1987). Fig.1

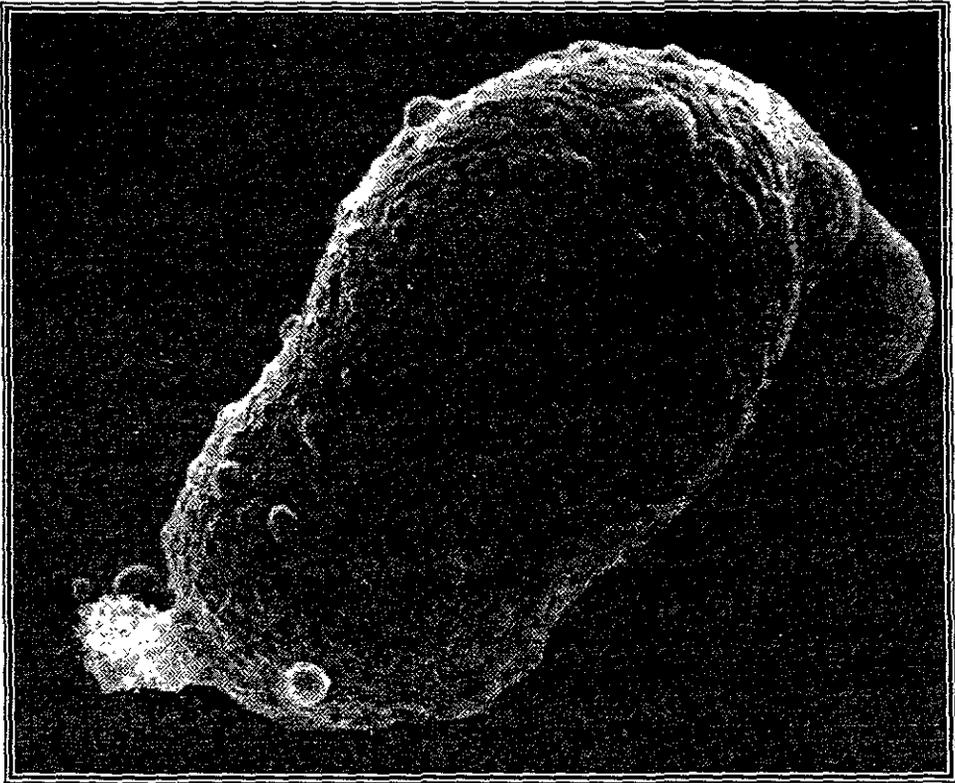


Figura 1 Trofozoito de *Entamoeba histolytica* (250X)

QUISTE.

Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas, de 8-20 μm de diámetro, los cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente, no son móviles y no emiten pseudópodos. Su citoplasma contiene vacuolas con glucógeno y cuerpos alargados oscuros muy refringentes, de extremos redondeados. El quiste inmaduro tiene un solo núcleo, de la tercera parte de su diámetro aproximadamente, mientras que el quiste maduro infectante posee cuatro núcleos más pequeños (Martínez-Palomo, 1989).

La pared de los quistes mide entre 125-150 nm de grosor y está compuesto por elementos fibrilares de 2 a 3 nm de diámetro, que forman una red compacta constituida a su vez de varias capas concéntricas. La principal característica estructural del quiste es la presencia de una capa de quitina que le confiere al parásito resistencia al medio ambiente y a la acción de los jugos gástricos a su paso por el estómago.

Los quistes son una forma de resistencia de la *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo (Chávez y col., 1978). Fig.2

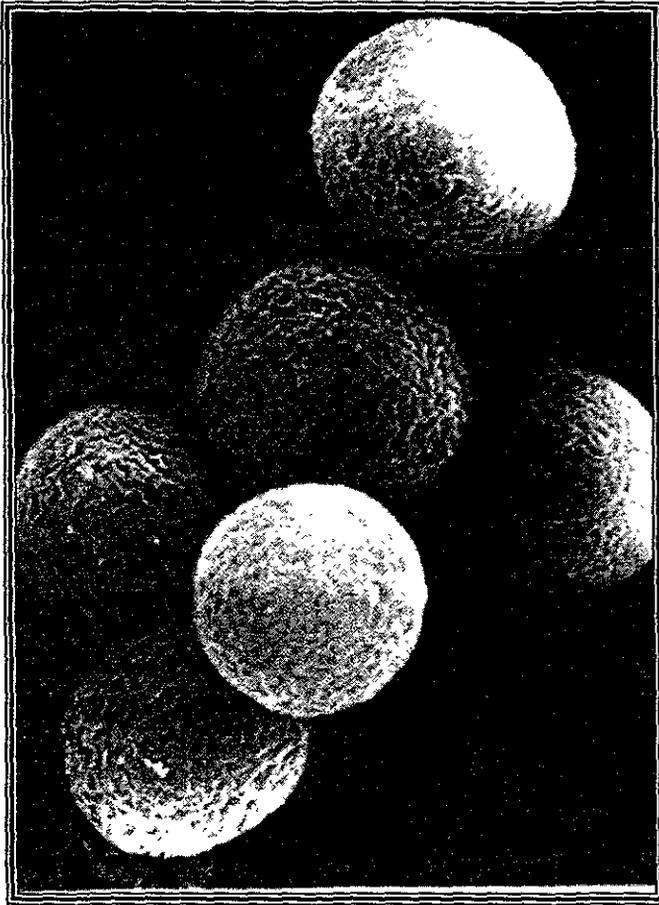
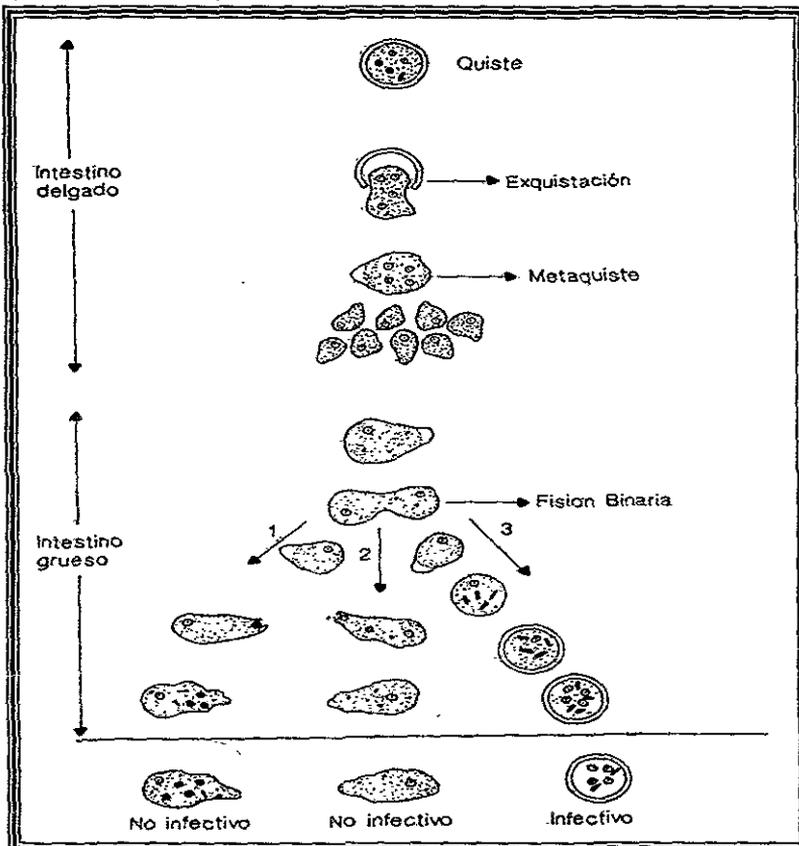


Figura 2. Quiste de *Entamoeba histolytica* (3880X)

CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente sencillo. La infección se inicia con la ingesta de quistes (los cuales son capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la exquistación, que consiste en la división del quiste cuadrinucleado que da origen a ocho núcleos, la división continúa y emergen ocho trofozoítos. Los trofozoítos van al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse completando el ciclo. (Ravdin, 1995). Fig.3



EPIDEMIOLOGÍA.

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita, generalmente asociada a países de condiciones socioeconómicas pobres, hábitos poco higiénicos y malnutrición. El parásito infecta a 500 millones de personas en todo el mundo excluyendo la población de China de las cuales sólo el 10 % resulta en casos de colitis amibiana o absceso hepático, provocando entre 40, 000 y 110,000 muertes en el mundo (Walsh, 1986). Tabla. 1

PREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA AMIBIASIS EN EL MUNDO 1984

CONTINENTE	INFECCIONES	ENFERMEDAD (Colitis y Absceso)	MUERTES
Norte y Sudamérica	95,000000	10,000000	10-30000
Asia	300,000000	20-30,000000	20-50000
Africa	85,000000	10,000000	10-30000
Europa	20,000000	100000	

Fuente: Walsh, J.A. Arch.Inv.Méd. (Méx) 1986;17 (suppl):385-389.

La amibiasis ocupa el tercer lugar a nivel mundial, como causa de muerte, entre las enfermedades parasitarias, superada únicamente por la malaria y esquistosomiasis (Walsh, 1986).

La amibiasis invasora es uno de los principales problemas de salud en ciertas regiones de Africa, Asia y América latina (Sepúlveda, 1979). En México, la amibiasis constituye un problema de salud pública, debido al número de enfermos que ocasiona, se estima que el 27% de la población esta infectada con el parásito y ocupa el quinto lugar como causa de muerte. (Gutiérrez, 1986; Gutiérrez 1987).

Estudios recientes han puesto de manifiesto dos diferentes especies de *Entamoeba* que son morfológicamente idénticas *E. dispar* originalmente descrita por Brumpt en 1925, que es la especie de portadores asintomáticos y *E. histolytica* que tiene la capacidad de invadir tejidos y causar enfermedad sintomática.

La existencia de estas dos especies fué sugerida por estudios mediante zimodemos (patrones de movilidad electroforética de isoenzimas de los parásitos) asociándolos con enfermedad sintomática invasiva (*E. histolytica*) o con portadores en estado asintomático (*E. dispar*).

Investigaciones subsecuentes sobre RNA y DNA indican claramente diferencias genéticas entre *E. dispar* y *E. histolytica*, también se demostró la existencia de diferencias antigénicas entre ambas cepas (Ravdin, 1995). Estudios serológicos en la ciudad de México indican que arriba del 9% de la población están infectados por *E. histolytica*. Altos niveles de infección amibiana los encontramos en la India, Sur y Oeste de África, lejano oriente y áreas de Sur y Centroamérica. La prevalencia de infecciones amibianas depende de hábitos culturales, edad, asinamiento, nivel de sanidad y estado socioeconómico (Caballero y col., 1994).

AMIBIASIS.

La organización mundial de la salud define a la amibiasis: “como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas” (WHO Bulletin, 1969). La amibiasis puede ser agrupada como: asintomática, sintomática sin evidencia demostrada de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular (Ortiz-Ortiz, 1994).

AMIBIASIS INTESTINAL.

Es la forma más frecuente de amibiasis, los síntomas de esta enfermedad son inespecíficos y de poco valor en estudios epidemiológicos, menos del 10% de los casos con amibiasis invasora intestinal resulta en infecciones mortales.

La amibiasis intestinal invasiva puede causar lesiones en el colon que van desde pequeñas y leves, hasta lesiones múltiples. La localización de las lesiones amibianas es cólica con predominio en el ciego y en el colon sigmoides, rara vez en el íleon y apéndice cecal. La mayoría de las lesiones se multiplican y se hacen más profundas. Las amibas pasan directamente a través de los tejidos pudiendo ser la causa de una perforación intestinal (Martínez-Báez, 1979).

ABSCESO HEPÁTICO.

El Absceso hepático amibiano (AHA) es una pequeña masa redonda u oval de células hepáticas pardo grisáceas. Al aumentar el tamaño, el centro se vuelve líquido, la pared se engrosa y el contenido se transforma en una masa viscosa de color rojizo, formada por células hepáticas autolizadas, glóbulos rojos, grasa y otros. El AHA puede ser único o múltiple, agudo ó crónico. Puede presentarse en cualquier edad, predominando en adultos entre 20 y 60 años; es 13 veces más frecuente en hombres que en mujeres y 10 veces más frecuente en adultos que en niños. El AHA se debe a la presencia de amibas en el hígado, las que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente inducen una pobre respuesta inflamatoria.

La amibiasis pulmonar aunque es menos frecuente ocupa el segundo lugar después del absceso hepático, se debe a invasión directa. El absceso pulmonar a menudo da origen a una infección bacteriana secundaria (Brown y Col., 1975).

INMUNIDAD.

El desarrollo de la enfermedad involucra varios factores tanto del huésped como de la amiba; del primero se ha considerado la susceptibilidad, el estado nutricional y la microflora intestinal. Por parte de la amiba, los mecanismos propios que utiliza para dañar la mucosa intestinal considerada como la primera barrera de defensa contra el parásito. Al ocurrir esta serie de eventos, entran en juego por parte

del huésped una serie de mecanismos humorales y celulares que son relevantes en la resistencia a la infección.

INMUNIDAD HUMORAL.

El curso de la respuesta inmune en la amibiasis intestinal se ha caracterizado por una respuesta local transitoria de tipo secretora, dada principalmente por el fenómeno de adherencia, colonización y en ciertos casos la penetración de las amibas virulentas a la mucosa intestinal, su migración a otros órganos con la subsecuente producción de anticuerpos a este nivel (Kretschmer y col., 1994). No se ha establecido con certeza el tiempo que transcurre entre la infección con la *E. histolytica* y la aparición de una respuesta local de anticuerpos. Se ha observado la presencia de coproanticuerpos en el 80 % de los pacientes con disentería amibiana (Martínez-Cairo y col., 1979), cuyos títulos disminuyen después de tres semanas hasta un 55%; por otra parte, se ha determinado que los anticuerpos séricos se incrementan significativamente, sin embargo, los títulos no correlacionan con la severidad de la enfermedad. Esto se ha visto de igual manera en individuos con antecedentes de absceso hepático amibiano, donde los títulos de anticuerpos permanecen elevados por un largo periodo aún después de curado el padecimiento.

Por otro lado el suero de individuos testigos e infectados (con altos títulos de anticuerpos) son capaces de lisar trofozoítos de cepas no virulentas *in vitro*, por la activación del complemento por sus dos vías, clásica y alterna. Las cepas virulentas de *E. histolytica* son resistentes a lisis mediada por complemento.

Existe una respuesta de IgA secretora contra la *E. histolytica* durante la amibiasis invasora como lo prueba la presencia de anticuerpos en el calostro y la saliva. Los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a la IgA secretora humana, lo que podría representar un mecanismo de defensa del parásito (Kelsall, 1993; Martínez-Palomo, 1997).

México ha sido considerado como una zona altamente endémica en donde se encuentran anticuerpos anti-*E. histolytica* en personas de todas las edades.

INMUNIDAD CELULAR.

La inmunidad celular parece desempeñar un papel protector en la amibiasis como lo sugiere la respuesta celular obtenida en los modelos animales, la depresión de estas respuestas resultó en un incremento de la invasividad y se comprobó que la protección por vacunación antes de la infección se debía a una respuesta inmune celular. Durante la amibiasis invasora aguda se suprime la respuesta inmune mediada por células específicas para la amiba, como lo demuestra la anergia a las pruebas cutáneas con el antígeno amibiano, pero se hace positiva durante la recuperación, lo mismo ocurre con la prueba de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) (Ortiz- Ortiz y col., 1975). Asimismo, se ha encontrado disminución en el número de linfocitos T de ayuda (CD4), aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8) y disminución en la respuesta proliferativa de linfocitos T a antígenos amibianos (Salata y col., 1986). La relación T4/T8 es menor en pacientes con AHA que en individuos sanos, pero una vez que se curan, los niveles de linfocitos T4 se restablecen, así como sus respuestas celulares contra *E.*

histolytica (Salata y col., 1986). Hámsters sensibilizados con antígeno amibiano desarrollan una respuesta inmune celular y al igual que los humanos con amibiasis invasora, son positivos en las pruebas serológicas.

INTERACCIÓN *IN VITRO* ENTRE LAS AMIBAS Y LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS.

La *E. histolytica* exhibe propiedades citolíticas potentes cuando entran en estrecho contacto con células *in vitro*. Esta característica constituye un recurso útil y confiable para valorar la virulencia de la cepa (Mártinez-Palomo, 1982). Como resumió Ravdin, la interacción de *E. histolytica* con células blanco eucarióticas sigue tres etapas esenciales, que son: *adherencia*, *citólisis* y al final *fagocitosis* (Guerrant y col., 1981). La adherencia está mediada por una lectina (adhesina) inhibitoria N-acetil Galactosamina (GalNAc), la adherencia también se puede inhibir por las citocalasinas B y D, así como por los bloqueadores de los canales de calcio bepridil y 8-dietilaminoacetal trimetoxibenzoato hidrocloreuro (TMB-8), lo que indica la necesidad del funcionamiento intacto de los microfilamentos amibianos del Ca^{++} intracelular libre (Ravdin J, 1986). En contraposición a los resultados obtenidos de los primeros estudios con la lectina de adherencia inhibitoria de citrotiosa, esta adhesina GalNAc inhibitoria parece estar relacionada con la virulencia amibiana. El efecto citoletal resultante constituye un fenómeno extracelular muy complejo; se trata de un mecanismo molecular que aún es motivo de cierta controversia. La destrucción de las células blanco adherentes también se puede inhibir por medio de las citocalasinas B y D, bloqueadores lentos de los canales de Ca^{++} y Na^+ (Verapamil y bepridil) lo que indica que los iones de Ca^{++} amibianos y la función de microfilamentos de las amibas son esenciales no sólo

para la adherencia sino también para destruir a las células blanco (Ravdin y Guerrant, 1982). Los efectores finales del proceso citolítico pueden inducir enzimas hidrolíticas y proteolíticas dependientes de temperatura y pH, secreción de citotoxinas, fosfolipasa A, proteincinasa C y la liberación de un discutible lisosoma activo de superficie, una sustancia citoletal aún no identificada (Mártinez-Palomo, 1986). La concurrencia de neutrófilos intensifica notablemente la destrucción amibiana de las células blanco *in vitro* a través de productos neutrofilicos no oxidativos liberados después de su propia destrucción. Por último, la fagocitosis de las células dañadas puede o no ocurrir, una propiedad amibiana que también se correlaciona con la virulencia de la cepa, ya que las clonas no fagocíticas de *E. histolytica* no tuvieron la capacidad de inducir absceso hepático amibiano (AHA) en animales de experimentación (Orozco y col., 1983).

La confrontación de *E. histolytica* con leucocitos, constituye uno de los encuentros más interesantes tanto para los inmunólogos como para los amebólogos, pues ambas células son enemigos equiparables en tamaño, forma y funciones básicas. Locomoción, quimiotaxis, adherencia, citólisis y fagocitosis se encuentran en la *E. histolytica* y en los leucocitos de manera similar (Kretschmer, 1986). Tal vez la interacción más importante sea la de *E. histolytica* con los fagocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de seres humanos y de otros mamíferos, que por lo común constituyen la primera línea de defensa de las células inflamatorias. Los primeros estudios *in vitro* revelaron que la confrontación de estas dos células, primero provocó la quimiotaxis de los neutrófilos hacia las amiba. Trabajos más recientes han mostrado que los trofozoítos amibianos completos, los homogeneizados amibianos, las fracciones de membrana plasmática y sus sobrenadantes resultaron ser factores quimiotácticos efectivos para los neutrófilos humanos (Salata y col., 1988). Por otra parte, ni la fracción soluble centrifugada de

un sonificado amibiano ni el líquido sobrenadante de *E. histolytica* intacta cultivada en medios axénicos, contiene quimiotaxinas detectables para los neutrófilos humanos (Kretschmer y col., 1985; Salata y col., 1988). La actividad de las quimiotaxinas neutrofilicas disminuye por efecto del tratamiento ácido y de la proteólisis y parece estar relacionada con la virulencia. Desafortunadamente, no hay información en cuanto a la quimiotaxis de las amibas hacia los neutrófilos o sus productos, aunque se ha mencionado quimiotaxis amibiana hacia el medio TYI-S-33 fresco, el complemento (C5a), las bacterias completas, el ácido N-acetil-neuramínico y los lisados de eritrocitos humanos. La respuesta quimiotáctica de las amibas se inhibe mediante citocalacina B y colchicina, a pesar de la carencia demostrable de microtúbulos citoplasmáticos en la *E. histolytica*, y aumentó inesperadamente mediante preincubación de amibas en suero inmune anti-amibiano o también en suero normal, una observación que justifica estudios posteriores (Rosenbaum y Wittner, 1987).

Después de que el neutrófilo se adhiere a la amiba virulenta extiende sus pseudópodos y los ancla con firmeza al parásito. Sin embargo uno o dos minutos después de este comienzo, la motilidad, la actividad de superficie y la apariencia general del leucocito empieza a cambiar dramáticamente; se inicia una desgranulación rápida y extensa que pronto convierte al leucocito en una vesícula inmóvil, redonda y casi vacía con sólo unos cuantos gránulos adheridos a su pared celular interna, que por algún motivo logra resistir la disolución durante más de siete horas. Después de este lapso, algunos de los neutrófilos muertos son fagocitados. Todos estos eventos ocurren bajo condiciones anaerobias estrictas, sin modulación cíclica de nucleótidos y, más importante todavía, sin pérdida alguna de la viabilidad amibiana (Ravdin y Guerrant, 1982). Ni siquiera 3000 neutrófilos por amiba virulenta, ni la presencia de anticuerpos anti-amibianos o del complemento en la

reacción impidieron que la amiba virulenta destruyera los leucocitos. En realidad, el suero inactivado por calor promueve la adherencia entre el neutrófilo y la amiba más que la adhesina inhibitoria GalNAc. Sólo cuando se utilizan cepas menos virulentas o de plano amibas no patógenas (*E. moshkovski*), o cuando las amibas virulentas se atenúan mediante un pretratamiento de emetina o de GalNAc, calor o envejecimiento, el neutrófilo es capaz de destruir a las amibas, y sólo si la proporción neutrófilo:amiba es superior a 200:1. Muy pocos neutrófilos se dirigen hacia las amibas atenuadas de dichos experimentos y la destrucción extracelular es independiente de anticuerpos y del complemento, es de carácter no oxidativo, ya que los neutrófilos de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica y los neutrófilos normales tratados con catalasa o superóxido dismutasa se desempeñan igualmente bien (Ravdin y Guerrant, 1982). Por lo anterior, parece ser que el neutrófilo, la célula fagocítica por excelencia, tan efectivamente sensible al auxilio opsónico de los anticuerpos y del complemento en otras circunstancias, constituye, a pesar de su inicio impresionante un efector celular defensivo sumamente inadecuado cuando se enfrenta a la *E. histolytica*. Debido a la incompetencia de los neutrófilos hacia la *E. histolytica*, no es de extrañar que los anticuerpos contra las amibas, los amplificadores naturales de la función neutrofilica, tengan tan pobre reputación en la defensa contra la amibiasis (Harries, 1982). Las amibas son resistentes y pueden incluso suprimir la función efectora más potente de los neutrófilos, es decir, la actividad oxidativa, mediante una fracción de proteína soluble que se descubrió que inhibe la quimioluminiscencia inducida por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) o cimosano (Salata y Ravdin, 1986). Los neutrófilos no sólo se sobreponen a las amibas si no que además contribuyen sustancialmente a producir daño al hospedero con su destrucción y liberación de elementos no oxidativos (esto es, proteasas neutras, catepsinas, lisozima etc), como lo sugieren estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. (Salata y Ravdin, 1986). De algún modo, las amibas logran resistir incluso los efectos potencialmente dañinos de

dichos gránulos neutrófilicos no oxidativos, a través de mecanismos que aún se desconocen. A los eosinófilos normales humanos confrontados *in vitro* con amibas virulentas, difícilmente les va mejor que a sus contrapartes neutrofilicos, incluso ante la presencia de anticuerpos antiamibianos y de complemento. Las amibas salen nuevamente ilesas de esta confrontación (López Osuna; Kretschmer, 1989). También se ha observado que los eosinófilos son víctimas de la fagocitosis por las amibas *in vivo*. Los eosinófilos activados con fMLP son capaces de destruir amibas virulentas. Por último, los basófilos de pacientes con absceso hepático amibiano son aproximadamente 100 veces más propensos a liberar su contenido histamínico después de la exposición al antígeno amibiano, en comparación con los basófilos testigos (Gil Recasens y col., 1984)

Hablemos ahora de la interacción entre la *E. histolytica* y los leucocitos efectores asociados a la inmunidad mediada por células, esto es, los linfocitos citolíticos y los FM (macrófagos y monocitos). Estas confrontaciones tienen un interés particular debido a todos los argumentos en favor de la existencia de inmunidad protectora, que en la amibiasis han ocasionado de algún modo un estado de inmunidad mediada por células (Kretschmer, 1986). Se afirma que la interacción *in vitro* entre las amibas virulentas y linfocitos de pacientes que se han recuperado del Absceso Hepático Amibiano culmina con la lisis de las amibas (Landa y col., 1976). Lo contrario ocurre cuando los linfocitos se obtienen de testigos normales o de pacientes que empezaban a padecer de AHA agudo. En estos estudios no se requirió del contacto entre las células y se argumentó que el sobrenadante de dichos linfocitos estimulados con antígenos amibianos es igualmente efectivo. Se han obtenido resultados semejantes al utilizar linfocitos, células peritoneales y células esplénicas de hámsters inoculados por vías intradérmica o intrahepática con amibas vivas (Ghadirian y Meerovitch 1982). El principal inconveniente de estos

estudios es que los linfocitos no están altamente purificados y la presencia de Fagocitos Monocleares aún cuando hayan sido poco cuantiosos, puedan explicar en forma apropiada estos resultados; los linfocitos proporcionaron esencialmente a las linfocinas armadoras. Además, un efecto linfocítico directo sería muy improbable, a menos que intervinieran células asesinas naturales (NK) (Orozco y col., 1983).

Recientemente, los linfocitos inmunes de fenotipo T8 expuestos al antígeno amibiano soluble y los linfocitos T no inmunes altamente purificados estimulados con fitohemaglutinina (PHA) antes y durante la interacción con las amibas, fue capaz de destruir a las amibas virulentas *in vitro*. De otro modo, todas las demás combinaciones (linfocitos inmunes no estimulados, insuficientemente estimulados o linfocitos no inmunes adecuadamente estimulados) mueren ante la actividad citolítica amibiana (Salata y col., 1987). También, se ha encontrado que los sobrenadantes de linfocitos estimulados inhiben la síntesis de proteínas amibiana en lugar de lisar las amibas. Por último, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), que resulta activa contra parásitos, no parece ser efectiva contra la *E. histolytica* (Wiedermann y col., 1984).

La interacción *in vitro* de *E. histolytica* virulenta y algunas versiones de Fagocitos Monocleares humanos normales no activados, culminan con la lisis de estas células independientemente de la presencia de suero y dependiente del contacto, sin daño en la viabilidad amibiana (Salata y col., 1985). El efecto citolítico de las amibas sobre los FM resistentes tuvo la mitad de intensidad en comparación con el efecto sobre las células PMN en la misma serie de experimentos. Esta menor susceptibilidad más de los FM a la citolisis amibiana permanece esencialmente sin explicación, pero puede reflejar la afinidad de unos cuantos macrófagos

inesperadamente activados para destruir algunos de los parásitos, o puede resultar por la disminución de los encuentros entre las células mononucleares y el parásito, originados por sustancias antiqumiotactinas producidas por las amibas. Nuevamente, el suero inmune anti-amibiano no logró que estos leucocitos invirtieran el efecto o incluso resistieran o disminuyeran la acción lítica de las amibas (Salata y col., 1985). Por otra parte, los macrófagos activados con lectina o linfocinas producidas por proteínas solubles amibianas, tuvieron la capacidad de destruir a las amibas en un proceso celular inmunológico no específico, dependiente del contacto y del tiempo pero independiente de suero, con una reducción concomitante de la viabilidad de los macrófagos. Los parásitos resultaron destruidos en proporciones entre macrófagos y amibas tan baja como 10:1 y la destrucción aumentó con incrementos iguales hasta llegar a ser superiores a 100:1. Estos índices son comparables a los que se requieren en la muerte de células tumorales por los macrófagos (Sharma y col., 1978). La adherencia de los macrófagos activados a las amibas fue un proceso independiente de suero y resultó más efectiva que la adherencia de otras células mononucleares al parásito. La adición de GalNAc no previno la muerte de los macrófagos activados. En realidad, mientras más amibas resultan destruidas mayor es la cantidad de macrófagos que mueren en el proceso, lo cual hace pensar que después de ser víctimas de la lisis por los macrófagos activados, las amibas liberan productos tóxicos que se vuelven lesivos para los macrófagos. Esto significa que la actividad citolítica amibiana dependiente de contacto no es la responsable de la poca sobrevivencia de los macrófagos observada en los análisis con una relación alta entre macrófagos y amibas, en donde resultaron destruidas más amibas, a diferencia de la lisis mínima de los macrófagos encontrada en donde las relaciones es baja entre macrófagos y amibas.

Por último, la catalasa, pero no la superóxido dismutasa, inhibe la destrucción de las amibas por los macrófagos activados, cuando se obtuvieron de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica, aunque fueron capaces de destruir amibas resultaron menos eficientes que los macrófagos activados de individuos normales (Salata y col., 1985). Esto significa que tanto los mecanismo dependientes de procesos oxidativos como los independientes de éstos, participan en la destrucción de las amibas por los macrófagos activados. Además, las amibas son sensibles al H_2O_2 pero no al ión superóxido. Murray y colaboradores ya habían señalado en un sistema libre de fagocitosis que los trofozoítos amibianos virulentos son muy susceptibles a tales moléculas de oxígeno reducido (Murray y col., 1981). Aún no se sabe por qué las amibas tienen la capacidad de resistir los efectos oxidativos de los neutrófilos con más éxito que los macrófagos activados. Los macrófagos de pacientes con AHA agudo también se pueden activar *in vitro* por medio de linfocinas obtenidas de lectina para destruir amibas virulentas (Salata y col., 1985). El interferón gamma puede constituir una linfocina apropiada para lograr dicha activación de macrófagos con propósito de destruir a las amibas virulentas *in vivo*, ya que los linfocitos inmunes expuestos a proteína amibiana soluble produjeron significativamente más interferón gamma que los linfocitos normales (Salata y col., 1985). Pérez Tamayo y colaboradores descubrieron que una cepa virulenta de *E. histolytica* resultó eliminada en cuatro horas por macrófagos peritoneales obtenidos de ratas inmunizadas con antígeno amibiano y de animales control, los primeros con relación entre macrófagos y amibas tan baja como 1:1, los últimos con relación de sólo 30:1 (Pérez Tamayo y col., 1986). Aun cuando la rapidez del efecto impulsó a los autores a tener cautela en cuanto a la conclusión de que los linfocitos inmunes en la mezcla estaban produciendo linfocinas armadoras al exponerlos a los antígenos amibianos, esta explicación por lo menos resulta probable. Al utilizar macrófagos de calostro humano expuestos a cepas de *E. histolytica* tanto virulenta como no virulenta, en una proporción de 30:1, se observó lisis similar de las amibas por los

macrófagos. Después de cuatro horas de incubación se encontró 40% en la viabilidad de las amibas virulentas y de las no virulentas, sin disminución significativa de la viabilidad de los macrófagos durante ese periodo (Rocha y col., 1986).

Estos resultados sugieren que el macrófago activado es una célula efectora hábil en contra de trofozoítos de *E. histolytica* virulenta, que puede resultar esencial en la defensa contra la amibiasis invasora. La confrontación entre amibas y macrófagos constituye un fenómeno recíproco complejo, pues en el proceso también mueren muchos macrófagos, aún cuando el macrófago parece convertirse, aunque por un pequeño margen, en el vencedor. Esto contrasta con la superioridad de las amibas virulentas en su confrontación *in vitro* con neutrófilos y eosinófilos (Ravdin y col., 1982; López y col., 1989). Los productos tóxicos liberados por las amibas que han sufrido lisis parecen ser los responsables de los macrófagos muertos, más que un efecto citopático dependiente de contacto directo con las amibas vivas. Esto también contrasta con la forma en que las amibas virulentas destruyen a los neutrófilos (Ravdin y col., 1982). El daño de los macrófagos después de haber destruido a las amibas también puede contribuir a la escasez de elementos celulares inflamatorios tardíos en las etapas avanzadas de la invasión amibiana (Kretschmer, 1986).

Al parecer, la *E. histolytica* posee mecanismos para evadir o modificar la acción agresiva de los macrófagos, tales como el factor termoestable de bajo peso molecular, que inhibe tanto *in vitro* como *in vivo* la locomoción de los monocitos humanos, pero no la de los neutrófilos humanos, a través de un receptor que contiene manosa y que se haya sobre la membrana de los monocitos (Kretschmer, 1985). El mantener distantes a los monocitos puede no sólo alterar la rama aferente

de la inmunidad mediada por células, sino que al reducir los encuentros entre la amibas y los macrófagos puede impedir los efectos destructores sobre las amibas. Este mismo factor deprime la explosión metabólica de los macrófagos mediada por quimioluminiscencia. Además, los fagocitos mononucleares de hámsters revelan la actividad fungicida deprimida cuando se obtiene durante la amibiasis invasora (Capín y col., 1980).

La función *in vivo* de los macrófagos en la amibiasis también se ha empezado a estudiar. El bloqueo de los macrófagos con sílice o mediante suero antimacrófago aumenta la probabilidad de inducir AHA experimentalmente, incrementa el tamaño de los abscesos y promueve la disminución de las amibas hacia otros tejidos en cobayos y hámsters. La estimulación de los macrófagos con el Bacilo Calmette Guérin (BCG) tiene efecto opuesto (Ghadirian y col., 1980).

La resistencia del hospedero a la amibiasis invasora en ratones nu/nu depende de macrófagos y no de la función de las células T. Por último, la esplenectomía en hámsters aumenta el tamaño de los AHA así como la diseminación de las amibas a lugares distantes (Ghadirian y col., 1981).

Así en resumen, de todos los leucocitos analizados, el macrófago activado parece ser el único que bajo condiciones apropiadas posee superioridad *in vitro* citolítica y fagocítica sobre *E. histolytica*. Por limitada que fuera esta superioridad, puede ser crucial en el control y la prevención de la amibiasis invasora. Los eosinófilos activados con fMLP podrían tener rendimiento similar al de los macrófagos activados.

La inflamación que acompaña a la amibiasis invasora particularmente la hepática es peculiar. En los estadios tempranos existe un intenso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos (PMNn), y algunos eosinófilos (PMNeos), en tanto que conforme avanza la lesión lo que predomina es la necrosis acompañada ahora sólo de un escaso infiltrado de células mononucleares (Pérez-Tamayo y col., 1971). Esta escasa inflamación tardía pudiera estar relacionada con otro evento notable en la amibiasis invasora: La regeneración perfecta sin trazas de cicatrización de los órganos y tejidos (piel e hígado) afectados que se observa en los casos curados. Esta escasa inflamación tardía puede deberse a varios factores. Una posibilidad sería que la amiba, o alguno de sus productos, interfieran con el reclutamiento tardío de monocitos, inhibiendo de alguna manera su locomoción hacia el foco inflamatorio. En los sobrenadantes de cultivos axénicos de *E. histolytica* se ha identificado un factor de peso molecular bajo (583 daltones), termoestable que posee propiedades anti-leucocíticas (no citotóxicos) evaluadas fundamentalmente *in vitro*. En cámaras de Boyden el factor inhibe la locomoción (aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica) de los FM, pero no la de los polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos) humanos (Krestschmer y col., 1985). Este factor se ha designado FILM (factor inhibidor de la locomoción de monocitos humanos), interacciona con los monocitos a través de un receptor que contiene manosa (Krestschmer y col., 1991). En el citoplasma, el FILM provoca un aumento selectivo en el AMPc citoplásmico, (Rico y col., 1995) así como un incremento significativo en el número de microtúbulos pericentriolares (Giménez-Scherer y col., 1987). Es de gran interés para el presente trabajo, el hecho de que el FILM es además capaz de inhibir, la explosión respiratoria oxidativa provocada por la fagocitosis de partículas de zimosán tanto en FM como PMNn humanos, sin dañar a las células (Rico y col., 1992). Recientemente Chadee y col. demostraron que en los macrófagos del ratón los reactivos intermediarios de nitrógeno [RNI (óxido nítrico)] son los principales responsables de la destrucción

de la *E. histolytica* (Jin y col., 1992). Esta molécula tiene gran interés por la versatilidad de sus funciones, aunque existen reservas de su relevancia en la especie humana (Schoedon y col., 1995). Cabe decir que en estudios recientes, los RNI (óxido nítrico) humanos tienen relevancia en las funciones líticas (Bose y col., 1995).

ÓXIDO NÍTRICO (NO).

El NO es un radical libre (con un electrón no apareado) altamente reactivo, tiene una vida media de pocos segundos y se combina rápidamente con otros radicales libres (Vallance y col., 1994; Beckman y col., 1993). En sistemas biológicos se descompone a nitritos y nitratos; esta reacción es catalizada por metales de transición como el fierro. Se produce a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno en una reacción catalizada por la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS) (Moncada y col., 1993).

Puede reaccionar con oxígeno molecular para producir dióxido de nitrógeno (NO_2) o con superóxido para formar peroxinitritos ONOO^- . El NO es producido en grandes cantidades durante la defensa del huésped y en reacciones inmunológicas. En la literatura se encuentran actualmente reportes que involucran varios aspectos de procesos biológicos y patológicos en donde participa el NO. Dos aspectos de la generación de NO son de particular interés: (1) El papel del NO como una molécula citotóxica que contribuye a la armadura antimicrobiana de los fagocitos y (2) el papel de NO como un vasodilatador de inflamación y mediador de choque séptico (Schoedon y col., 1995). Existen por lo menos tres formas diferentes de NOS. Una

de ellas está presente en células endoteliales, otra forma de NOS se expresa en las neuronas, en donde el NO actúa como un modulador importante en la función sináptica. La tercera forma de esta enzima, inmune o inflamatoria puede ser inducida en macrófagos activados (iNOS), en donde el NO y sus productos de reacción contribuyen a la muerte de parásitos intracelulares y a la inhibición de virus como, vaccinia y herpes simple cuando se encuentran en macrófagos de ratón (Klein y col., 1997).

En 1987, se demostró que las células de mamíferos pueden sintetizar NO, un año después se sugirió que las células se comunicaban con otras a través del NO. La producción y eficacia del óxido nítrico como una molécula inmune efectora ha sido demostrada en modelos murinos. Se ha intentado demostrar la producción de óxido nítrico en fagocitos mononucleares humanos pero existen reportes contradictorios. Hunt y col., demostraron que los monocitos a macrófagos son capaces de producir NO. Por otro lado también se ha visto que los FM son capaces de secretar productos citotóxicos que incluyen los reactivos intermediarios de oxígeno (ROI) y reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI). (Nathan y col. , 1987). Estos dos oxidantes inorgánicos producidos independientemente se han implicado en la citotoxicidad de macrófagos hacia células tumorales (Ding y Nathan 1988). Los monocitos producen ROI vía NADPH oxidasa y mieloperoxidasa (Babior, 1984). Los RNI se forman por la oxidación de un nitrógeno de la L-arginina a través de una enzima dependiente de la NADPH que produce un radical con nitrógeno central NO (Marletta y col., 1988; Iyengar y col., 1987).

CAPÍTULO II

OBJETIVO E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Ampliar el conocimiento sobre la respuesta del organismo frente a *E. histolytica* y sus mecanismos de evasión.

OBJETIVO ESPECÍFICO.

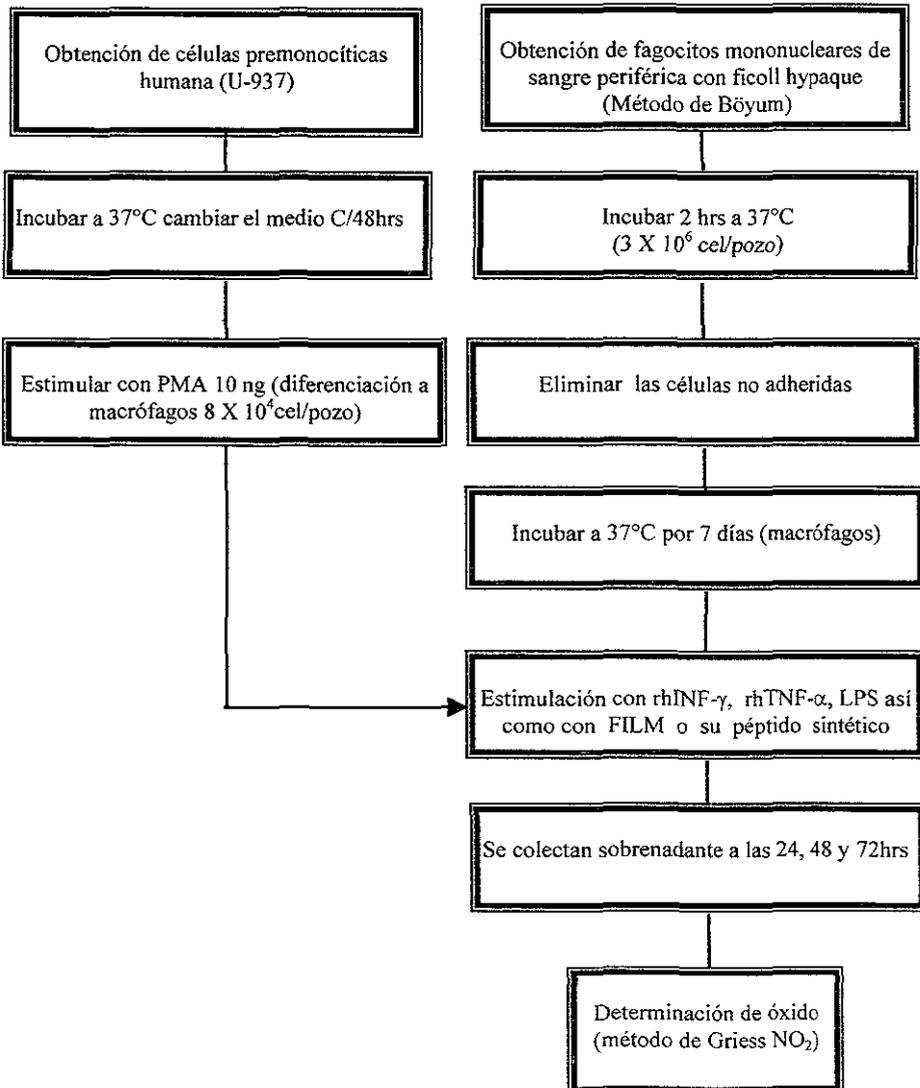
El presente trabajo tiene por objeto evaluar si el FILM afecta la producción de reactivos intermediarios de nitrógeno [RNI (NO)] en FM humanos activados con rhIFN- γ , rhTNF- α y LPS, en la misma forma en que es capaz de abatir, si no es que prácticamente cancelar, la génesis de reactivos intermediarios de oxígeno [ROI (H₂O₂, \cdot O₂, \cdot OH)].

HIPÓTESIS

El FILM, además de inhibir la transducción de la señal quimiotáctica en movimiento vectorial, perturba los fenómenos metabólicos preparativos de la fagocitosis y la génesis de óxido nítrico en FM humanos.

CAPÍTULO III

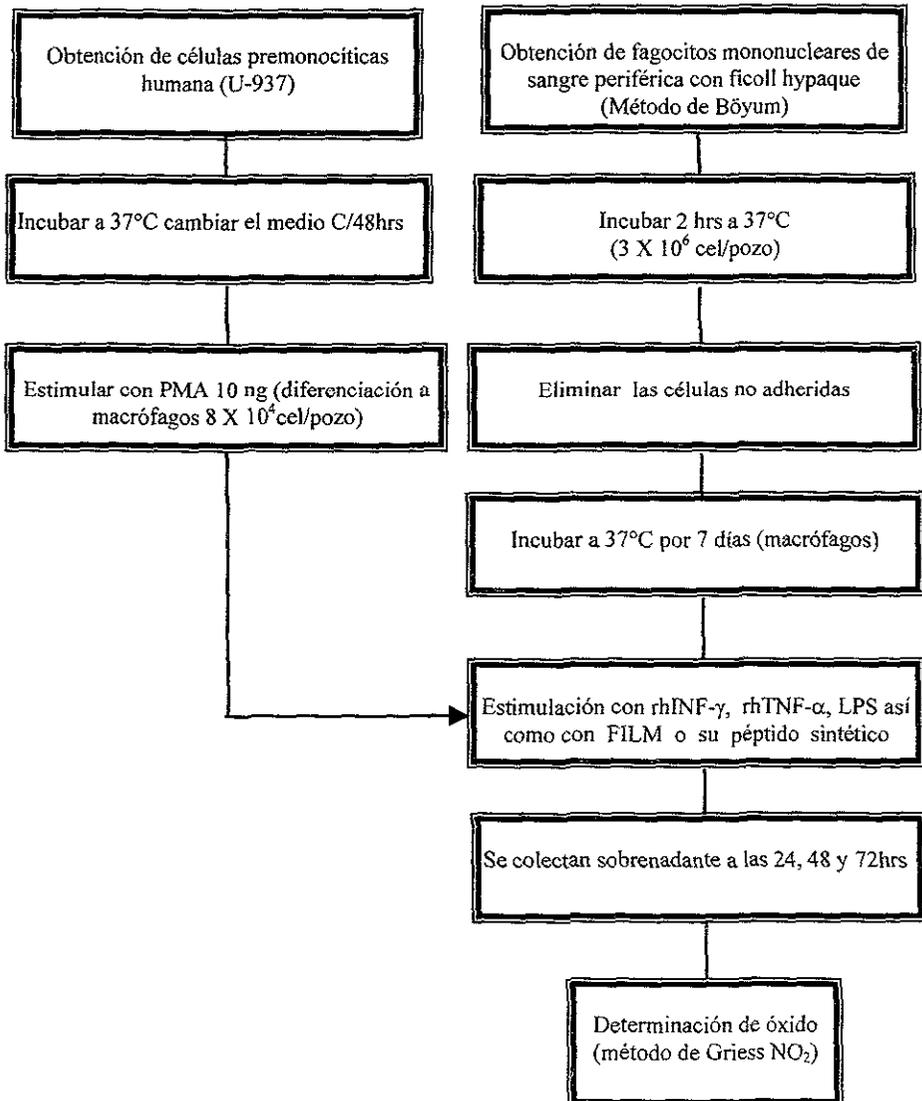
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

CAPÍTULO III

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

OBTENCIÓN DEL FILM

El sobrenadante de 72 hrs (fase semi logarítmica de crecimiento) de cultivos de 2.0 a 2.5×10^5 *E. histolytica* HMI-IMSS (proporcionado por la Dra. Cecilia Ximenez, del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina UNAM) fué cosechado por centrifugación a $200 \times g$ por 5 min a 4°C , y filtrado a través de membranas de Millipore® de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore Corp., Bedford MA., USA). Se reunieron 150 ml de este sobrenadante los que se filtraron escalonadamente a través de filtros Amicon XM50, PM30, PM10, UM2 y YCO5 (Amicon Corp., Lexington MA, USA). Para obtener 75 ml del material con moléculas menores de 1000 daltones. Este material fué cromatografiado a 4°C en una columna (90 X 18cm) de Sephadex G-15 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) eluída con solución salina de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 (SSF). La fracción entre 478-645 daltones (Kretschmer y col., 1985) fué colectada, llevada al volumen original, filtrada nuevamente a través de una membrana Millipore de $0.45\mu\text{m}$ y almacenada a -70°C en alicuotas de 1.5 ml hasta su uso.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS.

Aislamiento de fagocitos mononucleares (FM). Las células se obtuvieron de sangre periférica heparinizada de donadores no fumadores sanos. La sangre se

diluyó 1:2 con medio de RPMI-1640 (Con L- Glutamina , Buffer HEPES 25mM, Bicarbonato de sodio y rojo de fenol) La muestra se colocó sobre un gradiente de Ficoll - Hypaque con una densidad 1.077 en tubos de poliestireno (17 X 100mm) (Falcon Oxnard, CA., EEUU) posteriormente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a 20°C. Las células de la interfase se lavaron dos veces y fueron resuspendidas en RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Gibco, Grand Island, NY). Los tubos fueron centrifugados a 200 x g por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en RPMI-1640 completo (10% de suero fetal, 2mM Glutamina, 1% de piruvato, 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin). Se determinó la viabilidad por exclusión de azul tripano. Las células mononucleares se colocaron en placas de 24 pozos de poliestireno (132 X 88 mm, volumen por pozo 3.4 ml, área de cultivo 1.9 cm²) (Nunc Brand Products Naperville IL) con una concentración de 3×10^6 cel/ml y se incubaron 2 hrs a 37 °C con 5% de CO₂ para permitir la adherencia de los monocitos. Después de este tiempo se retiró el sobrenadante con una pipeta pasteur eliminando así las células no adherentes y se completó nuevamente el volumen de cada pozo a un ml. Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días revisándolas y cambiando el medio de cultivo cada 48 hrs permitiendo de esta manera la maduración de monocitos a macrófagos.

Células U-937 (premonocítica). La línea celular U-937 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) aisladas originalmente de un paciente con linfoma y ha sido clasificada como una línea celular monoblástica. Esta línea celular premonocítica fue cosechada en botellas de 25 cm con cuello angulado de poliestireno con capacidad de 50 ml (Nun Brand Products Naperville, IL) en 5 ml de medio RPMI-1640 completo a 37°C con 5% de CO₂. Se dejaron hasta lograr una confluencia de células, cambiando el medio de cultivo cada 48 hrs. Cuando el número de células fue el adecuado, se colocaron en tubos de 50 ml, se lavaron dos

veces con RPMI-1640 completo 200 x g por 10 min a 4°C. Las células se ajustaron y se colocaron en placas de 24 pozos (Nunc Brand Products Naperville, IL) a una concentración de 8×10^5 , se les estimuló con 10 ng PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) para diferenciarlas a macrófagos. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, a las 48 hrs se estimularon de la misma manera que los FM.

Estimulación de FM y células U-937. Se activaron in vitro con rhIFN- γ (Interferon gama 100U/pozo) rhTNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa 1ng/pozo), LPS (Lipopolisacárido 10ng/pozo) (Wang y col., 1994), así como con el inhibidor FILM y su péptido sintético (10 μ g/pozo) se obtuvieron los sobrenadantes de 24, 48 y 72 hrs y se guardaron a -70°C para medir el óxido nítrico en forma de nítritos. En algunos experimentos se agregó LPS como un doble estímulo 48 hrs después de la primera estimulación y los sobrenadantes se obtuvieron 24 hrs más tarde (72 hrs totales).

Determinación de NO. La concentración de NO medido como nítritos se determinó en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (Nunc Brand products Naperville, IL) de acuerdo al método de Griess (Ding y Col., 1988).

El NO se determinó en 100 μ l de las muestras adicionando 50 μ l de sulfanilamida al 1%, 50 μ l de N-1- naftiletlen diamina dihidrocloruro 10 min, después se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de Elisa (Dynatech MR 5000). Como estandar se usó una curva de nítrito de sodio (1.56-100 μ M).

Análisis Estadístico. Los experimentos fueron analizados mediante una prueba de Fischer (F) para un análisis de varianza y dependiendo de ella se utilizó la prueba de “U” de Mann Whitney o la “T” de Student.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

RESULTADOS

Se determinó la producción de óxido nítrico en macrófagos humanos estimulados con rhIFN- γ , rhTNF- α así como con el FILM y su péptido sintético en sobrenadantes de 24, 48 y 72 hrs, cuando estas células fueron estimuladas por rhIFN- γ hubo un aumento en la producción de NO el cual se detectó desde las 24 hrs alcanzando un máximo a las 72 hrs (0.0847, 0.126, 0.427 μ M) cuando se comparó con las células en reposo. Cuando las células se estimularon con rhTNF- α la producción de NO fue menor, sin embargo la producción máxima también se alcanzó a las 72 hrs (0.066, 0.172, 0.229 μ M).

El FILM y el péptido sintético son capaces de inducir la producción de NO por sí mismos Gráfica 1. Puede observarse que la mejor respuesta se dió a las 72 hrs razón por la cual los siguientes ensayos se determinaron en este tiempo.

Para evaluar el efecto del FILM y del péptido sintético sobre la producción de NO, los macrófagos se estimularon con rhIFN- γ + FILM o rhIFN- γ + péptido sintético y los resultados se compararon con la producción de NO en macrófagos estimulados con rhIFN- γ a las 72 hrs. El FILM y el péptido sintético inhiben el 50% de la producción de NO (0.427, 0.230, 0.231 μ M). Cuando se estimuló con rhTNF- α + FILM o rhTNF- α + péptido sintético se observó una inhibición de 27% en la producción de NO (0.229, 0.167, 0.169 μ M) Gráfica 2. Estos resultados pueden deberse a que el rhTNF- α no es el mejor estimulador de la producción de NO.

En algunos experimentos se utilizó rhIFN- γ + LPS (lipopolisacárido de *E. Coli* B4:0111) para detectar cantidades mayores de NO. El segundo estímulo se colocó a las 48 hrs después del rhIFN- γ y se observó un aumento en la producción de NO en los macrófagos activados de esta forma, al compararse con aquellos activados con un solo estímulo (0.427 - 0.550 μ M).

A pesar de éste incremento en la producción de NO de los macrófagos activados con doble estímulo rhIFN- γ + LPS, la inhibición causada por el FILM o por el péptido sintético no se ve más clara que cuando se usa solamente un estímulo rhIFN- γ (0.550, 0.298, 0.340 μ M) Gráfica 3.

Cuando los macrófagos se estimularon con rhTNF- α + LPS como segundo estímulo se observó un incremento en la producción de NO a las 72 hrs (0.229-0.507 μ M) por lo que la inhibición lograda por el FILM o el péptido sintético se ve más clara Gráfica 4.

Los mismos ensayos se realizaron en una línea celular premonocítica humana U-937 con el objeto de comparar la producción de NO y determinar en forma mas clara el efecto del FILM y el péptido sintético. Se determinó la producción de NO en células U-937 estimuladas de la misma manera que los macrófagos obtenidos de sangre periférica y se colectaron sobrenadantes de 24, 48 y 72 hrs. Los resultados obtenidos en esta línea celular, están representados en la Gráfica 5 y no difieren de los datos encontrados en macrófagos humanos.

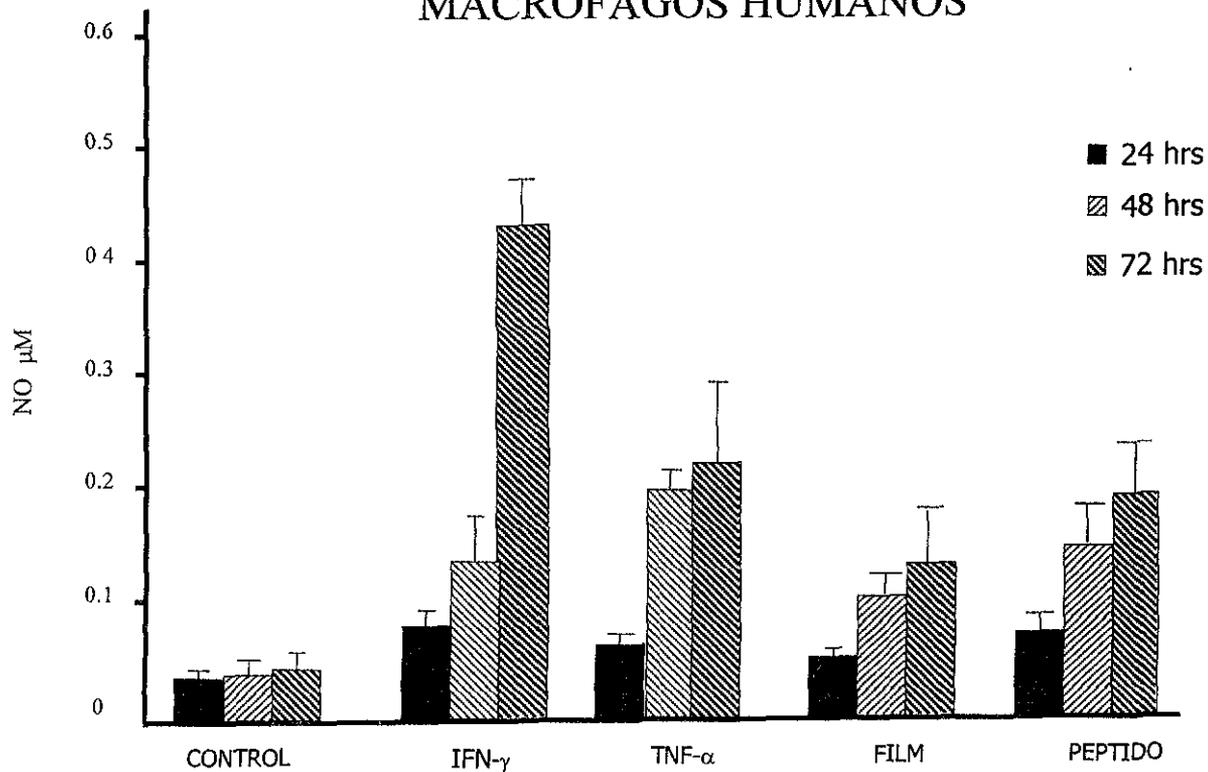
Resultados similares se obtuvieron cuando las células se estimularon con rhTNF- α Gráfica 5. El FILM y el péptido sintético son capaces de estimular la producción de NO.

Para evaluar el efecto del FILM y del péptido sintético sobre la producción de NO en células U-937 se usaron sobrenadantes de 72 hrs de células estimuladas con rhIFN- γ , rhIFN- γ + FILM y rhIFN- γ + péptido sintético (0.449, 0.310, 0.247 μ M) Gráfica 6.

Los valores obtenidos con la estimulación de rhTNF- α , rhTNF- α + FILM o rhTNF- α + péptido sintético fueron (0.207, 0.177, 0.199 μ M) Gráfica 6.

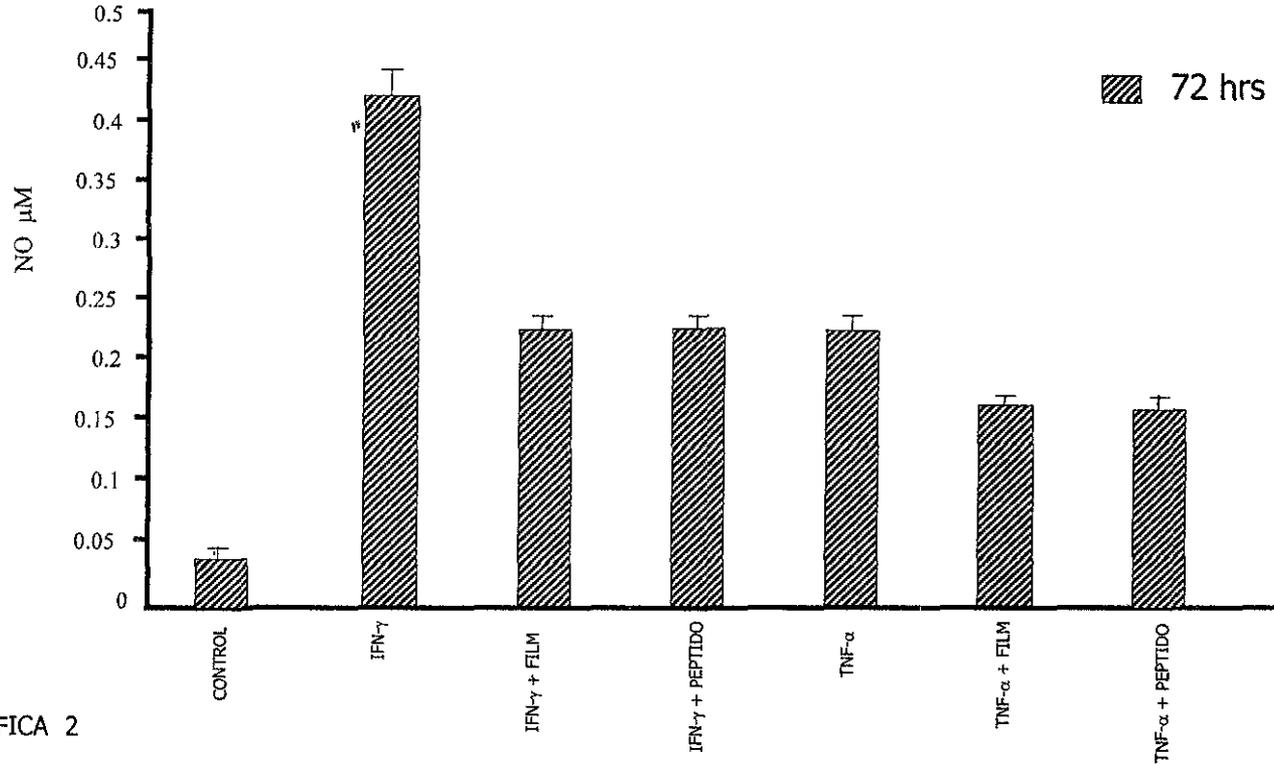
Utilizando LPS como segundo estímulo en las células U-937 se obtuvo un aumento cuando se colocó en células estimuladas con rhTNF- α (0.207-0.338 μ M) mostrando claramente la inhibición en la producción de NO provocada por el FILM y por el péptido sintético Gráfica 7, al agregar LPS a las células estimuladas con rhIFN- γ la producción de NO permaneció en la misma proporción, por lo que al probar el efecto del FILM o del péptido sintético se vió la misma inhibición que cuando se usó un solo estímulo Gráfica 8.

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS



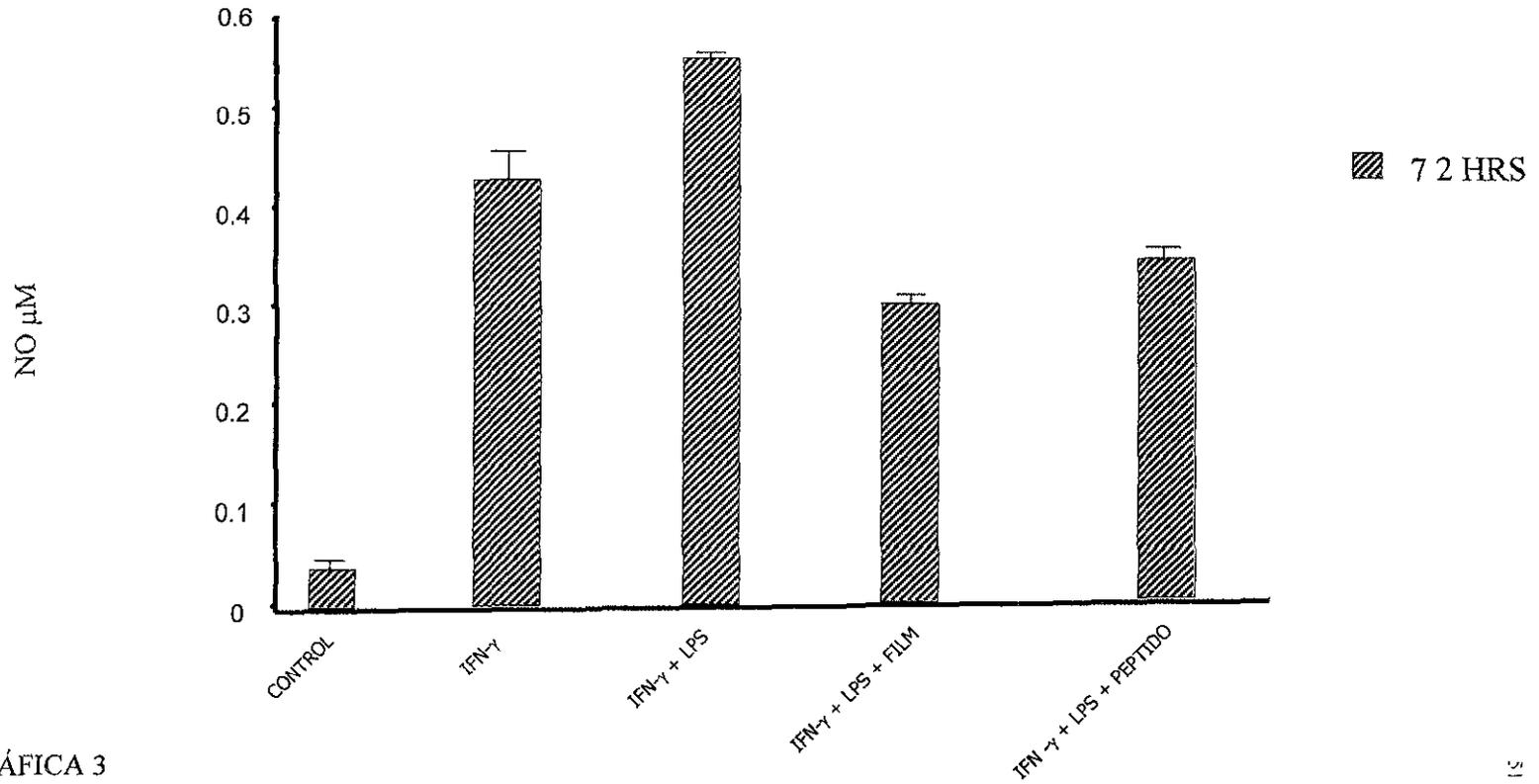
GRÁFICA 1

EFFECTO DEL FILM O SU ANÁLOGO SINTÉTICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS



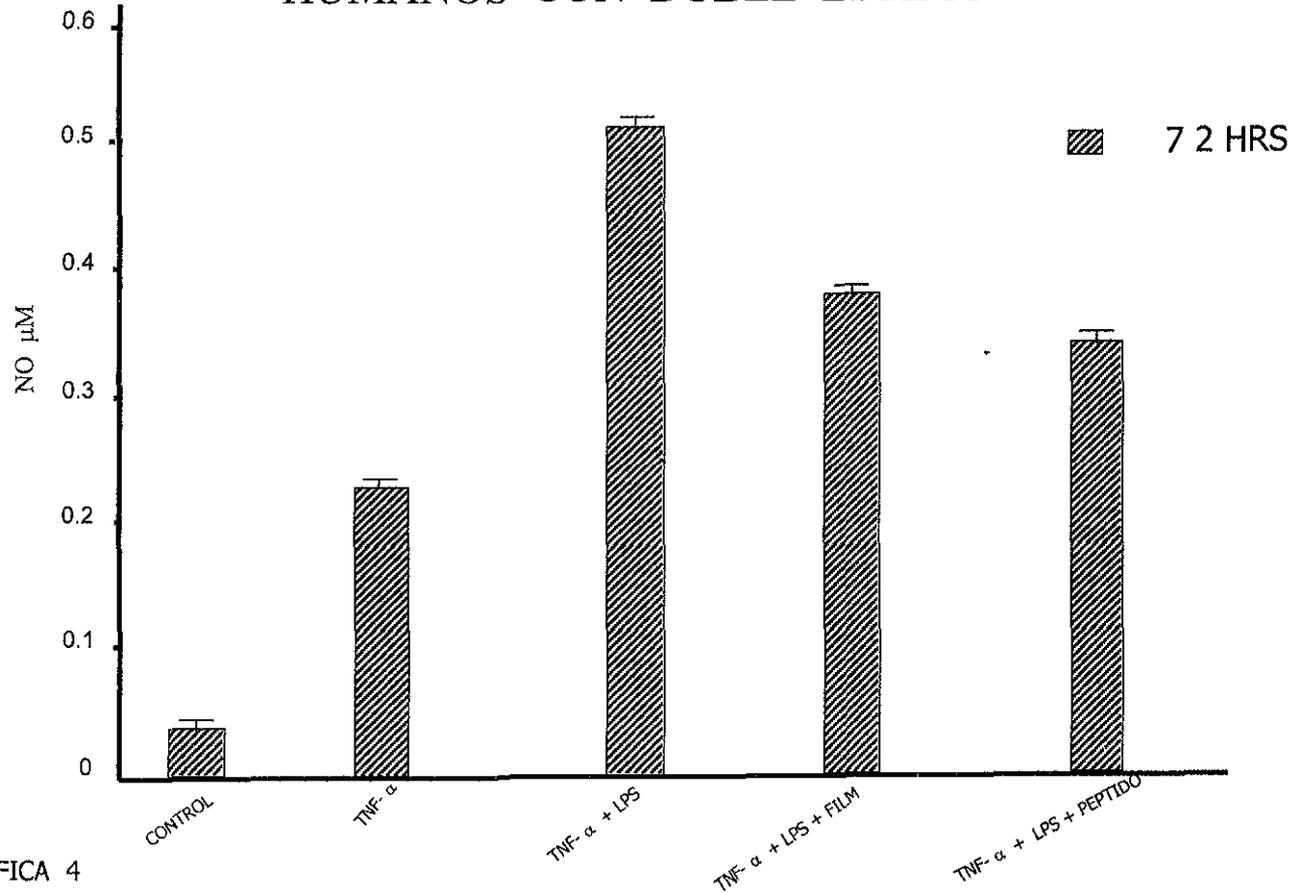
GRÁFICA 2

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS CON DOBLE ESTÍMULO



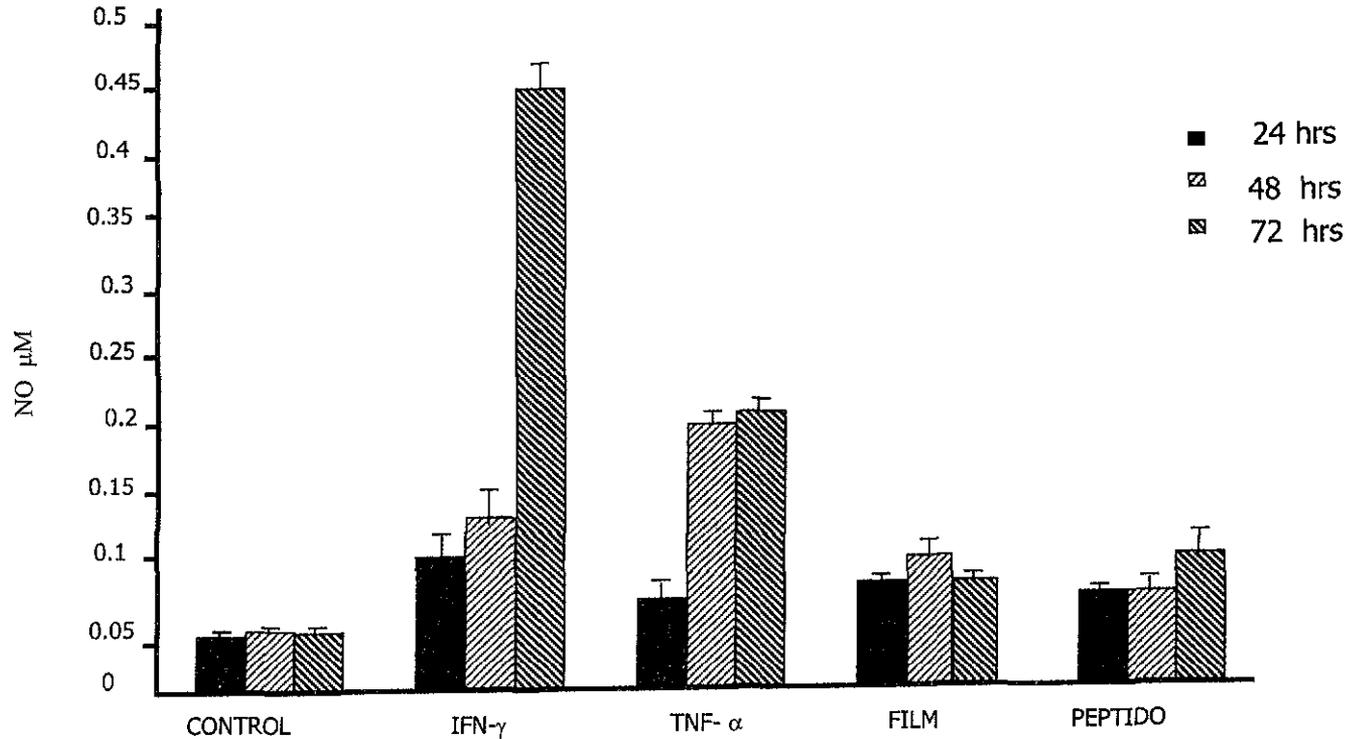
GRÁFICA 3

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS CON DOBLE ESTÍMULO



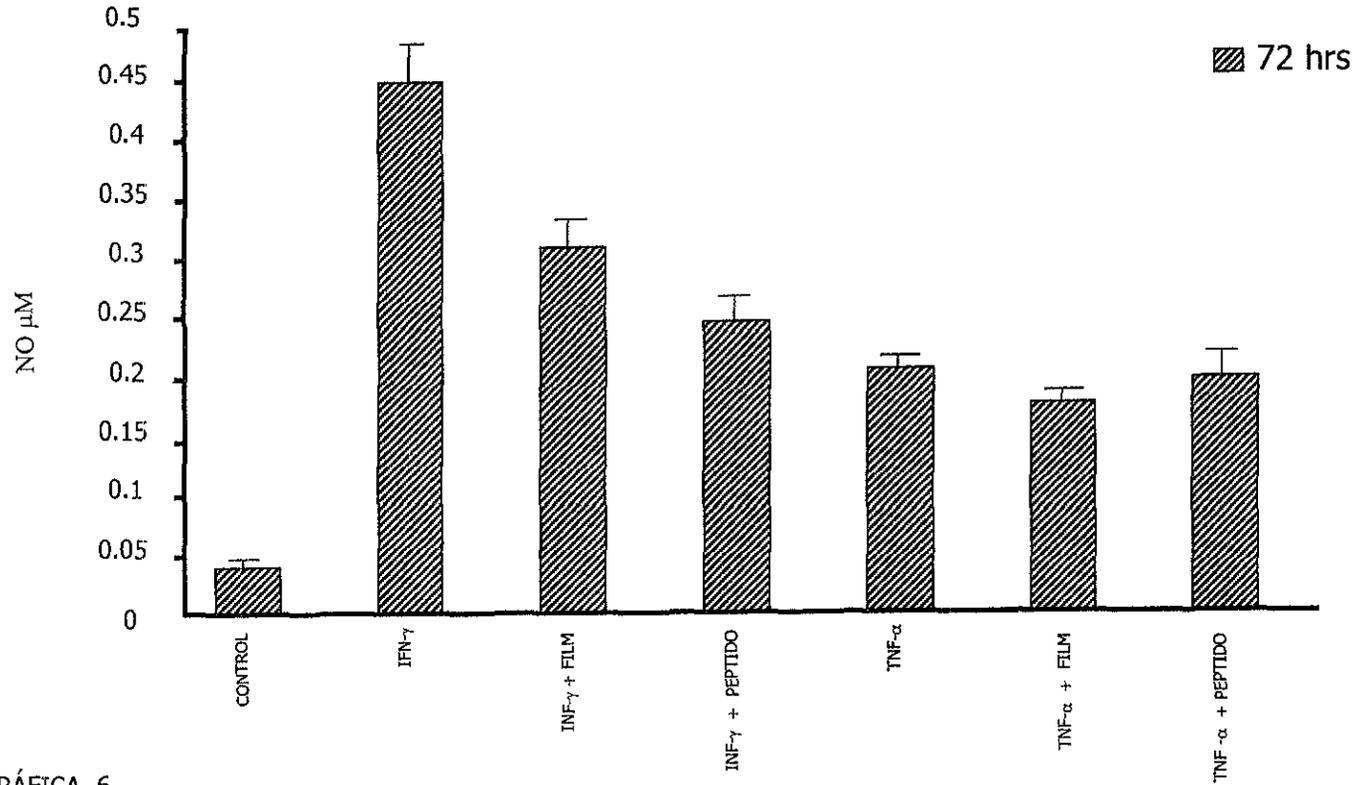
GRÁFICA 4

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS U-937



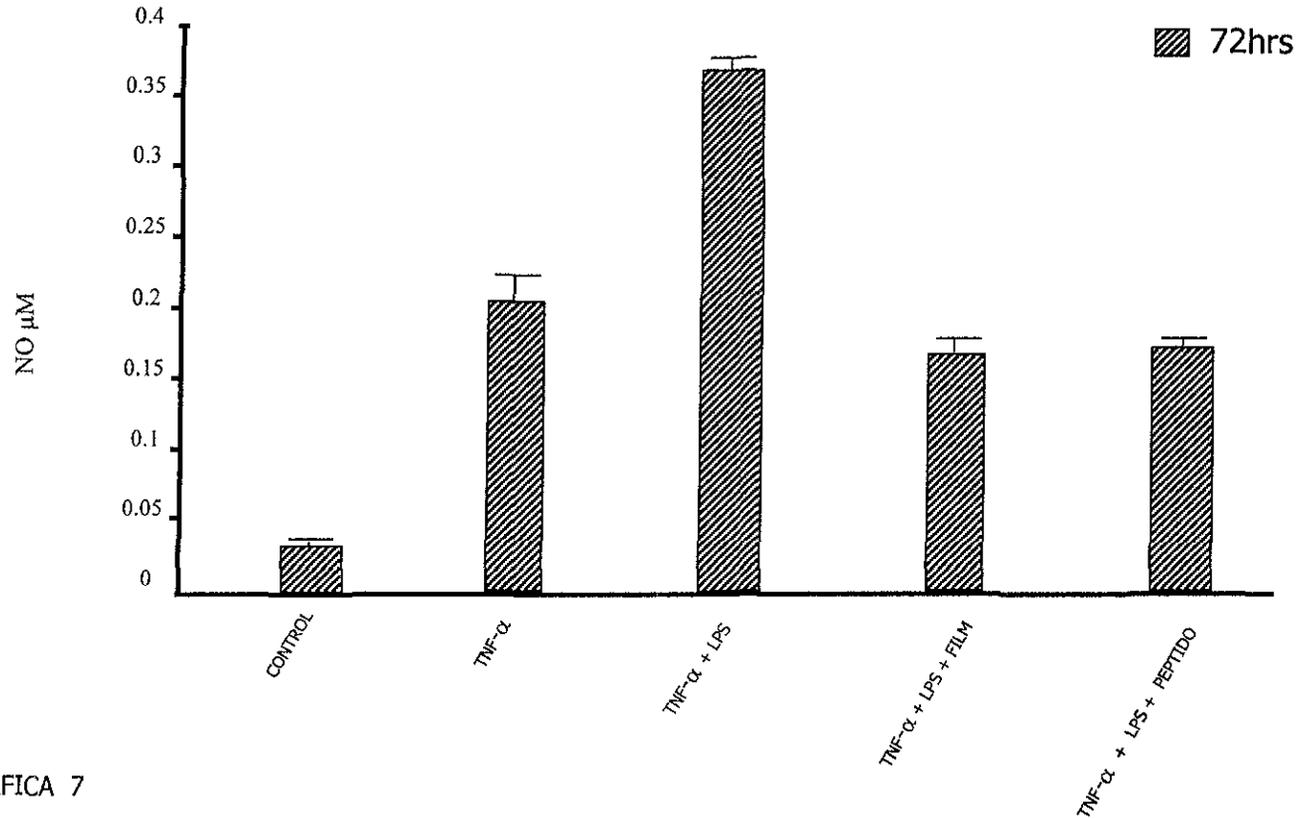
GRÁFICA 5

EFFECTO DEL FILM O SU ANÁLOGO SINTÉTICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS U-937



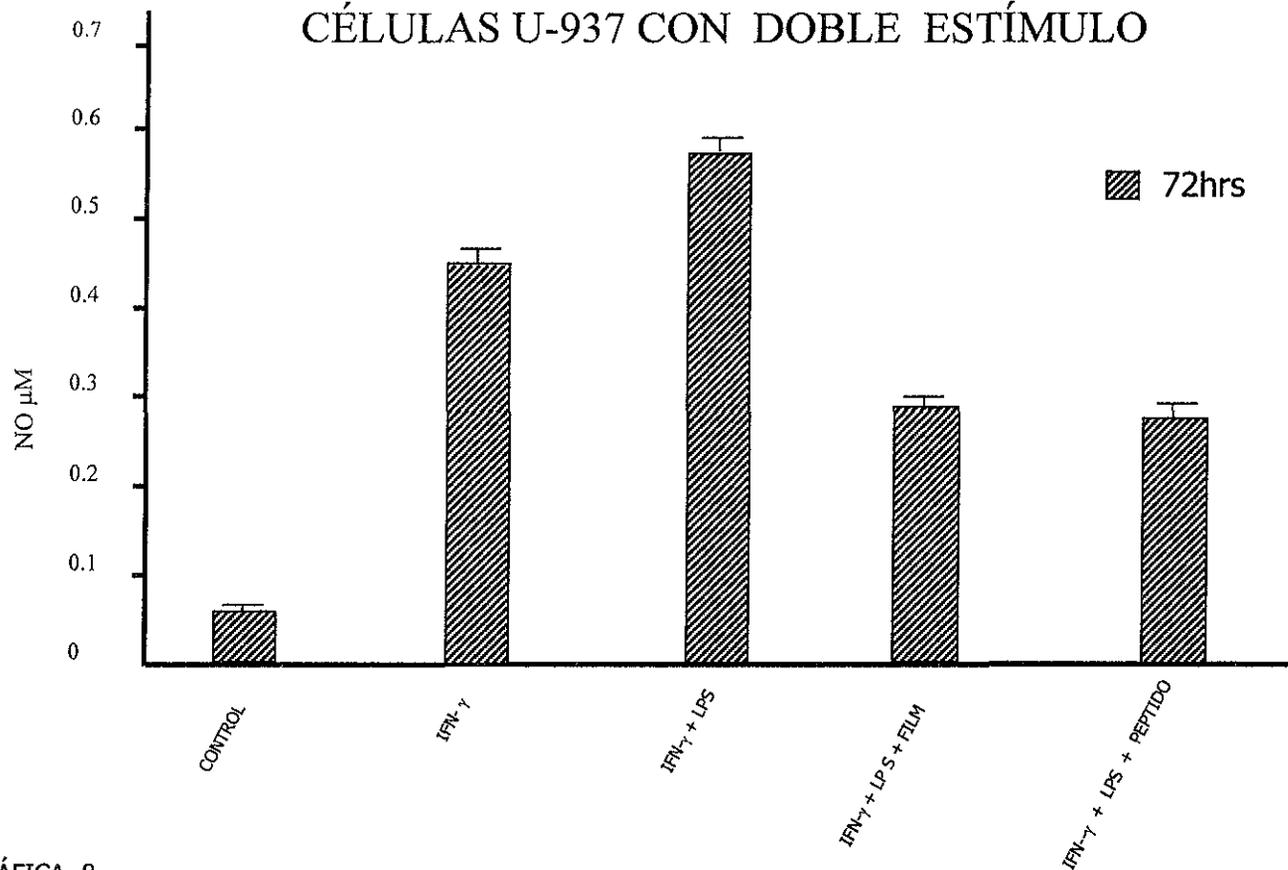
GRÁFICA 6

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS U-937 CON DOBLE ESTÍMULO



GRÁFICA 7

PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS U-937 CON DOBLE ESTÍMULO



GRÁFICA 8

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Al efecto inhibitor del FILM sobre la locomoción [aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica de los FM (kretschmer y col., 1985)], así como la inhibición de los reactivos intermediarios de oxígeno (ROI) (generación de O_2 , H_2O_2 pero sobre todo OH^\cdot y oxígeno singuleto) nuestros resultados agregan la capacidad de inhibir la génesis de reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI) en macrófagos humanos así como en una línea celular premonocítica U-937.

La capacidad de *E. histolytica* de inhibir la génesis de RNI en macrófagos humanos a través del FILM podría ser de relevancia biológica, aunque se sabe que los macrófagos activados son capaces de lisar a *E. histolytica* virulenta, utilizando tanto mecanismos oxidativos como no oxidativos (Salata y col., 1987), sin embargo, en estudios recientes con macrófagos murinos Chadee y col., demostraron que la lisis *E. histolytica* se debe principalmente a los RNI más que a los ROI.

La mayoría de los estudios que involucran a los RNI han sido realizados en macrófagos murinos. En estudios recientes se demostró que en macrófagos humanos obtenidos de sangre periférica sí hay producción de NO; aunque las concentraciones encontradas son bajas. Los macrófagos humanos expresan la enzima iNOS cuando han sido estimulados y activados apropiadamente. Qutayba y col., postulan la posibilidad que las citocinas proinflamatorias presentes en el sitio de inflamación, podrían inducir a los FM *in situ* a producir NO usando la vía de la enzima iNOS.

Los Fagocitos Mononucleares humanos carecen de arginasa, o actividad del ciclo de la urea no metabolizan a la L-arginina por esta vía. Se sabe que carecen también de los sistemas enzimáticos requeridos para la síntesis de BH₄., un factor esencial para la síntesis de NO. (Hay BH₄ exógeno pero no es suficiente para la síntesis de NO) (Schneemann y Schoedon., 1995). Por Northern no se ha podido detectar el mRNA de iNOS, después de estimular macrófagos humanos con LPS o rhIFN γ mientras que en macrófagos de rata o ratón sí. Cuando se usa RT-PCR sí se detectan cantidades pequeñas de mRNA de iNOS después de la estimulación con LPS/rhIFN- γ (estímulos inflamatorios) en monocitos purificados de sangre periférica (Chesrown y col., 1994)

En conclusión, la síntesis de NO en humanos es más restringida que en otras especies de mamíferos, tales como rata y ratón, además no todos los tejidos humanos disponen de actividad de iNOS.

Las dos citocinas probadas como estímulo aumentaron la producción de NO en macrófagos humanos. El LPS tuvo solamente una influencia sinérgica marginal sobre la producción de nitratos. El rhIFN- γ fué el mejor estimulador empleado. Los FM son capaces de usar la vía de la iNOS para producir NO mostraron la presencia de mRNA de iNOS cuando se estimulan monocitos/macrófagos humanos, con LPS o con rhIFN- γ (Reiling y col., 1994). La iNOS se ha descrito en macrófagos murinos (Xie y col., 1992). Sin embargo, se ha reportado que en monocitos/macrófagos humanos son capaces de producir NO (Hunt y col., 1992; Martín y col., 1993)

La diferenciación de monocitos a macrófagos se acompaña de cambios morfológicos y funcionales, Denis (1991) reportó la acumulación de nitritos en el medio de cultivo de macrófagos humanos, después de tratamientos prolongados con citocinas o infección por micobacterias., estos resultados son consistentes con los obtenidos por que muestran producción de nítritos en macrófagos humanos infectados por bacterias (Muñoz-Fernandez y col., 1992).

Hay evidencia que indican que el NO puede jugar un papel importante en la inflamación aguda como en la crónica. El tratamiento con inhibidores de la NOS, reduce el grado de inflamación en ratas con casos agudos (Ialenti y col., 1992), hay reportes que sugieren que los inhibidores de NOS protegen contra algún daño (Buckberg y col., 1992; Oury y col., 1992)

CAPÍTULO VII

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

El FILM y su péptido sintético inhiben la producción de NO en macrófagos humanos así como en la línea celular U-937 por lo que podemos considerar al FILM como uno de los mecanismos de evasión utilizado por *E. histolytica* en contra del huésped.

Los RNI son los más importantes para la destrucción de *E. histolytica*.

El rhIFN- γ resultó ser el mejor estimulador para la producción de NO en las condiciones estudiadas.

El rhTNF- α necesitó la ayuda del LPS para marcar la inhibición lograda por rhIFN- γ .

CAPÍTULO VIII

APÉNDICE

APÉNDICE 1

MATERIAL.

Botellas de cultivo de 25 cm con capacidad de 50 ml (Nunc Roskilde, Denmark).

Cubre bocas.

Criotubos de 2 ml (Nunc Roskilde, Denmark).

Cámara de Neubauer (Hausser Scientific, USA).

Gradilla para tubos.

Gradilla para criotubos (Fischer).

Gradilla para microtubos (Fischer).

Matraz erlenmeyer aforado, varios tamaños (Pyrex).

Micropipeta de 100, 500 y 1000 μ l (Costar).

Micropipeta de 10 y 50 μ l (Costar).

Pinzas (millipore, Inc., Bedford, NA).

Pipetas serológicas de 10 y 5 ml (Pyrex).

Pipetas pasteur (Kimble).

Puntas para micropipetas de 100 y 1000 μ l (Robbins).

Probetas de vidrio 100 y 500 ml (Pyrex).

Placas de cultivo de 24 pozos (Nunc Roskilde, Denmark).

Placas para Elisa fondo plano de 96 pozos (Nunc Roskilde, Denmark).

Tubos de 2 ml (Eppendorf geratebau Netheler and Hinz Hamburg, Germany).

Tubos de 50 y 10 ml (Falcon Labware, Franklin Lakes, NJ).

Vaso precipitado de 250 ml (Pyrex).

EQUIPO.

Autoclave (Interamericana de equipos S.A).

Balanza analítica (Mettler).

Balanza granataria (Mettler P1000).

Centrifuga de mesa refrigerada (Hettich).

Campana de flujo laminar (Veco).

Congelador de -35 y -70 °C (Revco).

Incubadora para cultivo (Revco)

Microscopio invertido (Carl Zeiss).

Micoscopio óptico (Carl Zeiss).

Potenciómetro (Corning).

Refrigerador (American Refrigeration).

Lector de Elisa con filtro de 560nm (Dynatech).

REACTIVOS.

RPMI-1640 suplementado.

Cloruro de Amonio.

Ficoll- Hypaque.

Solución Crioprotectora con RPMI.

Suero fetal Bovino al 10 %.

Glutamina.

Estreptomicina.

Gentamicina.

Piruvato de sodio.

rhIFN- γ .

LPS.

PMA.

DMSO.

rhTNF- α .

Reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, 0.1% N-1 naftiletlen diamina dihidrocloruro en 5% de HPO ácido fosfórico).

Nítrito de Sodio.

FILM (Factor inhibidor de la locomoción de monocitos humano).

Péptido sintético (sintetizado con la misma secuencia que el FILM).

APÉNDICE 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

MEDIO RPMI-1640 SUPLEMENTADO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) Reactivo comercial. Seguir las instrucciones del proveedor.

Suero fetal 10%	50 ml
Estreptomicina y penicilina 100 u/ug ml	5 ml
Gentamicina 2mg/100 ml	1 ml
Piruvato de sodio 1 %	5 ml

FICOLL-HYPAQUE

Ficoll- Hypaque 400 (Sigma)	9.0 gr
H ₂ O destilada	100 ml
Hypaque al 50% (winthrop)	28 ml
Densidad	1.077

Pesar 180 gr de Ficoll y disolverlo en 2000 ml de agua destilada.

Agregar 560 ml de Hypaque y por ultimo agregar 260 ml de agua destilada y checar I.R. 1.3580

SOLUCION CRIOPROTECTORA CON RPMI-1640.

Suero fetal 50 %	25 ml
DMSO al 10 %	5 ml
RPMI-1640 al 40%	20 ml

RhTNF- α (Factor de Necrosis Tumoral)

Concentración final 1 ng/pozo 10 μ l

RhIFN- γ (Interferon gama)

Concentración final 100 u/pozo 10 μ l

LPS (Lipopolisacárido de *E. coli* B4 0.111)

Concentración final 10 ng/pozo 10 μ l

PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate)

Concentración final 10 ng/pozo 10 μ l

Reconstituir en DMSO en 0.1mg/ml.

Almacenar en alícuotas (20 μ l a -20°C).

Nota: La alícuota que se usa no se congela de nuevo.

Diluir la solución Stock en PBS estéril.

Usar el PMA a una concentración final de 10 ng/ml

Pesar

CLORURO DE AMONIO (NH₄Cl).

NH ₄ Cl	8.299 g
KHCO ₃	1.001 g
EDTA	0.038 g
H ₂ O ₂ desionizada	1000 ml

CAPÍTULO IX

GLOSARIO

GLOSARIO

Amiba parásito extracelular que vive en los tejidos del huésped y que produce lesiones.

Cultivo axénico cultivo que contiene solamente una especie de microorganismos.

FILM factor inhibidor de la locomoción de monocitos producido por *E. histolytica*.

IFN- α es una proteína producida por células en infecciones virales.

LPS endotoxina de la pared celular de algunas bacterias gram negativas que puede actuar como mitógeno de células B.

Línea celular células generadas mediante el crecimiento continuo *in vitro* de un cultivo celular.

Movilidad aleatoria movimiento basal de las células no influenciado por estímulos externos, y que ocurre en todas las direcciones.

MIF linfocina que es capaz de inhibir la migración de los macrófagos.

Óxido Nítrico molécula citotóxica producido por macrófagos murinos y humanos activados contra *E. histolytica* y otros parásitos.

Quimiotaxis es el cambio en aumento o disminución en intensidad (velocidad) de la movilidad aleatoria, por la presencia de estímulos homogéneamente presentes en el medio (sin formación de gradientes).

Quimiotaxis movilidad celular donde la dirección de la locomoción se ordena vectorialmente a lo largo de un gradiente de sustancias (atractantes o repelentes) presentes en el medio.

Radical libre especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos.

Radical de oxígeno se produce durante las reacciones de varias moléculas directamente con el oxígeno por ejemplo el superóxido, peróxido de hidrógeno etc. Estos radicales aniones se producen además por células del sistema inmune.

Radical de nitrógeno incluyen nitritos, nitratos, óxido nítrico y dióxido de nitrógeno, los cuales tienen un papel importante en acciones carcinogénicas, anti-tumorales y anti-microbianas.

RT-PCR es una técnica extremadamente sensible que permite detectar el mRNA. Es utilizada en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico.

rhTNF- γ citocina liberada por macrófagos activados que están estructuralmente relacionados con la liberación de linfotoxinas por células T activadas.

Zimodemo poblaciones similares respecto a los patrones electroforético de enzimas específicas (zymos = enzima, demos = población).

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

BROWN Harlod.

PARASITOLOGÍA CLÍNICA

México. Ed. Interamericana. 3ª Edc. 1975. 26p.

BUCKBERG GD y col.

THE BIOLOGY OF NITRIC OXIDE

London. Ed. Portland Press. 1992. 1p.

DOBELL C.

THE AMOEBIA LIVING MAN

London. Ed. John Bale, Sons & Danielssoon. 1919.

KLEIN Jan, Václav y col.

IMMUNOLOGY

USA. Ed. Blackwell science. 2ª Edc. 1997. 1452p.

KRETSCHMER RR.

AMIBIASIS

México. Ed. Trillas. 1ª Ed. 1994. 120p.

LANDA L y col.

AMEBIASIS

México. Ed. Sepúlveda B, Diamond LS. 1976. 654p.

MARTÍNEZ Manuel.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA MÉDICA

México. Ed. La Prensa Medica Mexicana. 2ª Edc. 1979. 94p.

MARTÍNEZ Palomo Adolfo.

AMIBIASIS

México. Ed. Panamericana. 1ª Edc. 1989. 27p.

MARTÍNEZ Palomo, A.

AMEBIASIS

Amsterdam. Ed. Martínez Palomo A .1986. 11p.

MARTÍNEZ Palomo A

THE BIOLOGY

Chichester. Ed. John Wiley & Sons Ltd. 1982. 96p.

MOSELIO S y col.

MICROBIAL DISEASES

USA. Ed. Williams Wilkins 3ª Edc. 1998. 75p.

ORTIZ-Ortiz.

THE IMMUNE SYSTEM AND AMEBIASIS

San Diego. Ed. Academic Press. 1994. 145p.

PEREZ Ruy y col.

AMIBIASIS

México. Ed. Fournier S.A. 1ª Edc. 1971. 9p.

PEREZ Ruy y col.

AMEBIASIS

Ed. Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1976. 145p.

ROITT y col.

IMMUNOLOGY

London. Ed. Mosby. 5ª Ed. 1998. 67p.

SALATA RA. y Ravdin JI

AMEBIASIS

Nueva York. Ed. Ravdin, JI. 1988. 464p.

SEPULVEDA B, Diamond LS.

AMEBIASIS

México. Ed. IMSS. 1976. 50p.

WALSH JA, Ravdin JI.

HUMAN INFECTION BY *ENTAMOEBAS HISTOLYTICA*.

New York. Ed. Churchill Livingstone. 1988. 93p.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- ANGGARD E. 1994. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*. 343:1199
- BABIOR BM. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*. 73:399
- BECKMAN JS, Crow JP. 1993. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans*. 21:330
- BOECK WC, Drbohlav J. 1925. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am.& Hyg*. 5:371
- BOSE M, Farnia P. 1995. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process. *Immunol Lett*. 48:59
- BRUMPT E. 1925. Étude Sommaire and I' 'Entamoeba dispar n sp 'Amibe á kysteses quadrinuclés, parasite and I' homme, *Bull Acad Méd*. 94:943
- CAPÍN R, González MA, Ortiz Ortiz L. 1980. Disminución de la actividad del sistema fagocítico mononuclear en hámsters infectados con *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd*. 11 sup. 1: 235
- CABALLERO S, Viveros RM, Salvatierra B, Tapia CR, Sepulveda AJ, Gutiérrez G, Ortiz Otriz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am J Trop Méd Hyg*. 50:412
- CHAVÉZ B, Martínez-Palomo y col. 1978. Estructura Ultramicroscópica de la Pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E. coli*. *Arch Inves Méd*. Sup 1:113
- CHERSROWN SE, Monnier J, Visner G, Nick HS. 1994. Regulation of inducible nitric oxide synthasa mRNA levels by LPS, IFN- γ , TGF- β and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophage. *Biochem Biophys Res commun*. 200:126
- CRAIG CF. 1905. Observations upon amebas infecting the human intestine with a decription of two species: *Entamoeba coli* and *Entamoeba dysenteriae*. *Am Méd*. 9:854

- DENIS M. 1991. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulate macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent and *M. avium* killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediate. *J Leukoc Biol.* 49:380
- DIAMOND LS. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Scie.* 134:336
- DIAMOND LS. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn and *E. histolytica* like amebae. *J Parasitol.* 54:1047
- DING AH, Nathan CF, Stuehr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141:2407
- FERNÁNDEZ S. 1990. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd.* 21:253
- GHADIRIAN E, Kongshavn PAL. 1981. Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite Immun.* 6:349
- GHADIRIAN E, Meerovitch E. 1982. *In vitro* amoebicidal activity of immune cells. *Infect Immunol.* 36:243
- GHADIRIAN E, Meerovitch E, Kongshavn PAL. 1983. Role of macrophages in host defense against hepatic amebiasis in hamsters. *Infect Immunol.* 42:1017
- GHADIRIAN E, Meerovitch E, Hartmann DF. 1980. Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. *Am J Trop Méd Hyg.* 29:779
- GIMÉNEZ Scherer JA, Pacheco MG, Cruz E, Hernández P, Merchant MT, Kretschmer RR. 1987. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Lab invest.* 57:45
- GIL RECASENS ME, Cats S, López Osuna M, Rosenstein YJ, Romo R, Cervera J, Kretschmer RR. 1984. Increased leukocyte histamine release by *E. histolytica* antigens in patients with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol.* 6:211
- GUTIERREZ G. 1986. Epidemiología y control de la amibiasis. *Arch Invest Méd. Sup.* 17:375

- GUTIERREZ G. 1987. Investigaciones Mexicanas Sobre Vacunas. Amibiasis. Epidemiología. 2:125
- GUERRANT RL, Brinsh J, Ravdin J. I, Sullivan JA, Mandel GL. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J Infect Dis. 143:83
- HARRIES J. 1982. Amebiasis: a review. J Real Soc Méd. 75:190
- HUNT NC, Golding RD. 1992. Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. J Hepatol. 14:146
- IALENTI A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. Eur J Pharmacol. 211:177
- IYENGAR R, Stuehr AJ, Marletta MA. 1987. Macrophage Synthesis of nitrite nitrate and N-nitrosamines precursors and role the respiratory burst. Proc Natl Acad Scie. USA. 84:6369
- JIN YL, Chadee K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol. 148:3999
- KELSALL BL, Ravdin JJ. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. Infect Dis. 168:1319
- KRETSCHMER RR, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López OM, Leucona M, Castro EM, Arellano J. 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 7:527
- KRETSCHMER RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Díaz Guerra O, Arellano J. 1991. The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 77:374
- KRETSCHMER RR. 1986. Immune consequences of amebiasis. Ped Infect Dis. 5:109
- LEVINE ND, Corliss JO. 1980. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 27:37
- LÓPEZ Osuna M, Kretschmer, RR. 1989. Destruction of normal eosinophils by *Entamoeba histolytica*. Parasite immunol. 11:413

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

- MARLETTA MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* 27: 8706
- MARTÍNEZ CS, Gorab A, Muñoz O, Reyes M. 1979. Coproantibodies in intestinal amebiasis. *Arch Invest Méd.* 10:121
- MARTÍNEZ-Palomo A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol Today.* 3:111
- MARTÍNEZ-Palomo A, Cantellano EM. 1997. Intestinal Amoebae. *Infect Microbiol.* 14:2
- MARTIN JH, Edeards SW. 1993. Changes in mechanisms of monocyte macrophage mediated cytotoxicity during culture. *J Immunol.* 159:3478
- MONCADA S, Higgs A. 1993. Mechanisms of disease the L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Méd.* 329:2002
- MUÑOZ Fernández MA, Fresno M. 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *trypanosoma cruzi* by rhTNF- α y rh INF- γ trough a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol letters.* 33:35
- MURRAY HW, Aley SB, Scott WA. 1981. Susceptibility of *E. histolytica* to oxygen intermediates. *Mol. Biochem Parasitol.* 3:381
- NATHAN CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 79:319
- MORRIS MN, Powel SJ, Elsdon-Dew R. 1970. Latex agglutination test for invasive amebiasis. *Lancet.* 1:1362
- ORTIZ ORTIZ L, Zamacona G, Sepulveda B, Capin NR. 1975. Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin Immunopathol.* 4:127
- OROZCO E, Guarneros G, Martínez Palomo A, Sánchez T. 1983. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulent factor. *J Exp Méd.* 158:1511
- OURY TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. 1992. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Scie.* 89:9715

- PÉREZ Tamayo R, Martínez VE, Pérez Montfort, R. 1986. Efecto de la inmunidad celular en la interacción entre célula peritoneal y amiba in vitro. Arch Invest Méd 17 (sup 1):259
- QUTAYBA H, Springall DR, Moreno VR, Canez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. 1993. Induction of nitric oxide synthase in asthma. Lancet 342:13510
- RAVDIN JI. 1995. State of the clinical article. Clin Infect Dis. 20:1453p
- RAVDIN JI. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Study of adherence, secreted toxins and contact dependent cytotoxicity. Infect Dis. 8:247
- RAVDIN JI, Guerrant RL. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev Inf Dis. 4:1185.
- REILING N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernest M, Flad HD, Hauschildt S. 1994. Nitric oxide synthase mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. Eur J Immunol. 24:1941
- REES CW, Bozicevich J, Reardon LW, Jones FA. 1942. A preliminary note on the complement fixation test for amebiasis with antigens prepared from *Entamoeba histolytica* grown with a large single species of bacteria. Am J Trop Méd. 22:581
- RICO G, Díaz Guerra O, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR. 1992. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Méd Res. 23:157
- RICO G, Díaz Guerra O, Kretschmer RR. 1995. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. Parasitol Res. 81:158
- ROCHA Ramírez LM, Reyes Montes R, Acosta Altamirano G, Isibasi A, Santos J I, Kumate J. 1986. Interacción in vitro de trofozoitos de *E. histolytica* con macrófagos de calostro humano. Arch Invest Méd. 17 (sup 1):307
- ROSENBAUM RM, Wittner M. 1987. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. J Cell Biol. 45:367

- SALATA RA, Murray HW, Rubin BY, Ravdin JI. 1987. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Méd Hyg.* 37:72
- SALATA RA, Ravdin JI. 1986. The interaction of human polymorphonuclear neutrophils and *Entamoeba histolytica*: increased cytopathogenicity for liver cell monolayers. *J Infect Dis.* 154:19
- SALATA RA, Martínez PA, Henry W, Murray LC, Tevinio N, Segovia E, Murphy CF, Ravdin JI. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* 136:2633
- SALATA RA, Cox J, Ravdin JI. 1987. The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoeba by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol.* 9:249
- SALATA RA, Pearson RD, Ravdin JI. 1985. Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J Clin Invest.* 76:491
- SARGEAUNT PG, Williams JE, 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of *E. histolytica* and *E. coli*. *Trans Soc Trop Med Hyg.* 72:164
- SCHOEDON G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S, Schaffner A. 1995. Nitric Oxide and infection: Another View. *Clin Infect Dis.* Sup 2:21:152
- SCHNEEMANN M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerro L, Schaffner A. 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis.* 167:1358
- SEPÚLVEDA B. 1979. Inmunología de la amibiasis. *Arch Invest Méd.* 5:447
- SHARMA SD, Piessens WF. 1978. Tumor cell killing by macrophages activated *in vitro* with lymphocyte mediators. III. Inhibition by citochalasins, colchicine and vinblastine. *Cell Immunol* 38:276
- STILLWELL G. 1955. Amebiasis. Its early history. *Gastroenterology.* 28:606
- THOMPSON PE, Graedel SK, Schneider CR, Stucki WP, Gordon RM. 1968. Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of *E. histolytica*. *Bull WHO.* 34:349

VAIDYA AB, Ray DK. 1982. Amebiasis. The tropical scourge. Scie Today India. 21:26

VALLANCE P, Collier J. 1994. Biology and clinical relevance of nitric oxide. Clin Pharmacol. 309:453

WALSH JA. 1986. Amebiasis in the world. Arch Invest Méd. Sup 17:385

WANG W, Keller K, Chadee K. 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. Immunol. 83:601

WIEDERMANN G, Scheiner O, Stemberger H, Kollaritsch H. 1984. Cytotoxic action of *E. histolytica*: influence of humoral defense mechanisms. Proc 11th Int Congr Trop Méd Mal. 9:166

WORLD HEALTH ORGANISATION. 1969. Amoebiasis geneva report of W.H.O. expert commite. WHO. Teach Rep Ser No.421

XIE QW, CHO HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Scie. 256:225

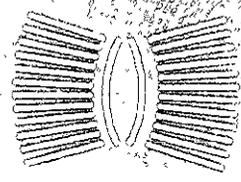
ZENTELLA M, Saldaña YB. 1995. Papel fisiológico de los radicales libres. Biol Educ Bioq. 15:152

CAPÍTULO XI

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS



VIII REUNIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN MÉDICA SOCIETAT MEXICANA DE INVESTIGACIÓN MÉDICA



MEMORIAS

Quintepéc, Mor: 24-26 de septiembre de 1998

2. EFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS (FILM) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN MACRÓFAGOS HUMANOS.

Rico Rosillo G, Leandro Zaragoza E*, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR Unidad de Investigación Médica en Inmunología H. de Pediatría, C.M.N Siglo XXI *Universidad del Valle de México, D.F

INTRODUCCIÓN: Los reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI: NO, NO₂ y NO₃) han mostrado recientemente ser un importante - quizás el principal - agente lítico usado por macrófagos murinos contra *Entamoeba histolytica in vitro*. En nuestro laboratorio, por otra parte, hemos identificado un pentapéptido (factor inhibidor de la locomoción de monocitos humanos (FILM)) (secuencia identificada: Confidencialidad de patente México, EUA) termoestable, con peso molecular de 583 Da producido por *E. histolytica* en cultivos axénicos y que, sin dañar a las células, también cancela literalmente la producción de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI: e H₂O₂, -OH, -O₂) pero ahora en monocitos y polimorfonucleares neutrofilos humanos, mas no en eosinófilos

OBJETIVO: Determinar el efecto del FILM y un análogo sintético sobre la producción de RNI ((óxido nítrico (NO)) producido por macrófagos humanos activados por medio de IFN- γ y TNF- α , estimuladores reconocidos de la producción de NO

MATERIAL Y MÉTODO: Las células se obtuvieron por exclusión de azul tripano y se colocaron en cantidad de 3X10⁶ cel/pozo. Después de 2 hrs de incubación a 37° C y 5% de CO₂, se eliminó el sobredante con las células no adheridas (linfocitos) y se agregó medio RPMI-1640 suplementado con este paso 0.15 x 10⁵ monocitos. Las placas se incubaron durante siete días para permitir la maduración de monocitos a macrófagos. Las células se estimularon ahora con IFN- γ o TNF- α (100 u/pozo o bien 1 ng/pozo, respectivamente) así como con los eventuales inhibidores, e FILM y un análogo sintético (10u/pozo en cada caso). La producción de NO (en forma de NO₂) se midió mediante la reacción de Griess en sobrenadantes obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs de incubación. Como testigos se utilizaron macrófagos cultivados sin estímulo alguno, y otros expuestos solamente al FILM o a su análogo sintético

RESULTADOS: Cuando los macrófagos se estimularon con IFN- γ hubo un incremento significativo (p < 0.05) a las 24, 48 y 72 hrs (0.099, 0.018 y 0.431 μ M respectivamente) cuando se compararon con los testigos (0.037, 0.040 y 0.041 μ M). La estimulación por TNF- α fue algo menor y se observó solo a las 48 y 72 hrs (0.054, 0.178, 0.191 μ M respectivamente). El FILM y su análogo solos, estimulan a los macrófagos en forma similar al TNF- α . El posible efecto del FILM (y su análogo sintético) sobre la producción de NO en macrófagos se estudió exclusivamente utilizando cultivos de 72 hrs (máxima producción NO). El FILM, así como su análogo sintético, son capaces de inhibir aproximadamente el 50% de la respuesta que hay con IFN- γ (0.431 μ M vs. 0.258 μ M, p < 0.05), pero aparentemente no afecta la exigua producción de NO inducida por TNF- α .

CONCLUSIONES: El FILM deprime la producción de NO subsecuente a la estimulación con IFN- γ aunque no tan vigorosamente como sucede con la respuesta de los ROI. El FILM y su análogo parecen poseer una discreta capacidad de inducir la producción de NO en macrófagos, comparable a la débil inducción que se logra con TNF- α . Este efecto sin embargo no oculta el efecto inhibitorio del FILM (y su análogo) sobre la

EL FILM DEPRIME LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO (NO) EN MACROFAGOS HUMANOS
-Luisandra Zaragoza, Rocio Rosillo G, Gabriela Scherer JA., Kretschmer RR, Unidad de Investigación Médica en Immunología, H. de Pediatría CMN, Siglo XXI, Universidad del Valle de México

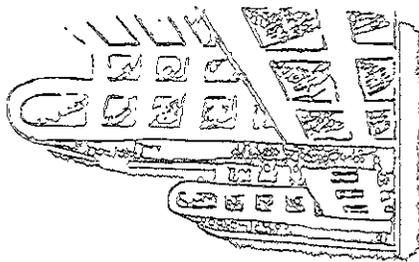
INTRODUCCION *Leishmania* biológica produce un patógeno (FILM) (384Ds) con propiedades anti-inflamatorias que, sin dañar a las células, inhibe la locomoción *in vitro* de monocitos humanos (FM) pero no la de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos y eosinófilos (PEIN), y enciende el estridido respiratorio (Reactivos Intermedios de Oxígeno (ROI)) de FM y PEIN escurridos, más no de eosinófilos
In *in vivo* el FILM reduce el nivel de FM humanos en venetas de Ibschuck e inhibe la reacción de hipersensibilidad por contacto al DNCH en cobayas. Los reactivos intermedios de nitrógeno (RNI NO, NO, y NO₂) han mostrado recientemente ser un importante agente lítico usado por macrófagos navios como *E. histolytica in vitro*

OBJETIVO Determinar el efecto del FILM y un análogo sintético sobre la producción de RNI (óxido nítrico (NO)) producido por macrófagos humanos cultivados con IFN- γ , en conocido estimulador de la producción de NO

MATERIAL Y METODO. Los FM se obtuvieron de sangre periférica humana por medio de un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077, se resuspendieron en RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino y se cultivaron en placas de 24 pozos a una concentración de 1x10⁶ células/pozo. Después de 2 horas de incubación, se eliminó el sobrenadante con las células no adheridas y se completó el volumen a un ml con el mismo medio de cultivo. Los platos se incubaron durante 7 días para permitir la maduración de los monocitos a macrófagos. Las células se estimulaban con 100 U/pozo de IFN- γ así como con los eventuales inhibidores, FILM y un análogo sintético (100U/pozo). La producción de NO se midió mediante la reacción de Griess en sobrenadantes obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs de incubación.

RESULTADOS La producción de óxido nítrico se incrementó diez veces después de la estimulación con r-IFN- γ (0.41 \pm 0.03 U/pozo) El NO resultó ($p < 0.05$) aproximadamente a la mitad mediante la edición de FILM (0.258 \pm 0.037 U/pozo) o de su análogo sintético (0.211 \pm 0.017 U/pozo).

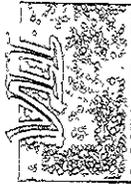
CONCLUSION El FILM deprime la producción de NO subsiguente a la estimulación con rIFN- γ aunque no tan vigorosamente como este inhibidor de los ROI. El FILM y su análogo parecen poseer una discreta especificidad de inducir la producción de NO en macrófagos. Este efecto sin embargo no oculta el efecto inhibitor del FILM (y su análogo) sobre la vigorosa producción de NO lograda con rIFN- γ



Hospital de Pediatría
15 al 19 de marzo de 1999



Reunión
Académica



Jornadas de
Investigación



Reunión de
Enfermería

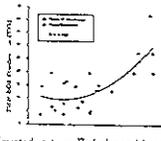


491.3

PLATELET LEUKOCYTE INTERACTIONS ARE INCREASED IN PATIENTS WITH TYPE II DIABETES

J.Y. Hoxama, P.J. Mullerkey, J.J. Logan, A.D. Cimetta, P. Lippman, S. Goldmann, J.G. Copeland, and P.F. McDonnell. University of Arizona, Tucson, AZ, 85724

We previously reported that exosome repletion injury is exacerbated in the diabetic heart. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) may contribute to excessive reperfusion injury by sequestering at the microcirculation and releasing reactive oxygen species (ROS). Additionally, diabetic platelets may exacerbate the inflammatory response by enhancing PMN ROS production. In this study, we measured platelet-leukocyte interactions from Type II diabetic patients (n = 9) and age-matched non-diabetic subjects (n = 14). We assessed platelet-leukocyte interactions in whole blood using flow cytometry and fluorescent markers to identify platelets (FITC-GPIIb) and leukocytes (LDS-751). We also measured ROS production from PMNs using the probe DCFH-DA. We observed a significant elevation in platelet-leukocyte interactions and PMN ROS production in blood from type II diabetic patients (P < 0.05). Furthermore, ROS production correlated significantly with the percentage of platelet-leukocyte aggregate formation (P < 0.05, see figure). These results suggest that platelet-leukocyte interactions are elevated in type II diabetic blood and that these interactions may contribute to enhanced myocardial ROS production. Under circumstances of leukocyte sequestration, excessive PMN ROS production in type II diabetic patients may contribute to excessive microvascular and organ injury. Supported by NIH HL 54539 and American Heart Association Pre-Doctoral Fellowship.



491.4

HIGH GLUCOSE ATTENUATES INSULIN-STIMULATED CHEMOKINESIS IN NORMAL HUMAN NEUTROPHIL GRANULOCYTES THROUGH PROTEIN KINASE C

P.-A. Ollendorff¹ and J. Sellin¹ ¹Department of Pathology and Cell Biology, Umeå University, S-901 87 Umeå, Sweden; ²Present address: Infectious Diseases 8061, Washington University 660 S Euclid Ave. St. Louis, MO 63110

The increased sensitivity to infections in diabetes has long been associated with changes in neutrophil function. However, while most studies have focused on the involvement of hyperglycemia in the defective neutrophil function, knowledge on the role of insulin as a regulator of neutrophil function is scanty. In the present work, insulin (100 µU/ml) stimulated the chemokines of normal human neutrophils in the presence of 5 mM D-glucose but was affected by insulin (160 µU/ml) was totally inhibited by increasing the glucose concentration from 5 to 15 mM D-glucose. It was tested whether this effect of glucose is mediated by increase in protein kinase C (PKC) activity. Activation of PKC with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 100 nM dose-dependent inhibited insulin-stimulated neutrophil locomotion in the absence of insulin. Suboptimal concentrations of PMA (0.1 and 0.3 nM) inhibited the chemokinetic effect of 100 µU/ml insulin in a dose-dependent way. The specific PKC-inhibitor bisindolylmaleimide (GF 109203X) did not affect the insulin-stimulated chemokinesis at 5 mM glucose but restored the chemokinetic effect of 160 µU/ml insulin at 15 mM glucose. These results therefore suggest that glucose-induced PKC-activation may mediate the inhibitory effects of high glucose levels on insulin-stimulated chemokinesis in normal human neutrophils.

491.5

THE INTERACTION OF HEMOLYSIS AND HEMORRHAGE ON OXIDANT LEVELS AND TISSUE DAMAGE IN THE RAT

R.A. Conolly, A.V. Delgado, E.C. Mauldin, and G.W. Goodwin. US Army Institute of Surgical Research Ft. Sam Houston TX 78234

Transfusion of stored blood has been reported to increase infection rates in elective surgery patients, multiple organ failure in trauma patients, and recurrence of cancer in postoperative patients. Hemolysis in 35-day stored blood has been reported to be approximately 15%. We assessed the effect of 15% hemolysis on hemorrhage using a conscious, carotid artery-cannulated rat model. Approximately 55% of the blood volume was hemorrhaged and re-infused 2 h later with and without 15% hemolysis. PMNs isolated from treated rats at 2, 6, and 24 h post-hemorrhage produced increased levels of oxidants as compared to untreated rats. Serum liver enzymes (AST and LD) in rats receiving hemolyzed blood were elevated as compared to controls at 6 h post-hemorrhage. Body weights of treated rats in contrast to untreated rats decreased below pre-hemorrhage weights by post-hemorrhage day 5 and stayed decreased until the end of the 7-day study. A borderline significant increase in mortality (p=0.06) was observed in treated rats (3 of 7 died) during the post-hemorrhage period as compared to the untreated rats. Previous *in vitro* studies demonstrated that low levels of free hemoglobin increased nitric oxide production by activated human PMNs with concomitant cytotoxic effects in neighboring cells. We propose this same mechanism to account for the increased oxidant and tissue damage observed in this study and the increased mortality and morbidity associated with blood transfusion.

491.6

human TNF Uptake by Piv. Endothelial MHC Class I E Selectin and VCAM-1 Expression Reveal Human T Cells and Lymphocytes to be Microphages in a Chimeric Human/Mouse Model

Mary C. Kiper, Jeffrey S. Reichman, Daniel A. French, Joseph S. Baker, and Dennis T. Fisher. Molecular Cardiology, Baylor Center for Molecular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven CT 06510

We have developed an *in vivo* model to examine human T cell peptide presentation in immunodeficient SCID mice engrafted with pig stem cell reconstituted with human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC). We found that exogenous recombinant porcine interferon-γ (pIFN-γ) but not human IFN-γ initiated leukocytic infiltration and microvascular damage of p skin grafts. In a pig-to-human organ transplant the sole source of pIFN-γ would be derived from pig dendritic cell antigen presentation within the graft. It is therefore of clinical relevance to determine if other human proinflammatory cytokines such as TNF, could elicit a similar response. SCID mice were engrafted with pig thymus pig skin and four weeks later reconstituted with 1 × 10⁶ hPBMC. The grafts were treated systemically with various doses of rTNF every other day, and harvested after 1 week. Histologic and immunohistologic analysis was performed by a blinded observer using a semiquantitative scoring scale (0-3).

Higher doses of rTNF (10,000 and 3,000 ng) resulted in a leukocytic infiltrate and thrombosis of pig microvasculature in the absence of hPBMC, whereas lower doses (1,000 and 200 ng) had a hPBMC-dependent effect. Further analysis was performed in 1,000 ng rTNF-treated reconstituted recipients compared to saline-treated controls. Human CD3⁺ T cells were recruited into pig skin grafts (1.9 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.4, p=0.03). MHC class I⁺ 2.5 ± 0.12 vs 2.0 ± 0.23, E-selectin (1.2 ± 0.1 vs 0.5 ± 0.5), and ICAM-1 (2.2 ± 0.4 vs 1.9 ± 0.4) pig microvascular endothelial cell expression significantly increased (p < 0.05). MHC class II expression remained but did not achieve statistical significance (2.5 ± 0.2 vs 1.9 ± 0.2, p=0.2). Parallel *in vitro* studies using porcine aortic endothelial cells demonstrated similar upregulation of pMHC and adhesion molecules by rTNF.

Human TNF induces a marked upregulation of pig endothelial adhesion molecules and a more modest increase in MHC suggests resulting in human T cell infiltration and injury of pig endothelium. This phenomenon occurs in the absence of exogenous pIFN-γ with potential serious implications for clinical xenotransplantation.

491.7

MIGRATION OF DENDRITIC CELL (DC) PRECURSORS TO THE LUNG IS IMPAIRED IN CD18 MUTANT MICE

E.B. Schneidberger, Q. Yu, B.W. LeBlanc, D.M. Dornick, M. Moss. General Hospital and Harvard School Pub Health, Boston, MA

Bone marrow derived DC precursors migrate via the blood stream to peripheral tissues to adopt their sentinel function. To identify factors important in their migration to the lung, 6-8 week old mutant mice deficient in E-selectin, P-selectin, E/P-selectin, E/P-selectin/ICAM-1 or CD18 and their respective controls (kindly provided by Dr. ALBaudet, Baylor College of Medicine) were examined. DCs, monocytes and macrophages were identified in frozen sections of lungs from 3 mice/group by immunostaining with MS114 (MHC class II) and MOMA-2 (monocytes/macrophages) mAb. The number of DC and monocytes/macrophages per cm² of alveolar tissue and per cm of airway and venous parameters were determined morphometrically. Of these genotypes the numbers of DC and MOMA-2⁺ cells were low only in CD18 mutant mice by 67 and 43% in alveolar walls, 40 and 55% around airways and 25 and 50% veins, respectively (p < 0.05 compared with wild type mice). Although ICAM-1 mutant mice showed a trend toward over numbers of DC in the lungs, the difference did not reach statistical significance. These data suggest that CD18-mediated adhesion is required for emigration of DC precursors into the lung. However, the defect in DC emigration is only partial, suggesting that CD18 independent emigration also occurs, possibly involving VCAM-1/mouse mAb mediated adhesion. The absence of a significant defect in ICAM-1 mutant mice suggests that either alternatively spliced forms of ICAM-1 can recognize CD11/CD18 or that the CD11/CD18 complex is recognizing ligands other than CD11. Supported by NIH grant HL58761 and HL52666

491.8

THE MONOCYTE LOCOMOTION INHIBITORY FACTOR (MLIF) PRODUCED BY ENTEROCOCAL BIPHILUS INHIBITS NITRIC OXIDE (NO) PRODUCTION IN rTNF-STIMULATED HUMAN MACROPHAGES

K. Kishimoto, C. Chen, and E. Liorio. Department of Infectious Diseases, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205

E. coli produces a polysaccharide (MLIF) (MW 554 Dalton) with anti-inflammatory properties. Without harming the cells, it decreases the *in vitro* locomotion of human monocytes (MP) but not that of neutrophils and eosinophils polymorphonuclear leukocytes (PMN), and causes the respiratory burst (Respiratory Oxygen Intermediates (ROI)) of both MP and neutrophils. PMN, unlike MP, require only the co-stimulus of this effect. *In vivo* MLIF delays the arrival of monocytes/leukocytes in human. Reduced tumor necrosis and related protein hyperpermeability responses to DNCB in guinea pigs. We now studied the effect of MLIF on NO production. Recombinant Nitric Oxide Synthase (rNOS) in human rNOS-expressing cells (NO⁺ cells) were stimulated by rTNF. NO production was measured by a synthetic substrate (Diazotized diacetyl diuretic) (DAD) or a synthetic substrate (Diazotized diacetyl diuretic) (DAD) or a synthetic substrate (Diazotized diacetyl diuretic) (DAD). The results increase in NO production after rTNF stimulation (0.11 ± 0.04 µM/ml) (x = mean) was reduced (p < 0.01) to about half by the addition of MLIF (0.25 ± 0.037 µM/ml) or its synthetic substrate (0.231 ± 0.017 µM/ml). This effect is not as strong as the co-stimulus of rNOS production by MLIF under conditions *in vitro* conditions, yet appears to be enough to constitute yet another evasion mechanism used by *E. coli* to avoid host defense mechanisms. (CONTRACT grant 12067-M-0001)

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

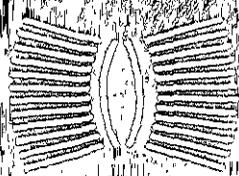
Leandro Zaragoza E, Rico Rosillo G, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR. Efecto del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) Sobre la Producción de Óxido Nítrico (NO) en Macrófagos Humanos. VIII Reunión Nacional de Investigación Médica Oaxtepec Mor México D.F. 1998.

Kretschmer RR, Rico G, Leandro Zaragoza E. The monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced By *Entamoeba histolytica* Inhibits Nitric Oxide (NO) Production in rhIFN- γ Stimulated Human Macrophages. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. San Francisco USA 1999.

Leandro Zaragoza E, Rico Rosillo G, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR. El FILM Deprime la Producción de Óxido Nítrico (NO) en Macrófagos Humanos. XIX Jornada de Investigación Hospital de pediatría CMN Siglo XXI, México D.F. 1999.

Trabajos Colaterales:

Vega Robledo GB, Leandro Zaragoza E, Rico Rosillo G. Función oxidativa del neutrófilo modificada por *Entamoeba histolytica* en presencia de Zn. Depto de Medicina Experimental, Facultad Medicina UNAM, Depto de Inmunología, H de Pediatría CMN. México D.F. Enviado a publicación.



VII REUNIÓN NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN MÉDICA

INSTITUTO MEXICANO DE SEGURIDAD SOCIAL

MEMORIAS

Quintec Mot; 24-26 de septiembre de 1998

2. EFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS (FILM) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN MACRÓFAGOS HUMANOS.

Rico Rosillo G, Leandro Zaragoza E*, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR. Unidad de Investigación Médica en Inmunología H de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI *Universidad del Valle de México, D F

INTRODUCCIÓN: Los reactivos intermedios de nitrógeno (RNI NO, NO₂ y NO₂) han mostrado recientemente ser un importante – quizás el principal – agente lítico usado por macrófagos murinos contra *Entamoeba histolytica in vitro*. En nuestro laboratorio, por otra parte, hemos identificado un pentapéptido (factor inhibidor de la locomoción de monocitos humanos (FILM)) (secuencia identificada Confidencialidad de paciente México, EUA) termoestable, con peso molecular de 583 Da producido por *E. histolytica* en cultivos axénicos y que, sin dañar a las células, también cancela literalmente la producción de reactivos intermedios de oxígeno (ROI) e H₂O₂, -OH, -O₂ pero ahora en monocitos y polimorfonucleares neutrofilos humanos, mas no en eosinofilos

OBJETIVO: Determinar el efecto del FILM y un analogo sintético sobre la producción de RNI (óxido nítrico (NO)) producido por macrófagos humanos activados por medio de IFN- γ y TNF- α , estimuladores reconocidos de la producción de NO

MATERIAL Y MÉTODO: Las células se obtuvieron de sangre periférica de paciente sanos. Los mononucleares se separaron primero por un gradiente Ficoll-Hypaque con una δ 1.077. Las células de la interfase se lavaron y se resuspendieron en RPMI-1640, se les determino viabilidad por exclusión de azul tripano y se colocaron en cantidad de 3×10^6 cel/pozo. Despues de 2 hrs de incubacion a 37° C y 5% de CO₂, se eliminó el sobredante con las celulas no adheridas (linfocitos) y se agregó medio RPMI-1640 suplementado rindiendo este paso 0.15×10^5 monocitos. Las placas se incubaron durante siete dias para permitir la maduración de monocitos a macrófagos. Las células se estimularon chora con IFN- γ o TNF- α (100 u/pozo o bien 1 ng/pozo, respectivamente) así como con los eventuales inhibidores, i.e FILM y un analogo sintético (10 μ /pozo en cada caso). La producción de NO (en forma de NO₂) se midió mediante la reacción de Griess en sobrenadantes obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs de incubacion. Como testigos se utilizaron macrófagos cultivados sin estímulo alguno, y otros expuestos solamente al FILM o a su analogo sintético

RESULTADOS: Cuando los macrófagos se estimularon con IFN- γ hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) a las 24, 48 y 72 hrs (0.099, 0.018 y 0.031 μ M respectivamente) cuando se compararon con los testigos (0.037, 0.040 y 0.041 μ M). La estimulación por TNF- α fué algo menor y se observó solo a las 48 y 72 hrs (0.054, 0.178, 0.191 μ M respectivamente). El FILM y su analogo solos, estimulan a los macrófagos en forma similar al TNF- α . El posible efecto del FILM (y su analogo sintético) sobre la producción de NO en macrófagos se estudio exclusivamente utilizando cultivos de 72 hrs (maxima producción NO). El FILM, así como su analogo sintético, son capaces de inhibir aproximadamente el 50% de la respuesta que hay con INF- γ (0.431 μ M vs. 0.258 μ M, $p < 0.05$), pero aparentemente no afecta la exigua producción de NO inducida por TNF- α

CONCLUSIONES: El FILM deprime la producción de NO subsecuente a la estimulación con INF- γ aunque no tan vigorosamente como suele deprimir la respuesta de los ROI. EL FILM y su analogo parecen poseer una discreta capacidad de inducir la producción de NO en macrófagos, comparable a la débil producción que se logra con TNF- α . Este efecto sin embargo no oculta el efecto inhibitor del FILM (y su analogo) sobre la

EL FILM DEPRIME LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO (NO) EN MACROFAGOS HUMANOS

*Leandro Zaragoza E., Rico Rosillo G, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR. Unidad de Investigación Médica en Inmunología. H. de Pediatría CMN. Siglo XXI. * Universidad del Valle de México.

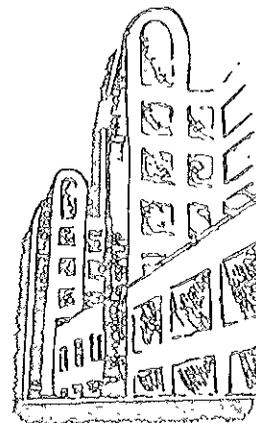
INTRODUCCION *Entamoeba histolytica* produce un pentapéptido (FILM) (584Da) con propiedades antiinflamatorias que, sin dañar a las células, inhibe la locomoción *in vitro* de monocitos humanos (FM) pero no la de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos (PMN), y cancela el estallido respiratorio (Reactivos Intermedios de Origen (ROI)) de FM y PMN neutrófilos, más no de eosinófilos. *In vivo* el FILM retrasa el erizo de FM humanos en ventanas de Rebuck e inhibe la reacción de hipersensibilidad por contacto al DNCB en cobayas. Los reactivos intermedios de nitrógeno (RNI NO, NO₂ y NO₃) han mostrado recientemente ser un importante agente lítico usado por macrófagos murinos contra *E. histolytica in vitro*.

OBJETIVO. Determinar el efecto del FILM y un análogo sintético sobre la producción de RNI (óxido nítrico (NO)) producido por macrófagos humanos activados con IFN-γ, un conocido estimulador de la producción de NO.

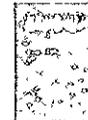
MATERIAL Y METODO. Los FM se obtuvieron de sangre periférica humana por medio de un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077, se resuspendieron en RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino y se colocaron en placas de 24 pozos a una concentración de 3×10^6 células/pozo. Después de 2 horas de incubación, se eliminó el sobrenadante con las células no adheridas y se completó el volumen a un ml con el mismo medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 7 días para permitir la maduración de los monocitos a macrófagos. Las células se estimularon con 100 U/poro de IFN-γ así como con los eventuales inhibidores. FILM y un análogo sintético (10 μg/poro). La producción de NO se midió mediante la reacción de Griess en sobrenadantes obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs de incubación.

RESULTADOS La producción de óxido nítrico se incrementó diez veces después de la estimulación con r-IFN-γ (0.431 ± 0.043 μM/poro). El NO es reducido (p < 0.05) aproximadamente a la mitad mediante la edición de FILM (0.258 ± 0.037 μM/poro) o de su análogo sintético (0.231 ± 0.017 μM/poro).

CONCLUSION El FILM deprime la producción de NO subsecuente a la estimulación con rIFN-γ aunque no tan vigorosamente como suele deprimir la respuesta de los ROI. El FILM y su análogo parecen poseer una discreta capacidad de inducir la producción de NO en macrófagos. Este efecto sin embargo no oculta el efecto inhibitor del FILM (y su análogo) sobre la vigorosa producción de NO lograda con rIFN-γ.



Hospital de pediatría
15 al 19 de marzo de 1999



Reunión
Académica



Jornadas de
Investigación



Reunión de
Enfermería



Zinc: As a modifier of *Entamoeba histolytica* activity upon the human neutrophil respiratory burst

Gloria B. Vega-Robledo¹, Erika Leandro², Guadalupe Rico²

Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 06726 México, D.F., México¹, Departamento de Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06726 México, D.F., México²

Running head: Zinc: As a modifier of *Entamoeba histolytica* activity.

B. Vega-Robledo (✉)

Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM-Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726 México, D. México

fax: 525-56-23-26-69



October 8, 1999

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

H Mehlborn

Heinrich-Heine-Universität

Zellbiologie und Parasitologie,

Universitätsstrasse 1 (Geb.26.03.00.70)

D-40225 Düsseldorf, GERMANY

Gentleman

I am submitting a manuscript entitled "Zinc: As a modifier of *Entamoeba histolytica* action upon the human neutrophil respiratory burst" by Vega-Robledo et al, for consideration for publication in PARASITOLOGY RESEARCH.

Thank you in advance for your attention.

Sincerely,


Dra. Gloria Vega-Robledo