

51262



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EFFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE LOS
MONOCITOS (FILM) PRODUCIDO POR *Entamoeba histolytica* SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LEUCOCITOS HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS)**

P R E S E N T A:

BIOL. SARA ROJAS DOTOR

ASESORA: DRA. GUADALUPE RICO ROSILLO

MEXICO, D. F.

2001

200402



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de investigación Biomédica del Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Rico Rosillo. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 3206P-M9607

Este trabajo se lo dedico con admiración y amor a mi esposo

Dr. Victor Manuel Dominguez Hernández

Por tu apoyo incondicional, por tus palabras de aliento en los momentos desafortunados, por infundirme valor, tranquilidad y confianza, por tu paciencia, por ser como eres.

A mi hijo

Víctor David, por hacer mis días hermosos, aún los difíciles

A la memoria de mi padre

Sr. Constantino Rojas García

Porque siempre estarás en nuestro corazón

A mi madre

Sra. Ma. Teresa Dotor Venegas

Con admiración porque superaste todos los retos

AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño agradezco al **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL** por haberme otorgado una beca para poder realizar mis estudios de maestría.

Este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin el apoyo brindado por personas de gran calidad humana como el **Dr. José Ramón Paniagua Pérez** al cual expreso mi gratitud.

Al **Dr. Roberto Kretschmer Schmid** por todo el apoyo brindado durante la realización del trabajo experimental.

De manera especial agradezco a mi Asesora de Tesis

Dra. Guadalupe Rico por ser parte esencial en mi formación académica, por la confianza depositada en mi, por sus conocimientos, enseñanza y acertada dirección en la elaboración de esta tesis.

Gracias a mis revisores de tesis

Dr. Juan A. Giménez-Scherer por compartir sus conocimientos, por sus acertados comentarios, y por su aptitud siempre positiva.

Dr. Alberto Monroy por compartir sus ideas, por ser un buen maestro, pero sobre todo por ser un buen inmunólogo.

Dra. Ma. De Lourdes Mora, por revisar esta tesis, por su disposición, consejos y sugerencias para lograr esta meta

Dr. Alfredo Leños por la orientación brindada en la elaboración de esta tesis, por transmitir sus conocimientos médico–científicos y por su amistad.

**EFFECTO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE LOS
MONOCITOS (FILM) PRODUCIDO POR *Entamoeba histolytica* SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LEUCOCITOS HUMANOS**

**TUTOR DRA. GUADALUPE RICO ROSILLO
CO-TUTOR DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
CO-TUTOR DR. JUAN A. GIMÉNEZ-SCHERER
CO-TUTOR DR. ALFREDO LEAÑOS MIRANDA
CO-TUTOR DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA**

ÍNDICE	PÁGINA
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	2
2.1 Importancia	7
2.2 Epidemiología	7
2.3 Granulocitos	8
2.4 Monocitos y macrófagos	12
2.5 Inmunidad innata o inespecífica	13
2.6 Respuesta inmune humoral	14
2.7 Complemento	15
2.8 Óxido nítrico	17
2.9 Respuesta inflamatoria	22
3 ANTECEDENTES	27
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
5 OBJETIVO	31
6 HIPÓTESIS	31
7 MATERIAL Y MÉTODOS	32
7.1 Cultivo de amibas	32
7.2 Obtención de sobrenadantes de cultivos amibianos y caracterización del FILM	32
7.3 Verificación de la actividad biológica del FILM	33
7.4 Obtención de fagocitos mononucleares(FM) humanos	33
7.5 Obtención de polimorfonucleares (PMN) humanos	34

7.6	Estimulación de FM y PMN	35
7.7	Determinación de óxido nítrico (NO)	36
8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
9	RESULTADOS	37
10	DISCUSIÓN	50
11	CONCLUSIONES	54
12	PERSPECTIVAS	55
13	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
14	ANEXOS	70
14.1	Artículos publicados y enviados para su publicación	70

ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
AHAE	Absceso hepático amibiano experimental
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
Da	Daltones
DNCB	1-cloro 2-4 dinitrobenceno
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida
FILM	Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos
FM	Fagocitos mononucleares
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacarido de <i>Escherichia coli</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₂ Cl	Cloruro de nitrilo
NO ₂ ⁻	Nitritos
NO ₃ ⁻	Nitratos
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMNe	Polimorfonucleares eosinófilos
PMNn	Polimorfonucleares neutrófilos
rhIFN- γ	Interferón gamma recombinante humano
rhTNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa recombinante humano
RNI	Reactivos intermediarios del nitrógeno
ROI	Reactivos intermediarios del oxígeno
SFB	Suero fetal bovino

RESUMEN

El sobrenadante de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* contiene un pentapéptido llamado Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM), que inhibe la locomoción de monocitos humanos (FM), sin afectar la de los polimorfonucleares neutrófilos (PMNn), y deprime el estallido respiratorio post-fagocítico en ambas estirpes de leucocitos. Actualmente se ha logrado sintetizar el FILM (FILMs) el cual posee propiedades idénticas al FILM natural (FILMn). Este trabajo evaluó si el FILMn como el FILMs ejercen efecto inhibitorio sobre los reactivos intermediarios de nitrógeno en FM y PMN humanos. Las células fueron activadas con rhIFN- γ , rhTNF- α , ionomicina, LPS y PMA; en presencia y ausencia de FILMn o FILMs. La máxima producción de nitritos por FM activados con IFN- γ , fue a las 72 h ($0.427 \pm 0.014 \mu\text{M}/100 \mu\text{l}$) y la inhibición ejercida por FILMn o FILMs fue de 46%. En tanto para los PMN activados con IFN- γ o PMA la producción máxima de nitritos fue de $0.306 \pm 0.084 \mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ y de $0.218 \pm 0.040 \mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ respectivamente a las 24 h. La inhibición por FILMn o FILMs fue de 80%. En la producción de óxido nítrico, estos resultados sugieren que el FILM puede contribuir al establecimiento del absceso hepático amibiano, y al notorio retardo de los cambios inflamatorios tardíos observados en estas lesiones. El FILMn y el FILMs provocan una inhibición importante, en la producción de los reactivos intermediarios de nitrógeno (moléculas altamente citotóxicas) que son esenciales en la defensa del huésped contra parásitos intra y extracelulares.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un protozoo que pudo haber tenido un origen de evolución a partir de la amiba de vida libre *Entamoeba moshkovski* que tiene una morfología idéntica [1]. La *E. histolytica* presenta dos formas morfológicas: a) un quiste relativamente resistente, forma infectante, que causa la transmisión de la enfermedad y b) un trofozoíto o amiba que difícilmente sobrevive fuera del huésped, forma patogénica, figuras 1 y 2. Los quistes se forman cuando los trofozoítos se desplazan hacia el recto. Algunos de los trofozoítos maduros se redondean, pierden sus inclusiones citoplásmicas y secretan una pared celular rígida de quitina, transformándose en quistes esféricos uninucleados de 7 a 15 μm , los que son muy resistentes a las condiciones medioambientales adversas. El hombre se infecta al ingerir quistes maduros del parásito. Los factores más comunes de transmisión comprenden alimentos contaminados, eliminación de excretas al aire libre, falta de higiene, tratamiento inadecuado del agua y hábitos sexuales no ortodoxos [2]. La pared del quiste se digiere en el intestino delgado, la amiba multinucleada resultante se divide por fisión binaria, en 4 a 8 trofozoítos aproximadamente cada ocho horas [3].

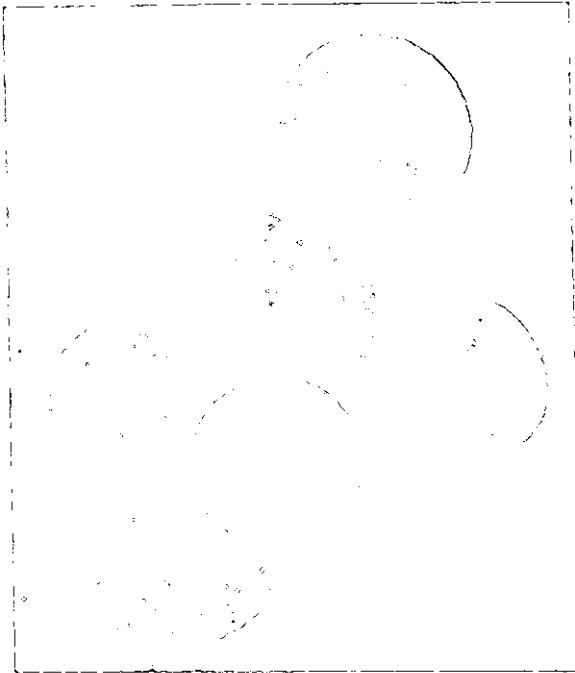


Figura 1. Quiste de *E. histolytica* obtenidos de las heces de un portador asintomático. (Martinez-Palomo. Amibiasis Ed. Médica Panamericana)

Los trofozoitos miden de 15 a 60 μm de diámetro y presentan movimientos unidireccionales notables mostrando pseudópodos de ectoplasma dentro de los cuales fluye el endoplasma granuloso, tienen un solo núcleo y diversas vacuolas alimenticias. Los trofozoitos de *E. histolytica* pueden permanecer en la luz del intestino como comensales sin producir daño aparente, pero ocasionalmente, por razones que no se conocen, invaden el epitelio intestinal, y producen lo que se conoce como amibiasis invasora, que es altamente destructiva y causa necrosis rápida y extensa, así como licuefacción de todos

los tejidos que alcanza, el más frecuente es el hepático, pero también puede invadir pulmón, bazo, cerebro, cartilago, hueso y piel [4,5]. Se ha encontrado que las cepas patógenas de *E. histolytica* difieren de las cepas aisladas de los portadores asintomáticos y de otras especies de *Entamoeba* no patógenas en algunas de sus propiedades de superficie, tales como el grado de aglutinación por concavalina A, ausencia de carga de superficie y mayor velocidad fagocítica en las cepas patógenas [6].



Figura 2. Fotomicrografía electrónica de barrido de un trofozoíto de *E. histolytica* fagocitando simultáneamente varias células epiteliales (Martínez-Palomo Amibiasis Ed. Médica Panamericana)

La fagocitosis, y de manera específica la eritrofagocitosis, está estrechamente relacionada con la patogenicidad o la virulencia de las cepas de amibas. Un trofozoito virulento puede fagocitar de 10 a 20 eritrocitos por hora (figura 3). Esta fagocitosis se realiza con mayor velocidad y cantidad que en las cepas no patógenas. La eritrofagocitosis se ha considerado tradicionalmente como uno de los principales criterios para identificar los trofozoítos patógenos de *E. histolytica* [7].



Figura 3. Porción del citoplasma periférico de un trofozoito fagocitando un glóbulo rojo humano. (Martinez-Palomo. Amibiasis Ed. Médica Panamericana)

Los mecanismos fisiopatológicos que llevan a cabo los trofozoítos de *E. histolytica* para producir lisis se han estudiado en cultivos celulares en donde se identifican cuatro etapas específicas: a) adhesión b) citólisis posterior al contacto c) fagocitosis y d) degradación intracelular. La adhesión de las amibas a la célula blanco y los componentes de la matriz extracelular parecen ser un pre-requisito para que haya lisis por lo menos en experimentos *in vitro* y este proceso es mediado por adhesinas amibianas, vía lectina-galactosa [8,9]. Después que se presenta la citólisis por contacto sobre las células blanco, las amibas patógenas ingieren a las células lisadas, sin embargo también pueden consumir células vivas [10].

La amibiasis intestinal puede producir una amplia variedad de alteraciones, con cuadros clínicos bien definidos, los cuales se conocen como colitis ulcerativa amibiana, disentería amibiana fulminante, ameboma y apendicitis amibiana. La amibiasis hepática se caracteriza por la presencia de una o más áreas de necrosis [11]. Estos parásitos probablemente alcancen el hígado por vía portal o linfática. La amiba es portadora de una enzima proteolítica que origina una necrosis localizada del parénquima hepático, que al progresar da lugar a una formación quística llamada "absceso hepático amibiano" (AHA) [1]. En la disentería, las manifestaciones clínicas son diarrea con moco y sangre, dolor abdominal y fiebre. El ameboma, es una tumoración inflamatoria, se

localiza con mayor frecuencia en el ciego, presenta complicaciones raras pero importantes y se puede confundir con tumores. El criterio principal para el diagnóstico es la presencia de *E. histolytica* en las lesiones [12].

IMPORTANCIA

La amibiasis es una parasitosis causada por *E. histolytica*, su distribución es cosmopolita y generalmente se asocia a condiciones socioeconómicas y hábitos higiénicos pobres, con mala nutrición en países en desarrollo [13]. La Organización Mundial de la Salud considera que alrededor de 480 millones de personas se encuentran infectadas por este parásito y que el 10% de ellos ha sufrido de amibiasis invasora. El problema adquiere relevancia cuando se estima que anualmente mueren en el mundo entre 40 mil y 110 mil individuos a causa de las complicaciones intestinales y extraintestinales que ocasiona esta enfermedad [14].

Se considera que la amibiasis invasora constituye la tercera causa de muerte entre las enfermedades infecciosas producidas por parásitos, superada sólo por la malaria y la esquistosomiasis [15].

EPIDEMIOLOGÍA

Aunque la *E. histolytica* puede infectar ocasionalmente el tubo digestivo de algunos animales, como perros, gatos, ratas y monos, el principal huésped y reservorio es el humano, se calcula que alrededor del 10% de la población

mundial alberga al parásito y aproximadamente el 90% de las personas infectadas son portadoras asintomáticas [16]. Actualmente se identifican dos especies de *Entamoeba* indistinguibles morfológicamente: una patógena e invasora; *E. histolytica* y otra comensal, no invasora; *Entamoeba dispar* (*E. dispar*). Esto cambia la epidemiología de la amibiasis, puesto que la mayoría de los portadores asintomáticos están infectados con *E. dispar* [17].

E. histolytica se distribuye mundialmente, puede encontrarse desde el Ártico, donde fue descubierta, hasta los trópicos, cifras del orden del 40 al 50% de la población puede albergar quistes. La enfermedad esta difundida en el norte de África (Egipto, Sudán, Marruecos) y en la costa occidental (Congo, Senegal, Gambia, Camerún); en Asia (Turquía, China, Indochina, India y Malasia), y en América en EE.UU comprende del 2 al 3% de la población infectada. En México diversos trabajos muestran que el 8.3% de los individuos son seropositivos [3,13,18], es considerada una enfermedad endémica que se extiende por todo el país, por lo que representa un grave problema de salud pública [19,20].

GRANULOCITOS

La sangre periférica contiene tres tipos de granulocitos, que se clasifican en neutrófilos, eosinófilos y basófilos de acuerdo a las características de tinción de sus gránulos citoplasmáticos [21].

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMNn) son los leucocitos más abundantes de la circulación, donde tienen una existencia breve entre su formación en la médula ósea y su actividad fagocítica y microbicida subsecuente en los sitios tisulares de la inflamación. Son los responsables primarios de la conservación de las defensas normales del huésped contra microorganismos invasores y son los elementos preponderantes en la mayor parte de las formas de inflamación aguda, en particular durante la etapa inicial de la respuesta inflamatoria. El neutrófilo tiene un núcleo multilobulado, segmentado (2 a 5 lobulos), que contiene cromatina densamente aglomerada y sin nucléolos. El neutrófilo maduro es notoriamente deficiente en retículo endoplásmico rugoso, lo cual indica que la síntesis de proteína nueva no es una función importante. Se distinguen dos tipos de gránulos: los gránulos primarios que se conocen también como gránulos azurofilicos, debido a su aspecto azuloso en la tinción de Wright. Contienen mielo-peroxidasa y otras hidrolasas lisosómicas. Los gránulos secundarios, conocidos también como gránulos específicos, contienen lactoferrina y superan en número a los gránulos azurofilicos (3:1). Los PMNn se derivan de la médula ósea. Las células estromáticas medulares producen factores como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófago (GM-CSF), e interleucina 3 (IL-3) que estimulan a los precursores de los PMNn a proliferar

y a diferenciarse en células maduras, permanecen ahí alrededor de cinco días, luego circulan cerca de diez horas antes de entrar a los tejidos en sitios de inflamación.

Los polimorfonucleares maduros, abandonan la sangre en el curso de una inflamación, atravesando los vasos sanguíneos por diapédesis. Una vez que llegan a los espacios extravasculares, los polimorfonucleares sólo sobreviven algunos días [22, 23, 24].

Los eosinófilos son leucocitos polimorfonucleares, producidos en la médula ósea, que llegan a los tejidos a través del torrente circulatorio. Su nombre se debe a sus propiedades de tinción, ya que sus gránulos se tiñen con colorantes ácidos (eosina). Debido a la carencia de proteínas específicas de su superficie membranal, la coloración de sus gránulos sigue siendo un criterio válido para diferenciarlo de los otros leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y basófilos). Los eosinófilos son semejantes en tamaño a los neutrófilos pero tienen un núcleo bilobulado y gránulos citoplásmaticos específicos, que contienen enzimas lisosomales y la mayoría de las proteínas catiónicas de los eosinófilos: Los gránulos poseen un núcleo cristaloides compuesto por la proteína básica principal (MBP), una matriz que contiene la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa eosinófilica (EPO). Los eosinófilos también contienen dos tipos de gránulos: los primarios, que carecen de núcleo cristaloides y se forman temporalmente en la maduración de las células; y gránulos pequeños que

contienen aril-sulfatasa y otras enzimas. En la circulación encontramos a los eosinófilos en número reducido (0.5-1.5% del total de los leucocitos). Son capaces de secretar sus compuestos granulados almacenados, mediadores, lípidos recién formados y productos del metabolismo del oxígeno, los cuales pueden afectar a las células y tejidos adyacentes en el proceso de inflamación [21,22, 25, 27].

Los basófilos se encuentran en pequeñas cantidades en la circulación, siendo menos del 0.2% de los leucocitos. Los basófilos maduros tienen gránulos aleatoriamente distribuidos delimitados por membranas, los gránulos contienen heparina, histamina y factor quimiotáctico anafiláctico. Los estímulos para la degranulación son alérgenos (antígeno que causa reacciones alérgicas). Un alérgeno para ser eficaz debe unirse con moléculas de IgE en la superficie de los basófilos, vía receptores Fc de alta afinidad. La degranulación del contenido total ocurre rápidamente y es por fusión intracitoplasmática de los gránulos, seguida de la descarga de su contenido. Los mediadores como la histamina, liberados por degranulación, causan los síntomas adversos de la alergia pero, por otra parte, tienen un papel importante en la inmunidad contra parásitos [21,27].

MONOCITOS Y MACRÓFAGOS

El sistema fagocítico mononuclear constituye la segunda población celular principal del sistema inmunitario y consta de células de una estirpe común cuya función básica es la fagocitosis.

Todas las células del sistema mononuclear se originan en la médula ósea y, tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes formas morfológicas. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica tras dejar la médula ósea no está completamente diferenciado y se llama monocito. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15 μM , un núcleo en forma de pera y un citoplasma finamente granulado que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas, filamentos citoesqueléticos y gránulos azurofílicos. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos, que también se denominan histiocitos.

Comparten con los neutrófilos una función esencial en la defensa del huésped contra la infección, que incluye ingestión y lisis de microorganismos y liberación de factores que intervienen en la defensa y en la inflamación. Su vida es larga, pueden diferenciarse *in situ*, y aparecen en lesiones inflamatorias después de las primeras 8 a 12 horas [21, 23, 25, 26, 27].

Los macrófagos pueden encontrarse en tejido linfático, conectivo, bazo, riñón, útero, cerebro, hígado (células de Kupffer) y alveolos pulmonares, donde pueden vivir meses, incluso años [24,25]. En condiciones *in vitro* los monocitos/macrófagos se adhieren fuertemente a superficies de vidrio o

plástico y fagocitan activamente microorganismos o células tumorales. La adherencia o ingestión ocurre cuando los macrófagos se unen a microorganismos a través de receptores especializados. Los receptores pueden unir a ciertos carbohidratos o a la pared celular microbiana, anticuerpos IgG o complemento con los cuales los microorganismos pueden estar cubiertos (opsonizados) [21,26]. Los macrófagos además fagocitan macromoléculas incluidos los antígenos, tejidos propios lesionados o muertos como hematíes, y esto puede implicar a receptores para fosfolípidos y azúcares, también producen citocinas que atraen a otras células inflamatorias como los neutrófilos, y son responsables de muchos de los efectos sistémicos como la fiebre [27].

RESPUESTA INMUNE

Inmunidad innata o inespecífica

La inmunidad mediada por células desempeña un papel importante en la respuesta inmunológica humana contra la amibiasis. Las pruebas obtenidas en humanos y animales de experimentación indican que los individuos con amibiasis invasora se vuelven susceptibles a organismos oportunistas, los que serían fáciles de controlar bajo condiciones normales, existe además un estado transitorio de inmunosupresión de la respuesta inmune celular (deprimen fundamentalmente las funciones de los linfocitos T) y también como lo indican los estudios de hipersensibilidad retardada, de la producción de

linfocinas y del índice CD4, CD8, este último hallazgo es importante debido a que las células CD8 pueden ser responsables tanto de la inmunosupresión, como de la citotoxicidad de los trofozoítos de la *E. histolytica*, producidas por los linfocitos T activados en diferentes etapas de la amibiasis invasora [28].

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Se han encontrado anticuerpos contra *E. histolytica* de la clase IgA secretora en secreciones de íleo, colon así como en las heces de pacientes con absceso hepático amibiano, en la bilis de ratas inmunizadas por vía intracecal, en la leche humana y en el calostro. Los niveles de IgG y en menor proporción los de IgM, IgA e IgE se encuentran elevados en la amibiasis intestinal invasora [29,30]. Este aumento en los niveles globales de las inmunoglobulinas podría deberse a la activación policlonal de las células productoras de anticuerpos específicos contra las amibas. [31].

Las reacciones cutáneas de hipersensibilidad inmediata se han descrito mediante el uso de material antigénico obtenido de *E. histolytica* cultivada en medios axénicos o monoxénicos, en estos estudios se han registrado altos índices de hipersensibilidad cutánea inmediata en pacientes con amibiasis intestinal (79-91%) y hepática (78-95%) El suero inmune humano inactivado por medio de calor o su fracción gammaglobulina puede inhibir el desarrollo de *E. histolytica in vitro* y neutralizar su virulencia. También puede inhibir tanto la

eritrofagocitosis, como la acción citotóxica de amibas virulentas sobre células en cultivo, pero no sobre los leucocitos [32].

COMPLEMENTO

En estudios previos se observó que la resistencia a la lisis mediada por el complemento puede constituir un marcador *in vitro* de la virulencia amibiana [33], las amibas tienen la capacidad de activar el complemento a través de las vías clásica y alterna, los trofozoítos intactos son capaces de fijar entre $5 - 6 \times 10^6$ moléculas de C3b por célula, la fijación del complemento por lo regular produce lisis de la mayoría de los trofozoítos tratados reiteradamente *in vitro*, con suero humano son más resistentes a la acción del complemento, el esclarecimiento a nivel molecular puede ser de importancia para comprender la supervivencia del parásito en la sangre cuando efectúa su migración del intestino al hígado [34].

En la activación del complemento por *E. histolytica*, se ha visto involucrada una proteinasa extracelular, Reed y col. [35] presentan evidencias de que proteinasas de cisteína extracelulares de los trofozoítos pueden engañar la respuesta normal del huésped por degradación proteolítica de las anafilotoxinas C3a y C5a.

Reed y col. en 1983 [36] demostraron que la virulencia de *E. histolytica* parece correlacionarse con la resistencia al ataque del complemento, Braga y col. [37] mostraron que la lectina amibiana (adhesina) es capaz de unir componentes del complemento humano C8 y C9 agregando adhesinas a trofozoítos sensibles al complemento, estos se transforman para hacerse resistentes al ataque del complemento, lo que revela un comportamiento altamente adaptativo del protozoario, el cual mediante una estrategia molecular de mimetismo de las proteínas reguladoras del complemento evade los mecanismos de defensa del huésped [9].

Además, *E. histolytica* evade exitosamente la respuesta inmune humoral del huésped a través de mecanismos que no se deben a variación o imitación antigénica del mismo, sino que puede adherir material del medio y del huésped para enmascarar de este modo sus antígenos de superficie, otro mecanismo de evasión es la redistribución de la superficie donde hay anticuerpos adheridos formando casquetes que subsecuentemente se internalizan o dispersan, las amibas sintetizan y remueven su membrana celular aproximadamente en 20 minutos, así la internalización o la dispersión de los anticuerpos adheridos a la superficie protegen a la amiba de la acción deletérea de los anticuerpos y tal vez del complemento, en forma alternativa los anticuerpos unidos a la membrana de las amibas pudieran ser digeridos *in situ* por potentes proteinasas no específicas que se encuentran en ese lugar,

también es posible que la falta de activación apropiada por las cepas virulentas o un mecanismo diferente que también protege a la ameba de su propia proteína formadora de canales iónicos (amebaporo) pudieran participar en este caso [38, 39].

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un derivado del nitrógeno guanidino de la L-arginina y del oxígeno molecular, es una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que existe principalmente en dos isoformas: la isoforma NOS constitutiva (cNOS), que es expresada por células endoteliales, las cuales son activadas por un incremento de iones Ca^{2+} intracelular y forma pequeñas cantidades de NO, el cual actúa localmente. La isoforma NOS inducible (iNOS), expresada en macrófagos, es activada por citocinas pro-inflamatorias como interferón gamma ($IFN-\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) y lipopolisacáridos bacteriales (LPS) [40]. El NO es una importante molécula citotóxica efectora que tiene una vida muy corta (segundos). En presencia de oxígeno y agua, el NO interactúa por sí mismo y genera otros reactivos intermediarios del nitrógeno, para finalmente descomponerse en forma de nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), los cuales son moléculas estables y que permiten su medición [41] figura 4.

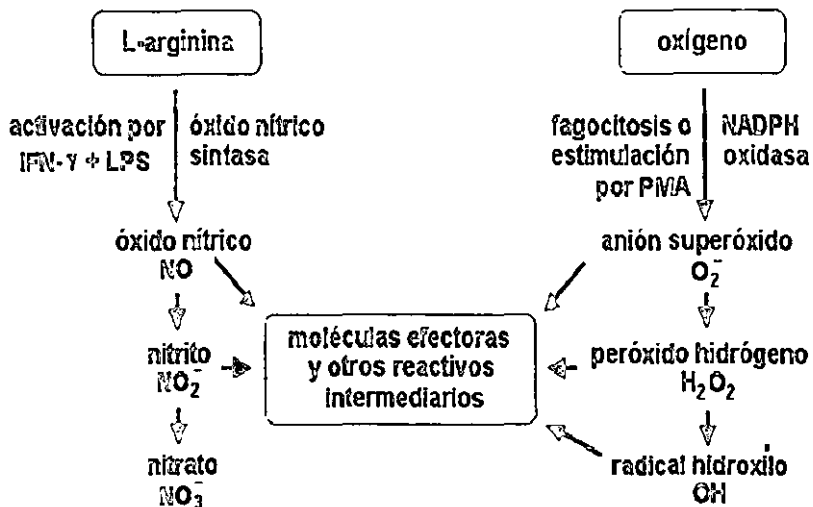


Figura 4. Diagrama de flujo que muestra los caminos para la producción de reactivos intermediarios del nitrógeno y del oxígeno por macrófagos activados de ratón. (Green JS y col. (41))

El NO puede ser producido por varios tipos celulares como los fagocitos mononucleares (FM), polimorfonucleares neutrófilos (PMNn) y eosinófilos (PMíNe), hepatocitos, células endoteliales y musculares (tabla 1) [42,43,44]. Recientemente se ha observado que los PMNn activados con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), son capaces de generar NO [46].

Tabla 1 Células de mamífero que expresan iNOS

TIPO CELULAR	ESPECIES
Astroцитos	humano, ratón
miocitos cardiacos	rata, cobayo, conejo
Condroцитos	conejo, humano
células endoteliales (ahorta)	porcinos, bovino, rata
células endoteliales (cerebro)	ratón
células endoteliales (islotos)	rata
células epiteliales (mucosa gástrica)	rata
células epiteliales (intestino)	rata
células epiteliales (riñón)	rata
células epiteliales (retina)	bovino, rata
fibroblastos (pulmón)	rata
fibroblastos (meninges)	rata
fibroblastos (piel)	ratón
Hepatocitos	rata, humano
células de islotes β	rata
Queratinocitos	humano
células de Kupffer	rata
macrófagos (sangre)	rata, humano
macrófagos (medula ósea)	rata, bovino
macrófago (pulmón)	rata
macrófagos (peritoneo)	ratón, rata
células gliales	ratón, rata
microglia	ratón, rata
células neuronales	ratón
Neutrófilos	ratón, humano
células ováricas	rata
Osteoblastos	rata, humano, ratón
células de músculo liso vascular	conejo, porcino, humano

Tomado de Kröncke y col. (44)

El NO además puede tener un efecto sinérgico en la activación celular, en combinación con otras citocinas como IL-1 β producidas por células mononucleares [45].

El NO tiene un papel complejo en la patogénesis de diversas enfermedades infecciosas e inflamatorias, y está relacionado en el choque séptico. La participación del NO en los PMNn es durante la sepsis o después del estrés quirúrgico, cuando ellos liberan varios mediadores tóxicos, incluyendo los reactivos intermediarios tanto del oxígeno (anión superóxido O $_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno H $_2$ O $_2$, oxígeno singuleto 1 O $_2$, etc) como del nitrógeno (NO), nitritos (NO $_2^{\cdot-}$) y nitratos (NO $_3^-$) [47]. En el caso de la respuesta inflamatoria aguda los PMNn acumulados en el área inflamada participan produciendo NO el cual puede tener un papel protector cuando se evalúa la interacción entre NO y O $_2^{\cdot-}$. Cuando los PMNn de rata se incubaron *in vitro* en presencia de L-arginina, la producción de O $_2^{\cdot-}$ disminuyó en aproximadamente 46%, es decir, el O $_2^{\cdot-}$ fue inhibido cuando se agregó L-arginina al medio de incubación, después de estimular a las células con PMA, pero esto no sucedió así cuando fueron agregados simultáneamente. La protección que quizá exista para el NO en la inflamación sería posible a través de la inactivación de la NADPH oxidasa [48].

Eiserich y col. [49] demostraron que el NO $_2^{\cdot-}$ (producto final del metabolismo del NO) rápidamente promueve la nitración de tirosina a través de la formación

de cloruro de nitrilo (NO_2Cl) y dióxido de nitrógeno (NO_2) cuando reaccionan con los mediadores de la inflamación (ácido hipocloroso y mieloperoxidasas) y afirman que los NO_2^- pueden regular los procesos inflamatorios a través de mecanismos oxidativos.

Los reactivos intermediarios del oxígeno (ROI) generados durante el estallido respiratorio de los PMNn constituyen uno de los más potentes mecanismos microbicidas. Arbo y col. [50], evaluaron *in vitro* la capacidad de *E. histolytica* de disparar el estallido respiratorio de PMNn humanos, con ensayos de quimioluminiscencia en una cepa altamente virulenta de *E. histolytica* y una menos virulenta e incubando las dos con PMNn a una relación de 4:1, 2:1 y 1:1, encontrando que la respuesta oxidativa del neutrófilo disminuye progresivamente cuando la concentración de amibas aumenta, por lo que sugieren que *E. histolytica* inhibe el estallido respiratorio de PMNn, lo que representa una táctica de la amiba para sobrevivir.

Evidencias de estudios realizados *in vitro* sugieren que el NO es esencial en la defensa del huésped contra *E. histolytica* [51]. Los macrófagos activados dan respuesta inmune mediada por células T específicas, las que adquieren potente actividad microbicida para destruir una variedad de agentes infecciosos, bacterias, protozoarios, helmintos y hongos así como células tumorales. La activación celular también se produce por linfocinas como

IFN- γ , como por otras citocinas y LPS, para producir compuestos como TNF α , peróxido de hidrógeno, anión superóxido, óxido nítrico y proteasas citolíticas, moléculas muy importantes en la muerte de parásitos intracelulares y extracelulares [52].

En las infecciones con *E. histolytica* los FM y los PMNn juegan un papel importante en la defensa del huésped por medio de mecanismos oxidativos y no oxidativos. Macrófagos activados por citocinas *in vitro*, matan a la amiba por mecanismos dependientes de H₂O₂ y proteasas. Recientemente, se ha demostrado que la citotoxicidad de los macrófagos contra *E. histolytica* es mediada principalmente por derivados de la L-arginina, productos de la oxidación del NO y que el O₂⁻ y el H₂O₂ son cofactores para la molécula efectora NO. Sin embargo, algunos estudios también muestran una función defectuosa, en el estallido respiratorio de macrófagos en animales con absceso hepático amibiano [53,54].

RESPUESTA INFLAMATORIA

El desarrollo de la respuesta inflamatoria es un importante mecanismo por el cual un organismo se defiende contra agentes patógenos e inicia reparaciones estructurales y funcionales del daño tisular. Esto representa una interacción compleja entre agentes patógenos, sistema vascular, células del parénquima y

componentes del tejido, plasma y células de la sangre. Tradicionalmente, la evolución de la respuesta inflamatoria ha sido vista como una continuidad de estados tempranos de inflamación aguda a una reacción inflamatoria crónica seguida por reparación y curación [27].

Cuando la primera línea de defensa del organismo es penetrada, y los patógenos exógenos logran entrar al huésped, se dispara un mecanismo de defensa (respuesta inflamatoria) en donde los neutrófilos son el componente principal. La respuesta inmediata del huésped es la constricción de los capilares cercanos al sitio de infección [23], segundos después, las arteriolas terminales se dilatan y los capilares y las vénulas postcapilares muestran permeabilidad aumentada, estos cambios vasculares primeramente resultan en la liberación de histamina y serotonina a partir de las células cebadas cercanas al sitio de infección, posteriormente son producidos efectos similares por otros mediadores químicos, como la bradiquinina, los componentes del complemento (C3a, C5a), leucotrienos- B_4 (LTB_4) y prostaglandinas (PGD₂, PGE₂) [55]. La dilatación de las arteriolas y la permeabilidad aumentada de los capilares y vénulas postcapilares resultan en el edema característico de la inflamación y también facilita el movimiento de neutrófilos fuera de los vasos hacia el tejido extravascular, las células son entonces dirigidas a favor de gradientes de concentración de factores quimiotácticos liberados por los patógenos y otras células ya en el sitio [21,23].

En el sitio de la infección los neutrófilos engloban los microorganismos invasores. Esta actividad fagocítica es aumentada por una variedad de mediadores, incluyendo el GM-CSF, IL-1 y TNF [56]. La presencia de opsoninas (C3b C3bi del complemento y las inmunoglobulinas (Ig)) en la superficie de las células blanco no solo aumentan la eficacia de su reconocimiento por los neutrófilos, sino puede mejorar igualmente la unión y la fagocitosis [57].

Cuando se ha iniciado la fagocitosis, el neutrófilo engloba la célula blanco y forma el fagosoma, que se convierte en fagolisosoma cuando los gránulos neutrofilicos se funden con su membrana y descargan su contenido [57,58].

En el fagolisosoma se llevan a cabo los dos mecanismos de muerte principales. Uno oxidativo que resulta del estallido respiratorio, donde se producen productos tóxicos derivados del oxígeno en los leucocitos marcados con opsoninas y factores adicionales incluyendo IFN- γ , IL-1, GM-CSF y G-CSF. El otro mecanismo no oxidativo depende de una variedad de enzimas acidofílicas oxígeno-independientes (por ejemplo, glucosidasas, lipasas, fosfatasas ácidas, lisozimas, nucleasas, lactoferrinasas, elastasas y colagenasas) que ejercen un mecanismo destructivo sobre muchos microorganismos [58].

Los reactivos intermediarios del oxígeno son producidos durante la fagocitosis de FM, PMNn, eosinofilos activados. El más importante de estos es el H_2O_2 , y el O_2^- . Ellos son generados en un proceso conocido como el estallido respiratorio. La producción de estos metabolitos es inducida por la unión de anticuerpos agregados a los receptores $Fc-\gamma$, y una serie de enzimas incluyendo oxidasas dependientes de NADPH las cuales utilizan NADPH como un donador de electrones para reducir el oxígeno molecular generando anión superóxido, catalasas (las que degradan el peróxido de hidrógeno) y la superóxido dismutasa (el cual convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno), las que son también producidas durante la fagocitosis [25]. Cuando el peróxido de hidrógeno es reducido por la mieloperoxidasa, que ha sido descargada de los gránulos neutrofilicos, se producen ácido hipocloroso (HOCL) y cloraminas, ambos pueden ejercer efectos tóxicos al oxidar y clorinar una variedad de microorganismos [59]. La quimioluminiscencia característica de la actividad respiratoria del neutrófilo es producto intermedio de estas reacciones [58].

Algunas evidencias indican que el NO puede jugar una parte importante en la inflamación aguda y crónica ya que tratamientos con inhibidores de la NOS reducen el grado de inflamación en ratas con inflamación aguda. Las concentraciones de nitritos en plasma y liquido sinovial están aumentadas en pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis [60].

Estudios realizados con microscopía electrónica muestran que hay lisis de abundantes leucocitos PMNn en la periferia de ulceraciones intestinales, así como ausencia de bacterias en este sitio, esto apoya la hipótesis que los PMNn participan en las lesiones intestinales causadas por las amibas [61].

Sin embargo las células inflamatorias no aparecen durante los estados tempranos de las lesiones destructivas amibianas sino que contribuyen al establecimiento de la necrosis del tejido en las lesiones del intestino y del hígado. La destrucción de los PMNn es una consecuencia de daño mediado por el contacto con los trofozoitos. El daño hepático puede ser afectado indirectamente a través de la lisis de células inflamatorias por la sobreproducción de NO, por la inflamación, por células del hígado dañadas, lo que en conjunto contribuyen como se ha visto en hámsters a la extensión del absceso hepático amibiano (AHA) [62]. El NO producido por los hámsters fue medido en el suero. Los niveles de NO encontrados se correlacionaron directamente con la extensión del daño producido en el hígado [63].

E. histolytica es capaz de evadir las respuestas de inmunidad celular a través de diferentes mecanismos, uno de ellos es la producción de un factor dializable que inhibe la locomoción de los monocitos humanos, los cuales desempeñan un papel esencial en los procesos inmunoinflamatorios y son de crucial importancia en la resistencia a las infecciones [64].

En modelos animales la formación de absceso hepático amibiano sugiere que los neutrófilos son las primeras célula del sistema inmune del huésped que interactúan con la invasión de la amiba. En estudios *in vivo* utilizando ratones deficientes en neutrófilos y ratones control (SCID), se comparó el daño del hígado en la formación de absceso hepático amibiano, encontrando que los ratones deficientes en neutrófilos presentaban extensas áreas con abscesos en estados tempranos de la infección y que carecían de las prominentes células inflamatorias, como las observadas en los ratones SCID, lo que sugiere que los neutrófilos juegan un papel protector en respuestas tempranas del huésped en la invasión al hígado [65]. Participan, además, en los mecanismos de resistencia en la infección amibiana en ratones. Los análisis histológicos indican que *E. histolytica* es capaz de producir daño al hígado en ausencia de células inflamatorias [66].

ANTECEDENTES

La ausencia o escasez de reacción inflamatoria tardía en las lesiones necróticas avanzadas de la amibiasis invasora causada por *E. histolytica* fue descrita por Councilman y Lafleur en 1891 [67]. Igualmente sorprendente, y quizá relacionada con esta escasa inflamación tardía, es la regeneración perfecta, sin cicatrización de los órganos afectados (hígado, piel) que se observa en estos pacientes después de un tratamiento médico exitoso [68]. Por otra parte, y usando principalmente modelos animales de absceso

hepático amibiano experimental (AHAE) se ha documentado una intensa reacción inflamatoria temprana (i.e. aguda) que incluye algunos linfocitos, polimorfonucleares eosinófilos (PMNe) en íntimo contacto con el parásito invasor [69].

Trabajos realizados en nuestro laboratorio en la última década mostraron que el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* contiene un factor (oligopéptido) termoestable, el cual fue purificado y caracterizado por medio de cromatografía de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría de masas (MS-MS) complementado por el método de Edman [70], lo que reveló un pentapéptido con peso molecular de 583 Daltones y se estableció la secuencia de aminoácidos (Met – Gln – Cys - Asp - Ser). Es posible, de hecho muy probable, que este pequeño pentapéptido provenga de un péptido más grande o de una proteína sintetizados por la amiba, los que son luego degradados por proteasas presentes en el citoplasma. El material lisado de amibas, lavado y procesado según el método de Aley y col. [71], mantiene la actividad inhibitoria, lo que sugiere que el FILM (factor inhibidor de la locomoción de monocitos) es producido por las amibas a través de síntesis *de novo* y no se debe a un complejo proceso de ingestión-degradación-regurgitación de un producto presente en el medio axénico [72]. El FILM además posee propiedades anti-inflamatorias poderosas a la vez que selectivas: *in vitro* (estudios con cámaras de Boyden) este péptido inhibe la locomoción

(aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica hacia diversos atrayentes como, C5a-desArg, linfocina quimiotáctica o factor quimiotáctico de linfocitos (LDCF)) de fagocitos mononucleares (FM) de sangre periférica humana normal, pero no la de polimorfonucleares neutrófilos de la misma sangre (64). Este factor también deprime *in vitro* – de hecho cancela – el estallido respiratorio (medido por quimioluminiscencia) de monocitos y neutrófilos activados con zimosan (73). Tales efectos no se acompañan de cambios en la modulación de CD43 un ligando crítico en la actividad inicial de los fagocitos, en la membrana de éstas células, ni afecta la viabilidad de los fagocitos [64,73]. En contraste el FILM no afecta ni la locomoción, ni el estallido respiratorio de PMNe humanos activados con zimosan [74]. El FILM interactúa con los leucocitos a través de un receptor membranar que contiene manosa [75], y después de hacerlo provoca un aumento en los microtúbulos pericentriolares (microscopía electrónica), así como la concentración de AMP cíclico, sin un descenso concomitante en GMP cíclico citoplasmáticos (patrón típico de locomoción frenada en leucocitos) [76]. *In vivo* el FILM retrasa el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck aplicadas a la piel de voluntarios humanos sanos [64], y también inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1 –cloro-2-4-dinitrobenceno (DNCB) en cobayos [77].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las infecciones ocasionadas por *E. histolytica* los FM y los PMN desempeñan un papel importante en la defensa del huésped, utilizan mecanismos oxidativos y no oxidativos. Las dos vías metabólicas oxidativas (del oxígeno y de L- arginina) son microbicidas y se ha demostrado que están implicadas en esta defensa.

Se sabe que *E. histolytica* posee varios mecanismos para evadir la respuesta inmune, uno de estos factores, el FILM natural (FILMn) y su análogo sintético (FILMs), inhiben la locomoción de FM humanos tanto *in vitro* como *in vivo* pero no la de PMN y eosinófilos. Estos factores inhiben además la producción de los reactivos intermediarios del oxígeno en FM y PMN activados. Si la vía oxidativa del oxígeno es deprimida por el FILMn y por FILMs, resulta de gran interés evaluar si la vía metabólica alternativa de la L- arginina, (en sus reactivos intermediarios del nitrógeno) se verá también inhibida por el FILM en sus dos formas, tanto en FM como PMN humanos, activados con LPS, ionomicina, rhIFN- γ , rhTNF- α y PMA.

La vía metabólica del NO es la principal estrategia utilizada contra parásitos intra y extracelulares en la defensa del huésped.

OBJETIVO:

Determinar si el FILMn o el FILMs inhiben la producción de óxido nítrico (en forma de nitritos) en FM y PMN humanos.

HIPÓTESIS.

El FILMn y FILMs son capaces de inhibir la producción de óxido nítrico (nitritos) en FM y PMN humanos.

HIPÓTESIS NULA

El FILMn y FILMs no inhiben la producción de óxido nítrico en FM y PMNn humanos

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de amibas

Se utilizaron trofozoítos de *E. Histolytica* de la cepa HMI-IMSS en medio axénico TYIS-33 a 37°C por 72 h. Como testigo se incubó y procesó, de la misma manera, medio axénico sin amibas [78].

Obtención de sobrenadantes de cultivos amibianos y caracterización del FILM.

El sobrenadante del cultivo de 72 h conteniendo $2-2.5 \times 10^5$ / ml de amibas de *E. histolytica* se centrifugó a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente.

El sobrenadante se filtró por una serie de membranas de Amicon XM 50, PM 30, PM 10, UM10, UM2 y YCO5 (Amicon Corp., Lexington, MA) para obtener moléculas menores de 1000 daltones. El material obtenido se filtró por Millipore 0.45 μ y se sometió en una columna cromatográfica de Sephadex G-15 (Sigma Chemical Co, St. Louis MO), y se realizó una elución con buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 para obtener el pico de actividad del FILM. Se estandarizó en cuanto a su efecto inhibitorio [64].

Un petapéptido sintético del FILM, fue obtenido comercialmente (American Peptide Co. Inc. Sunnyvale, CA). La concentración del FILMn así como del FILMs fue medido por el método de Bradford [79].

Verificación de la actividad biológica del FILM

Se realizó por inhibición de la quimiotaxis en cámaras de Boyden con doble filtro (Nucleopore 5 μ y Sartorius 8 μ superior e inferior respectivamente) [80]. En el compartimento superior se colocaron los FM (8×10^3) de sangre periférica obtenidos por la técnica de Böyum [81] y suspendidos en el medio de Gey-albúmina (Gey-A). En el compartimento inferior se colocó suero activado con zimósán (ZAS) al 20% en Gey-A (quimiotaxis) (0.35 ml de ZAS + 1.35 ml de Gey-A). Para los testigos de la locomoción aleatoria se colocó en el compartimento inferior, solamente el Gey-A. Para la inhibición de la quimiotaxis por el FILM se colocaron 30% del mismo con el medio Gey-A (0.85 ml del medio, 0.35 ml al ZAS y 0.5 ml del FILM) en el compartimento inferior. Las cámaras se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 90 minutos y se evaluó microscópicamente el número de FM atrapados en el filtro inferior (Sartorius). La inhibición de la locomoción se expresa con la siguiente fórmula: % del normal E/T. Donde E es la cuenta de FM en cámaras inhibidas y T es el testigo de locomoción quimiotáctica normal de ese día.

Obtención de fagocitos mononucleares (FM) humanos.

Las muestras de sangre fueron proporcionadas generosamente por el Banco de Sangre del CMN SIGLO XXI-IMSS.

Las células se separaron en condiciones de esterilidad.

Los FM se obtuvieron de voluntarios adultos en ayuno, sanos. Las células mononucleares se aislaron en un gradiente de Ficoll® Hypaque® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por el método de Böyum [81]. Sobre 5 ml de la mezcla con una densidad de 1.077 se colocaron 10 ml de sangre diluida 1:1 v/v se centrifugaron a 400 x g durante 30 min a 22°C, las células de la interfase fueron recuperadas y 3×10^6 células en medio RPMI-1640 con 10 % de suero fetal bovino (FBS), (Gibco, Grand Island, NY), las cuales contenían 1.5×10^4 monocitos los que fueron colocados en placas de 24 pozos durante 2 h a 37 °C con 5% de CO₂ para permitir la adherencia celular. Las células no adheridas fueron eliminadas y el volumen restituido con 1 ml de medio RPMI-1640 completo (10% de SFB, 2mM Glutamina, 1% de piruvato, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin).

Las células fueron incubadas por 7 días para permitir la maduración de monocitos a macrófagos. Por medio de tinciones de peroxidasa e ingestión de partículas de carbono se comprobó la pureza de las células que fue $\geq 90\%$. La viabilidad fue $\geq 95\%$ por el método de exclusión con azul de tripano.

Obtención de polimorfonucleares (PMN) humanos

Los PMN se aislaron del paquete celular obtenido del primer gradiente de centrifugación, el botón se resuspendió en 3 ml de buffer salino de fosfatos (PBS), al cual se adicionó 4 ml de Dextrán al 3% (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) en PBS en tubos de poliestireno cónicos de 50 ml (Falcon Oxnard,

CA). Se incubaron 30min/37°C en posición inclinada 60° para permitir la sedimentación. Los sobrenadantes se transfirieron con pipeta Pasteur a tubos de vidrio, los cuales se centrifugaron a 400 x g durante 10min/4°C. Los eritrocitos remanentes se lisaron mediante choque hipotónico con NH₄ Cl 155 mM, pH 7.4 durante 10min/4°C. Los tubos se centrifugaron a 200 x g 10 min/4°C y el botón se lavó dos veces con medio RPMi-1640 incompleto (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El botón se resuspendió con RPMi-1640 completo. Se colocaron 1X10⁶ células en placas de 24 pozos, se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ [81]. Por medio de tinciones de Wright/Giemsa se comprobó la pureza de las células que fue ≥ 90%. La viabilidad fue ≥ 95% por el método de exclusión con azul de tripano.

Estimulación de FM y PMN.

Las concentraciones utilizadas en este trabajo se determinaron mediante una curva dosis respuesta.

FM maduros fueron estimulados con rhIFN- γ (100 u/pozo) y rhTNF- α (1 ng/pozo) (RD Systems, Minneapolis, MN) solos o en presencia de 10 μ g/pozo de FILMn o FILMs . Los PMN se activaron *in vitro* con rhIFN- γ (100 u/pozo), LPS (100 ng/pozo), ionomicina (200 ng/ pozo) y PMA (160 nM/pozo) [82] solos o con 10 μ g/pozo de FILMn o FILMs.

Los controles fueron células incubadas solo con el medio de cultivo, sin estimulación. Cada experimento se repitió 20 veces y fueron realizados por duplicado.

Al término de la incubación 72 h para FM y 24, 48 y 72 h para PMN, se recolectaron los sobrenadantes (libres de células) en tubos estériles y se almacenaron a -70 °C hasta la determinación de óxido nítrico.

Determinación de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico fue medido como concentración de nitritos en los sobrenadantes utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess [83]. Los sobrenadantes de los FM y de los PMN (100 μ l) se incubaron con igual volumen de reactivo de Griess (1% de sulphanilamida, 0.1% de N-1-naphthylethylene diamina dihydrochloride) a temperatura ambiente por 10 minutos. La absorbancia se midió a 540 nm en un Lector de ELISA Dynatech MR. Se usó nitrito de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para construir una curva estándar. Los resultados fueron expresados en μ M de nitrito/100 μ l de sobrenadante.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y posteriormente con la prueba honesta de Tukey [84].

RESULTADOS

En este estudio los FM como los PMNn humanos activados con IFN- γ , LPS, ionomicina, PMA y TNF- α fueron capaces de producir óxido nítrico. De estos activadores los mejores fueron IFN- γ para FM a las 72 h, e IFN- γ y PMA para PMN a las 24 h. tablas 2 y 3, gráficas 1 y 2. (Se probaron diferentes activadores y tiempos hasta encontrar los más adecuados). Como nuestros resultados presentaron una distribución normal se utilizó la prueba paramétrica ANOVA y la prueba honesta de Tukey para comparar los diferentes grupos y determinar si existían diferencias estadísticas entre ellos

TABLA 2 Producción de nitritos en FM humanos activados con IFN- γ , TNF- α (μ M nitritos/ 100 μ l)

ACTIVADOR	FM ^a (1.5 x 10 ⁴ cel/pozo)			P
	24 HRS	48 HRS	72 HRS	
CONTROL	0.040 \pm 0.009	0.045 \pm 0.009	0.041 \pm 0.009	
IFN- γ ^b	0.084 \pm 0.007	0.126 \pm 0.014	0.427 \pm 0.014	p<0.0001
TNF- α ^c	0.066 \pm 0.003	0.172 \pm 0.005	0.229 \pm 0.023	p<0.0001

Los datos se expresan como promedio(n=20) \pm el error estandar.

^a FM fagocitos mononucleares

^b interferon gamma

^c factor de necrosis tumoral – alfa

Gráfica 1. Producción de nitritos en FM humanos activados con IFN- γ , TNF- α (μ M nitritos/ 100 μ l)

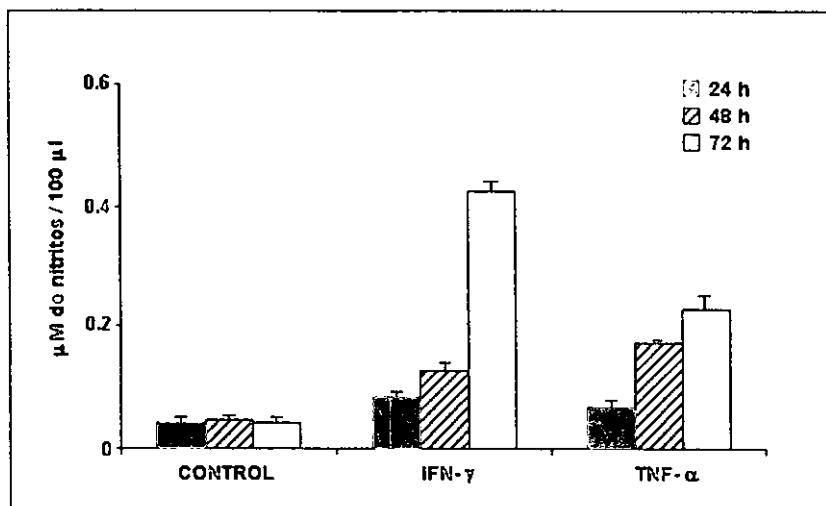


TABLA 3 Producción de nitritos en PMN humanos activados con IFN- γ , PMA, LPS o ionomicina

ACTIVADOR	PMN ^a (1 x 10 ⁶ cel/pozo)		
	24 HRS	48 HRS	72 HRS
CONTROL	0.045 ± 0.002	0.079 ± 0.001	0.073 ± 0.005
IFN- γ ^b	0.306 ± 0.084 p<0.0001	0.078 ± 0.001 NS ^e	0.076 ± 0.001 NS
PMA ^c	0.218 ± 0.040 p<0.0001	0.153 ± 0.006 p<0.0001	0.085 ± 0.014 NS
LPS ^d	0.108 ± 0.005 p<0.0001	0.101 ± 0.006 p<0.026	0.076 ± 0.005 NS
IONOMICINA	0.106 ± 0.003 p<0.0001	0.084 ± 0.005 NS	0.093 ± 0.005 p<0.002

Los valores se expresan como promedio (n=20) ± Error estandar

^a PMNn polimorfonucleares neutrófilos

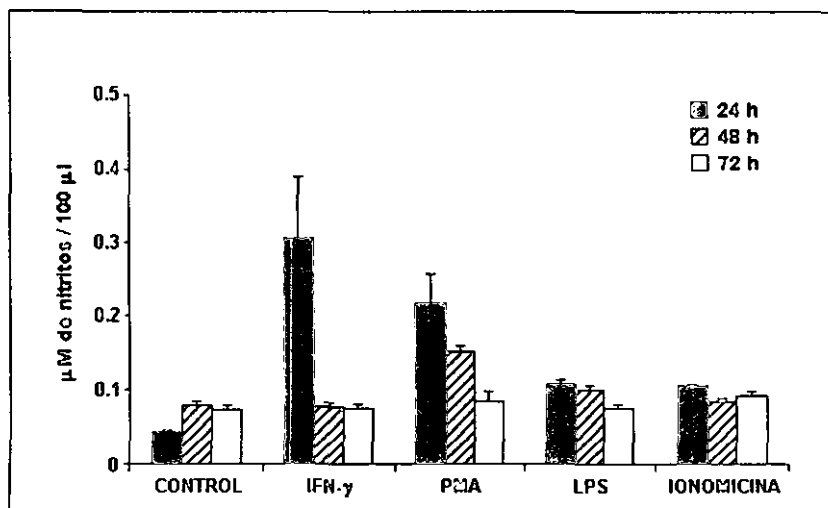
^b interferón gamma

^c forbol 12-miristato 13-acetato

^d lipopolisacaridos de *Escherichia coli*

^e no significativo

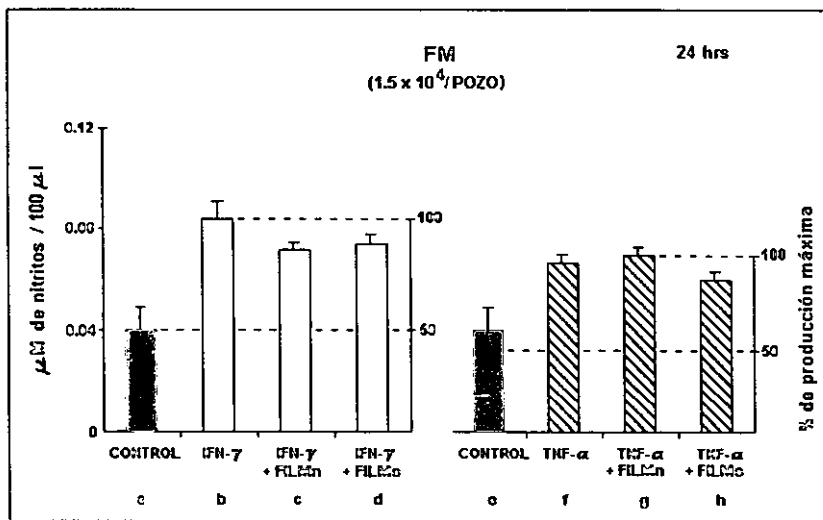
Gráfica 2. Producción de nitritos en PMN humanos activados con IFN- γ , PMA, LPS e ionomicina (μ M nitritos/ 100 μ l)



FM estimados con IFN- γ y TNF- α a las 24, 48 y 72 h

En FM estimados con IFN- γ a las 24 h, la producción de nitritos fue de 0.084 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ con valor estadístico de $p < 0.0001$. Al agregar el FILMn/s no hubo inhibición. En los FM estimados con TNF- α la producción de nitritos fue de 0.066 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ y no se registró inhibición gráfica 3.

Gráfica 3 Inhibición de la producción de nitritos en FM humanos a las 24 h inducida por FILMn o por FILMs



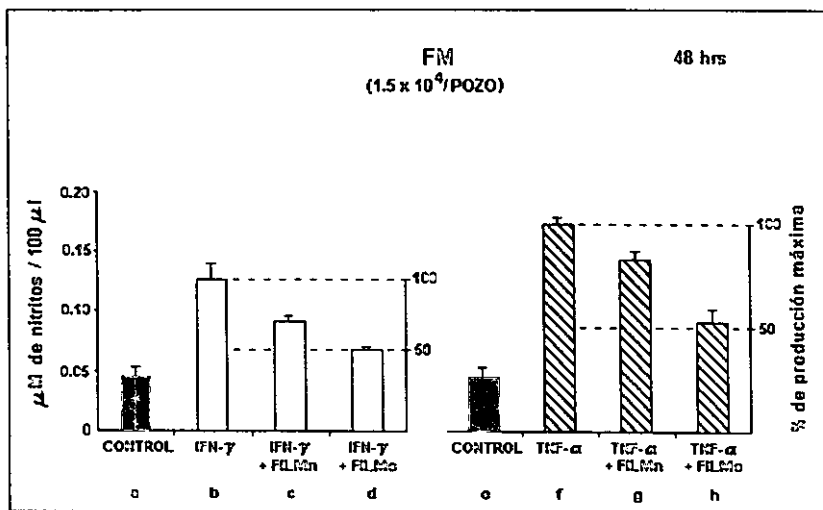
Sobrenadantes de FM incubados con rhIFN- γ (100 u/pozo) o TNF- α (1 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ de FILMn/s

Análisis estadístico

a vs b	$p < 0.0001$	e vs f	$p < 0.0001$
a vs c	$p < 0.0001$	e vs g	$p < 0.0001$
a vs d	$p < 0.0001$	e vs h	$p < 0.0001$
b vs c	NS	f vs g	NS
b vs d	NS	f vs h	NS
c vs d	NS	g vs h	$p < 0.007$

La producción de nitritos a las 48 h aumentó a 0.126 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ y a 0.172 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$ cuando fueron activados con IFN- γ y TNF- α respectivamente siendo significativos en los dos casos ($p < 0.0001$). La inhibición producida por FILMn fue de 28% y la del FILMs fue del 46% en FM estimulados con IFN- γ . Mientras que para FM activados con TNF- α la inhibición por FILMn fue de 18% y para FILMs fue del 48% gráfica 4.

Gráfica 4 Inhibición de la producción de nitritos en FMi humanos a las 48 h inducida por FILMn o por FILMs



Sobrenadantes de FM incubados con rhIFN- γ (100 u/pozo) o TNF- α (1 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ de FILMn/s

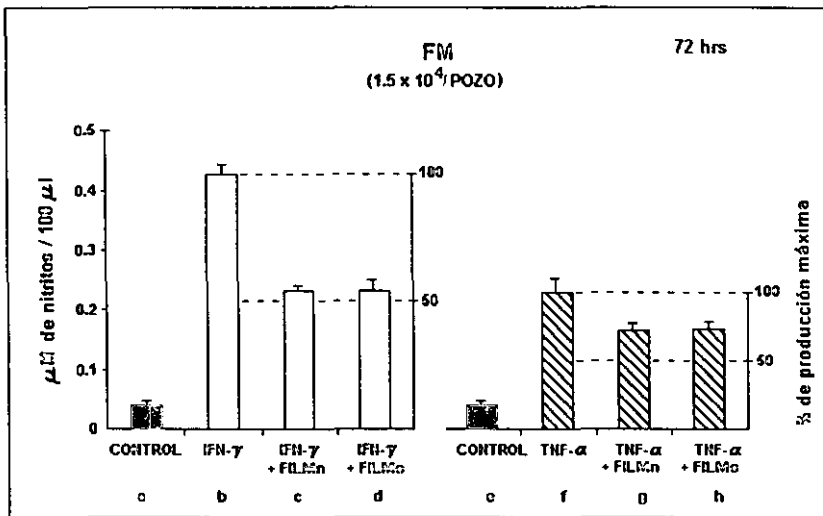
Análisis estadístico

a vs b $p < 0.0001$
a vs c $p < 0.0001$
a vs d $p < 0.0001$
b vs c $p < 0.006$
b vs d $p < 0.0001$
c vs d $p < 0.0001$

e vs f $p < 0.0001$
e vs g $p < 0.0001$
e vs h $p < 0.0001$
f vs g $p < 0.009$
f vs h $p < 0.007$
g vs h $p < 0.05$

La producción de nitritos a las 72 h fue de 0.427 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$, cuando los FM fueron estimulados con IFN- γ , y con TNF- α esta producción fue menor 0.229 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$, con un valor de $p < 0.0001$ en ambos casos. El FILMn/s inhibieron la producción de nitritos aproximadamente en 46% cuando los FM fueron estimulados con IFN- γ y en 27% cuando las células fueron estimuladas con TNF- α , gráfica 5.

Gráfica 5 Inhibición de la producción de nitritos en FM humanos a las 72 h inducida por FILMn o por FILMs



Sobrenadantes de FM incubados con rhIFN- γ (100 u/pozo) o TNF- α (1 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ de FILMn/s

Análisis estadístico

a vs b $p < 0.0001$
 a vs c $p < 0.002$
 a vs d $p < 0.0001$
 b vs c $p < 0.0001$
 b vs d $p < 0.0001$
 c vs d NS

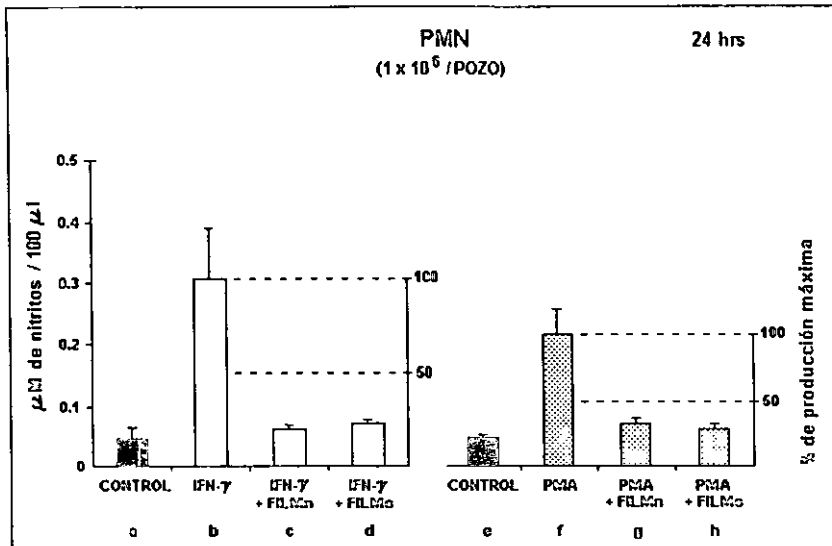
e vs f $p < 0.0001$
 e vs g $p < 0.0001$
 e vs h $p < 0.0001$
 f vs g NS
 f vs h $p < 0.043$
 g vs h NS

Estos datos concluyen que el IFN- γ aumentó progresivamente la producción de nitritos, obteniendo la cantidad máxima a las 72 h (0.427 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$), registrando también la más alta inhibición por FILMn/s cercana al 50%.

PMN estimulados con IFN- γ , y PMA a las 24, 48 y 72 h

En PMN activados con IFN- γ se alcanzó la mayor producción de nitritos a las 24 h (0.306 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$), lo mismo ocurrió con el PMA (0.218 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$). El FILMn/s inhibieron en 80% la producción de nitritos en PMN estimulados con IFN- γ y con PMA a las 24 h gráfica 6.

Gráfica 6 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 24 h inducida por FILMn o por el FILMs.



Sobrenadantes de PMN incubados con rhIFN-γ (100 u/pozo) o PMA (160 nM/pozo) en presencia o ausencia de 10 μg/pozo de FILMn/s.

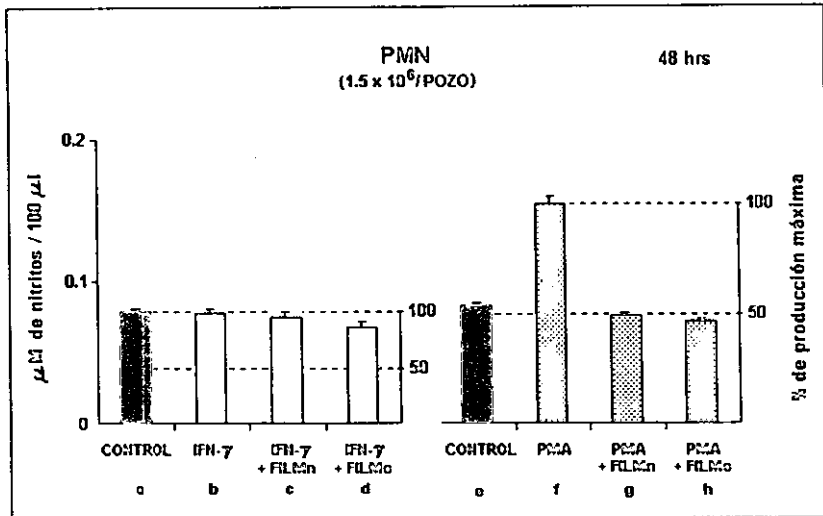
Análisis estadístico

a vs b	p<0.0001	e vs f	p<0.0001
a vs c	NS	e vs g	NS
a vs d	NS	e vs h	NS
b vs c	p<0.0001	f vs g	p<0.0001
b vs d	p<0.001	f vs h	p<0.0001
c vs d	NS	g vs h	NS

Cuando los PMN fueron activados con IFN-γ a las 48 h, no hubo incremento en la producción de nitritos comparados con el control, por lo tanto tampoco inhibición con FILMn/s. Para los PMN estimulados con PMA, la producción de nitritos fue de 0.153 μM/100 μl y la inhibición con FILMn/s fue del 50% gráfica

7.

Gráfica 7 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 48 h inducida por FILMn o por el FILMs.



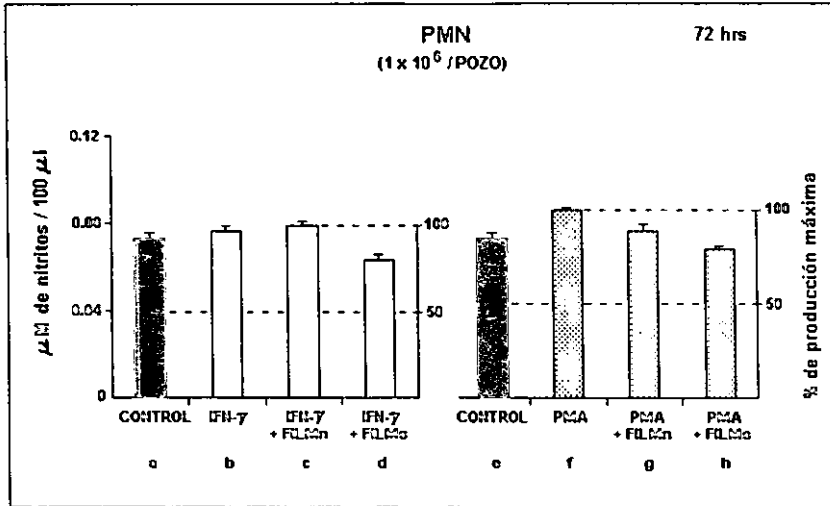
Sobrenadantes de PMN incubados con rhIFN-γ (100 u/pozo) o PMA (160 nM/pozo) en presencia o ausencia de 10 µg/pozo de FILMn/s.

Análisis estadístico

a vs b	NS	e vs f	p<0.0001
a vs c	NS	e vs g	NS
a vs d	p<0.027	e vs h	NS
b vs c	NS	f vs g	p<0.0001
b vs d	p<0.046	f vs h	p<0.0001
c vs d	NS	g vs h	NS

A las 72 h, los PMN activados con IFN-γ no incrementaron la producción de nitritos, por lo tanto no se mostró la inhibición con el FILMn/s ya que los valores obtenidos fueron iguales a los del control. Cuando se activaron con PMA la producción de nitritos resultó no significativa cuando se comparó con el control y no hubo inhibición gráfica 8.

Gráfica 8 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 72 h inducida por FILMn o por el FILMs.



Sobrenadantes de PMN incubados con rhIFN-γ (100 u/pozo) o PMA (160 nM/pozo) en presencia o ausencia de 10 μg/pozo de FILMn/s.

Análisis estadístico

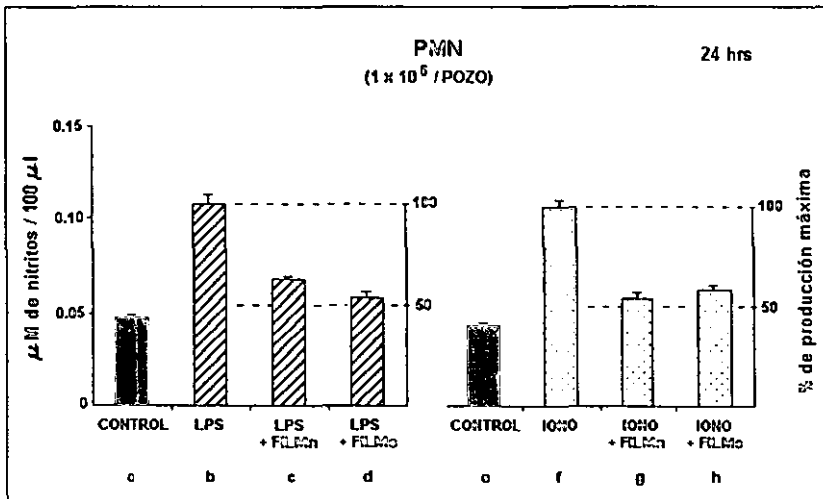
a vs b	NS	e vs f	NS
a vs c	NS	e vs g	NS
a vs d	p<0.009	e vs h	p<0.001
b vs c	NS	f vs g	p<0.009
b vs d	p<0.0001	f vs h	p<0.002
c vs d	p<0.0001	g vs h	NS

De estos datos se concluye que el IFN-γ y el PMA incrementaron la producción de nitritos, que fue máxima a las 24 h (0.306 μM/100 μl), la inhibición por FILMn/s fue la más alta de todos los sistemas probados 80% (24h).

PMN estimulados con LPS o ionomicina a las 24, 48 y 72 h

Cuando se activaron los PMN con LPS, a las 24 h se alcanzó una producción de nitritos de 0.108 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$. La inhibición producida por el FILMn/s, fue de 38% y 46% respectivamente. Para las células activadas con ionomicina la producción de nitritos fue igual a la registrada con LPS (0.108 $\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$) y la inhibición ejercida por el FILMn/s fue de 45 % y 40% respectivamente, gráfica 9.

Gráfica 9 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 24 h inducida por FILMn o por el FILMs.



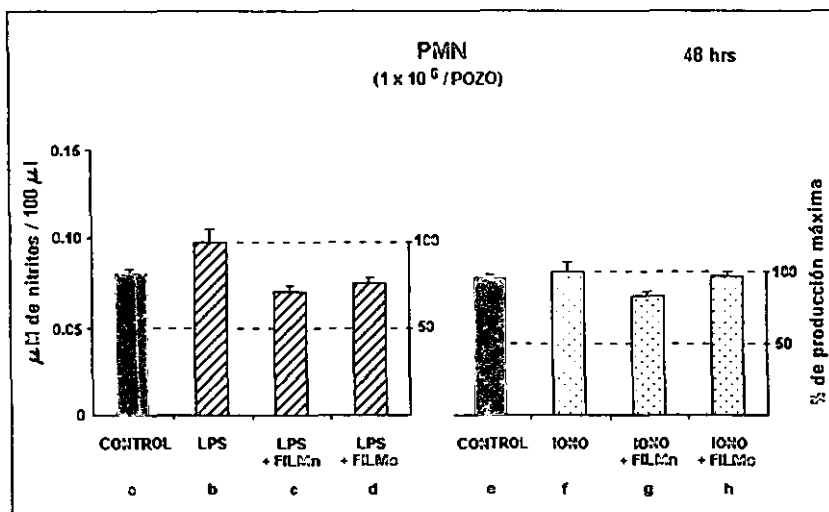
Sobrenadantes de PMN incubados con LPS (100 ng/pozo) o ionomicina (200 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ de FILMn/s.

Análisis estadístico

a vs b	p<0.0001	e vs f	p<0.0001
a vs c	NS	e vs g	p<0.009
a vs d	NS	e vs h	p<0.0001
b vs c	p<0.003	f vs g	p<0.0001
b vs d	p<0.0001	f vs h	p<0.0001
c vs d	NS	g vs h	NS

A las 48 h, la producción de nitritos inducida en PMN activados con LPS, fue la misma que a las 24 h y la inhibición por el FILMn fue de 28% y por el FILMs de 24%. Para las células activadas con ionomicina, no se registró producción de nitritos (NS), por lo tanto no hubo inhibición con FILMn/s gráfica 10.

Gráfica 10 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 48 h inducida por FILMn o por el FILMs.



Sobrenadantes de PMN incubados con LPS (100 ng/pozo) o ionomicina (200 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 µg/pozo de FILMn/s.

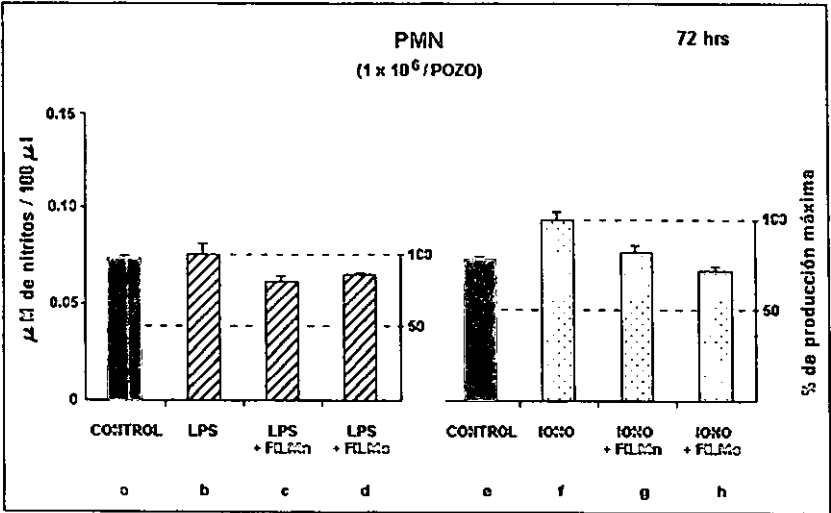
Análisis estadístico

a vs b	p<0.026	e vs f	NS
a vs c	NS	e vs g	NS
a vs d	NS	e vs h	NS
b vs c	p<0.0001	f vs g	p<0.020
b vs d	p<0.0001	f vs h	NS
c vs d	NS	g vs h	NS

A las 72 h, los PMN activados con LPS o ionomicina no fueron capaces de producir nitritos en cantidades comparables a las que se encontraron a las 24 h gráfica 11.

Cuando se estimularon PMN con LPS o ionomicina la producción de nitritos resultó ser igual que con los otros activadores (IFN- γ y PMA) a las 24 h, a las 48 y 72 h la producción bajo considerablemente así como el efecto inhibitorio.

Gráfica 11 Inhibición de la producción de nitritos en PMN humanos a las 72 h inducida por FILMn o por el FILMs.



Sobrenadantes de PMN incubados con LPS (100 ng/pozo) o ionomicina (200 ng/pozo) en presencia o ausencia de 10 µg/pozo de FILMn/s.

Análisis estadístico

a vs b	NS	e vs f	p<0.002
a vs c	p<0.007	e vs g	NS
a vs d	p<0.030	e vs h	NS
b vs c	p<0.009	f vs g	p<0.020
b vs d	p<0.017	f vs h	p<0.0001
c vs d	NS	g vs h	NS

DISCUSIÓN

Estudios recientes muestran la producción y eficacia del óxido nítrico como una molécula efectora en modelos de ratón [85]. Los ROI también se han estudiado ampliamente en modelos murinos y su papel citotóxico en macrófagos de ratón se ha confirmado. Un reporte reciente mostró que monocitos de sangre periférica humana producen óxido nítrico en concentraciones bajas y que la enzima iNOS se expresa en macrófagos humanos cuando estos son activados, también plantean la posibilidad que citocinas proinflamatorias presentes en el sitio de inflamación puedan inducir a los FM *in situ* a producir óxido nítrico en cantidades considerables usando la vía de iNOS [86]. Para este trabajo utilizamos IFN- γ , TNF- α , PMA, ionomicina, LPS como activadores celulares, confirmando lo anterior donde el IFN- γ fue el mejor activador para FM en la producción de óxido nítrico y el IFN- γ y PMA lo fueron para PMN.

El principal hallazgo del presente estudio fue que tanto el FILM natural como el sintético inhibieron la producción de óxido nítrico (en forma de nitritos) en FM humanos activados con IFN- γ y TNF α y en PMN humanos activados con PMA e IFN- γ . Observaciones previas realizadas *in vitro* con ensayos de inhibición de quimiotaxis y quimioluminiscencia en leucocitos e *in vivo* con pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada al 1-cloro 2-4 dinitrobenceno (DNCB)

en cobayos comparando dichos materiales, demuestra que el FILM_s posee propiedades idénticas al producto natural (FILM_n) [77, 87]. Arbo y col observaron que se presenta una inhibición similar en la quimiolumiscencia de los PMN cuando se incubaron *in vitro* con *E. histolytica* [50].

La resistencia a la formación del absceso hepático en ratas se debe en parte, a la acción de los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos en cobayos [88]. Los FM y los neutrófilos responden bien al estímulo de activadores y citocinas presentes en el medio formando RNI y ROI [89]. En FM la inducción de NO sintasa (iNOS) *in vivo* e *in vitro* es dependiente de la actividad de citocinas como IFN- γ , TNF- α que pueden actuar sinérgicamente con productos bacteriales (LPS) o con ionóforos (ionomicina) promoviendo la expresión del gen iNOS [90].

La habilidad del FILM para inhibir el óxido nítrico en FM y PMN humanos estimulados puede ser de relevancia en la amibiasis, debido a que puede contribuir a la notoria ineficiencia de PMN en su respuesta contra *E. histolytica* virulenta [91,92], por depresión de los principales mecanismos oxidativos (reactivos intermediarios del nitrógeno y reactivos intermediarios del oxígeno). Estas células probablemente puedan estar implicadas en tal confrontación. Sin embargo, FM humanos activados son capaces de dar muerte a *E. histolytica*

virulenta usando mecanismos no oxidativos [53], pero también mecanismos oxidativos [32], los que probablemente incluyan óxido nítrico.

La lisis oxidativa de *E. histolytica* por FM de ratón, depende más de la generación de óxido nítrico que de la producción de ROI, estos últimos actúan como cofactores para la molécula efectora del óxido nítrico [53].

Estas dos clases de oxidantes inorgánicos (ROI y RNI) independientemente producidos –íntimamente relacionados- [83] se han involucrado en los efectos generales citotóxicos ejercidos por FM y PMN sobre microorganismos [93]. Adams y col. [94] muestran en sus experimentos realizados *in vitro* el efecto citotóxico producido por macrófagos activados con IFN- γ y LPS o *in vivo* inyecciones de lisado de *Corynebacterium parvum* para dar muerte a *Toxoplasma gondii* un parásito intracelular obligado.

Los nitritos son acumulados en los sobrenadantes de los cultivos de FM humanos después de una prolongada exposición a citocinas, pero también como resultado de la presencia de agentes infecciosos [95]. Muñoz-Fernandez y col. [96] describieron la muerte del protozoario *Trypanosoma cruzi* dependiente del óxido nítrico producido por FM activados con IFN- γ o TNF- α , adicionalmente, el óxido nítrico puede también tener un papel inductor en la progresión de una reacción inflamatoria aguda a una crónica [97].

Tratamientos con inhibidores de la óxido nítrico sintasa (iNOS) no solo reducen la efectividad de la inflamación en ratas [86] sino también protegen contra el daño del tejido subsecuente a la inflamación [98, 99]. El FILM mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico similar a la lograda por la iNOS en FM y PMN, puede contribuir al establecimiento del absceso hepático amibiano, y al notorio retardo de los cambios inflamatorios tardíos observados en estas lesiones [62].

CONCLUSIONES

- ◇ El FILMn inhibe la producción de óxido nítrico (en forma de nitritos) en FM y PMN humanos

- ◇ El FILM_{is} reproduce esta inhibición en las mismas estirpes celulares

- ◇ *E. histolytica* a través del FILM deprime los reactivos intermediarios del nitrógeno, tanto en FM como en PMN humanos, lo que junto con la depresión de los reactivos intermediarios del oxígeno pueden contribuir a la ineficiencia del combate de FM, PMN contra la amiba, al consecuente proceso inflamatorio característico y al establecimiento del absceso hepático amibiano.

PERSPECTIVAS

- ◇ Probar diferentes inhibidores específicos de la iNOS, como la N^G monomethyl L-arginina, N^w amino-L-arginina, N^w-nitro-L-arginina, para comprobar la inhibición de la producción de NO o de sus reactivos intermediarios, producidos por FM o PMN activados y comparar este efecto con el obtenido con el FILM.
- ◇ Evaluar el efecto del FILM producido por *Entamoeba histolytica* sobre la expresión de las adhesinas VCAM-1 y VLA-4 involucradas en la inflamación tardía.
- ◇ Determinar si el FILM se produce o actúa *in vivo* (en gerbos). De hacerlo el FILM podría ser un factor de evasión de la amiba frente a la respuesta inflamatoria del huésped. Por lo que se intentaría inducir inmunidad protectora contra el absceso hepático amibiano experimental (AHAE) usando un complejo FILM-KLH inmunógeno

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Faust CE, Russell FP, Clifton JR. Clinical Parasitol. Ed. Lea & Febiger Filadelfia 1984; p 136-141
- [2] Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica*. In: Immunology of parasitic infections. Cohen S, Warren KS, Ed Blackwell, London 1980; p170-179
- [3] Farreras VP, Rozman C. Infecciones por Protozoos. En: Enfermedades del Hígado y de las vías Biliares. Ed. Marín, Barcelona 1982; p1044-1049
- [4] Kretschmer RR. Inmunología de la amibiasis. En: Amibiasis Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Ed. Trillas, México 1994; p 81-159
- [5] Reed SL. Amebiasis: An Update. Clin Infect Dis 1992; 14(2): 385-395
- [6] Herrera VD, Espinoza CM, Martínez-Palomo A. Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 1997; 28 (Suppl): 197-199
- [7] Trisel D, Martínez-Palomo A, De la Torre M, De la Hoz R, Pérez E. Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J Exp Med 1978; 148(5): 1137-1143
- [8] Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. The galactose adherence lectin of *Entamoeba histolytica* activates primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. Arch Med Res 1997; 28 (Suppl): S228-S229

- [9] Flores-Romo L, Tsutsumi V, Estrada-García T, Shibayama M, Aubry JP, Bacon KB, Martínez-Palomo A. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(1): 116-117
- [10] Martínez-Palomo A. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol Today* 1987; 3:111-118
- [11] Pérez-Tamayo R. Patología de la amibiasis. En: Amibiasis. Ed. Medica Panamericana, México 1986; p 42-56
- [12] Bhatti HS, Bhushnurmah S, Mahajan RC, Ganguly NK, Sehgal R. An experimental model of ameboma in guinea pig. *Exp Parasitol* 1992; 74(3): 283-289
- [13] Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutiérrez G, Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:412-419
- [14] Guillén N. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Today* 1993; 9:364-369
- [15] Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation on global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8:228-238
- [16] Hammelmann C, Urban B, Foerster B, Horstmann RD. Complement resistance of pathogenic *Entamoeba histolytica* mediated by trypsin-sensitive surface component. *Infect Immun* 1993; 61:1636-1640

- [17] Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and noninvasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R In: Soc Trop Med Hyg* 1978; 72:519-521
- [18] González CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, García JA, Ramirez A, Salvatierra B, Tapia R, Sepúlveda J, Gutierrez G, Kumate J. Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA. *Epidemiol Infect* 1995; 115:535-543
- [19] Bos HJ. The problem of pathogenicity in parasitic *Entamoeba*. *Acta Leiden* 1973; 40:1-5
- [20] Petri Jr WA, Clark CG, Braga LL, Mann BJ. International seminar on amebiasis. *Parasitol Today* 1993; 9:73-75
- [21] Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*. Ed. CV Mosby, Saint Louis Mo 1985; p 1-25
- [22] Abbas KA, Lichtman HA, Pober SJ. *Cellular and molecular Immunology*. Ed. Interamericana McGraw-Hill. 1995; 2ª ed, p 22-33
- [23] Sell S. *Immunology immunopathology and immunity*. Ed. Elsevier Science 1987; 4ª ed, Nueva York, p 3-12
- [24] Zentella -Piña M, Saldaña BY. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq* 1986; 15:152-161
- [25] Rojas-Espinosa O. Bioquímica de la fagocitosis: Una Breve Revisión. *Bioquímica* 1997; 22(1-86): 612-635

- [26] Nelson DS. Macrophages and immunity. Ed. Tatum EL, Neuberger A. 1969; Nueva York, p 5-35
- [27] Sigal HL, Ron Y. Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. In: The Inflammatory Response. Ed. Mc Graw-Hill 1994; Nueva York, p 356-386
- [28] Capín R, González-Mendoza A, Ortiz-Ortiz L. Disminución de la actividad del sistema fagocito mononuclear en hámsters infectados con *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med 1980; 11(Suppl): 235-240
- [29] Trissl D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. Rev Infect Dis 1982; 4(6): 1154-1184
- [30] Abioye AA, Lewis EA, Mc Farlane H. Clinical evaluation of serum immunoglobulins in amoebiasis. Immunology 1972; 23(6): 937-946
- [31] Diamantstein T, Klos M, Gold D, Hahn H. Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. J Immunol 1981; 126(6): 2084-2086
- [32] Salata RA, Pearson RD, Ravdin JI. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*: Killing of virulent amebae by the activated macrophage. J Clin Invest 1985; 76(2): 491-499
- [33] Ortiz-Ortiz L, Capín NR, Sepúlveda B, Zamora G. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. Clin Exp Immunol 1978; 34(1): 10-18

- [34] Calderón J, Tovar R. Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HMI by treatment with human serum. *Immunology* 1986; 58(3): 467-471
- [35] Reed LS, Ember AJ, Herdman SD, DiScipio GR, Hugli ET, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 1995; 155:266-274
- [36] Reed SL, Sargeant PG, Braude AI. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77,248-253
- [37] Braga L, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham Ch, Wood S, Sims PJ, Petri WA. Inhibition of complement attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 1992; 90:1131-1137
- [38] Lynch EC, Rosenberg IM, Gitler C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* 1982; 1(7): 801-804
- [39] Young JDE, Young TM, Lu PL, Unkeles JC, Cohn ZA. Characterization of membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1982; 156(6): 1677-1690
- [40] Barnes JP, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16:128-130
- [41] Green SJ, Nacy CA, Schreiber RD, Cranger DL, Crawford RM, Meltzer MS, Fortier A. Neutralization of IFN- γ and TNF- α blocks in vivo synthesis of

- nitrogen oxides from L-arginine and protection against *Francisella tularensis* in BCG treated mice. *Infect Immun.* 1993; 61:689-698
- [42] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6:3051-3064
- [43] Foo YL. Regulation of lymphocyte function by nitric oxide. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:396-399
- [44] Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:327-343
- [45] Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1998; 93:275-280
- [46] Stolarek R, Kula P, Kurmanowska Z, Nowak D. Effect of various agonists on nitric oxide generation by human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28:104-109
- [47] Tsukahara Y, Morisaki T, Horita Y, Torisu M, Tanasaka M. Expression of inducible nitric oxide synthase in circulating neutrophils of the systemic inflammatory response syndrome and septic patients. *World J Surg* 1998; 22:771-777
- [48] Rodenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory human polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol* 1998; 274:C827-C830

- [49] Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, Van Der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 22:393-397
- [50] Arbo A, Hoefsloot M, Ramírez A, Santos I. *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arch Invest Med* 1990; 21 (Suppl 1): 57-61
- [51] Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun* 2000, 68:400-402
- [52] Garcia-Lloret MI, Rocha-Ramírez LM, Ramírez A, Santos-Preciado JI. Macrophage colony-stimulating factor enhances the respiratory burst of human monocytes in response to *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1992; 23:139-141
- [53] Lin JY , Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1992; 148:3999-4005
- [54] Wang W, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* 1994; 83:601-610
- [55] Paul WE. *Fundamental immunology*. Ed. Raven Press, Nueva York 1989; p 7-25

- [56] Steinbeck MJ, Roth JA. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis* 1989; 11:549-568
- [57] Stites DP, Stobo JD, Wells JV. *Basic and clinical Immunology*. Ed. Appleton & Lange, 6^a ed, Norwalk 1987; p 98-105
- [58] Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW Leder: *The molecular basis of blood diseases*. Ed. WB Saunders, Filadelfia PA 1987; p 765-912
- [59] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320(6): 365-376
- [60] Moncada S, Higgs A. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 2002-2012
- [61] Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Anaya-Velázquez F, González-Robles A. Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 2273-2279
- [62] Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An Ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; 130: 112-119
- [63] Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Ventura Juárez J, Shiba YM, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. Role of nitric oxide in experimental hepatic amebiasis. *Arch Med Res* 1997; 28 (Suppl): S214-S216
- [64] Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López-Osuna M, Lecuona M, Castro ME, Arellano J. Inhibition of human monocyte

- locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. *Parasite Immunol* 1985; 7: 527-543
- [65] Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in responses to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 1997; 65:1631-1639
- [66] Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 1998; 20:255-262
- [67] Councilman WT, Lafleur HA. Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp Rep* 1891; 2:395
- [68] Pérez -Tamayo R. Pathology of amebiasis. In: *Amebiasis*, Martínez-Palomo A. Ed. Elsevier, Amsterdam 1986; p 45-94
- [69] Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. Cellular basis of experimental amoebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; 117(1): 81-91
- [70] Edman P, Begg G. A protein sequentation. *Eur J Biochem* 1967; 1: 80-91
- [71] Aley BS, Scott WA, Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980; 152(2): 391-404
- [72] Rico G, Ximenez C, Ramos F, Kretschmer R. Production of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) by axenically grown *Entamoeba*

histolytica: Synthesis or degradation? Arch Med Res 1997; Supl 28:235-236.

- [73] Rico G, Díaz-Guerra O, Giménez-Scherer JA, Kretschmer R. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Med Res 1992; 23(2): 157-159
- [74] Rico G, Arellano J, Kretschmer R. The human monocyte locomotion inhibitory-factor produced by *E. histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. Parasitol Res 1998; 84(4): 522-523
- [75] Kretschmer RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Díaz-Guerra O, Arellano J. The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 1991; 77(5): 374-378
- [76] Rico G, Díaz-Guerra O, Kretschmer RR. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *E. histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. Parasitol Res 1995; 81(2): 158-162
- [77] Giménez-Scherer A, Rico G, Fernandez J, Kretschmer RR. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reaction to DNBC in Guinea Pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 1997; 28: 237-238

- [78] Diamond LS, Harlow AR, Cunick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 431-432
- [79] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- [80] Papierniak C, Bourey RE, Kretschmer RR, Gotoff SP, Colombetti LG. Technetium-99m labeling of human monocytes for chemotatic studies. *J Nucl Med* 1976; 17(11): 988-992
- [81] Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Inv* 1968; 97: 77-89
- [82] Wang W, Keller H, Chadee K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* 1994; 83: 601-610
- [83] Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1988; 141: 2407-2412
- [84] Siegel S. *Non-parametric statistics for behavioral sciences*. Ed. Mc Graw-Hill, Nueva York, p 116-127

- [85] Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolisaccharide. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 7738-7740
- [86] Mridula B, Parissa F. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation dependent process. Immunol Lett 1995; 48:59-64
- [87] Kretschmer RR, Rico G, Giménez JA. Structure and origin of an anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. FASEB J 2000; 14: A1153
- [88] Tsusumi V. In vivo experimental models of amebiasis. Gac Med Mex. 1994; 130: 450-453
- [89] Keller R, Keist R, Erb P, Aebischer T, DeLibero G, Balsler M, Grascurth P, Keller U. Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen and production of reactive nitrogen intermediates: An comparative study including T lymphocytes, T like cells, neutrophil granulocytes and mononuclear phagocytes. Cellular Immunol 1990; 31: 398-403
- [90] Fierro IM, Nacimiento Dasilva V, Arruda MA, Freitas MS, Plotkski MC, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Induction of NOS in rat blood PMN *in vivo* e *in vitro*; modulation by tyrosina kinasa and involvement in bactericidal activity. J Leukoc Biol. 1999; 65: 508-514

- [91] Guerrant AH, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 1981; 143: 83-93
- [92] López-Osuna M, Contreras BA, Kretschmer RR. *In vitro* studies of the interaction of polymorphonuclear leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med* 1986; 17: 243-246
- [93] Reed SG, Nathan CF, Phil DL. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide: comparison with interferon-gamma. *J Exp Med* 1987; 166: 1734-1746
- [94] Adams BL, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1990; 144: 2725-2729
- [95] Denis M. Human monocytes/macrophages. NO or no NO? *J Leukoc Biol* 1994; 55:2407-2412
- [96] Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and INF- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992; 33:35-40
- [97] Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1992; 211:177-182

- [98] Buckberg GD, Matheis G, Sherman MP, Haybron DM, Ignarro RJ.
Myocardial reoxygenation injury after ischaemia is mediated by the
L- arginine: nitric oxide pathway. In: The Biology of Nitric Oxide, Moncada
S, Marletta MA, Hibbs Jr JB. Ed. Portland Press, London 1992; p 52-61
- [99] Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. Extracellular superoxide
dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. Proc Nat
Acad Sci 1992; 89: 9715-9719

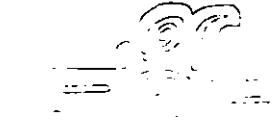
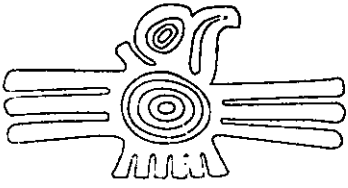
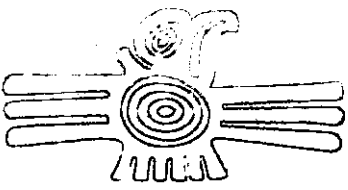
ANEXOS

JULY/AUGUST 2000

11

Archives of Medical Research

VOLUME 31, NUMBER 4, SUPPLEMENT



**Proceedings of the
XIV Seminar on Amebiasis
(Mexico City)**

11

The Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by *Entamoeba histolytica* upon Nitric Oxide Production by Human Leukocytes

Guadalupe Rico, Erika Leandro, Sara Rojas, Juan-Antoñio Giménez and Roberto Kretschmer

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

Key Words: *Entamoeba histolytica*, MLIF, Nitric oxide.

Introduction

Entamoeba histolytica produces a small molecular weight (583 Da) monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) that without harming the cells, inhibits *in vitro* and *in vivo* locomotion of human monocytes/mononuclear phagocytes (MP) but not that of neutrophils (PMNn) or eosinophils. It also virtually cancels the respiratory burst of MP and PMNn, again sparing eosinophils from this effect (1). Nitric oxide (NO) appears to be the principal lytic agent used by rodent MP against *E. histolytica* *in vitro*, and human MP may do likewise (2). We evaluated the effect of nMLIF (native) and sMLIF (custom synthetic) on the production of NO by human MP and PMNn after single stimulation, to gain a better understanding of the interaction between *E. histolytica* and human leukocytes.

Materials and Methods

Blood was obtained from 12 healthy, nonsmoking adult volunteer donors, and was layered over a Ficoll-Hypaque gradient ($d = 1.077$) and centrifuged for 30 min at $400 \times g$ at 22°C . The cell interphase was recovered, and 3×10^6 cells in RPMI-1640 medium, 10% fetal calf serum (FCS) containing $\sim 0.15 \times 10^9$ monocytes were plated for 2 h in 24 cluster wells for cell adherence. Nonadherent cells were discarded and the volume restituted with 1 mL RPMI-1640-FCS. Cells were incubated for 7 days to allow their maturation to MP. For the isolation of PMNn, the cell button obtained after the initial gradient was diluted in 1 mL of PBS, added to 4 mL of 3% dextran in conic polystyrene tubes, and incubated for 30 min in a 60° tilted position for sedi-

mentation. The supernatant fluid was centrifuged at $400 \times g$ at 4°C for 10 min. The cell button was exposed to a single NH_4Cl hypotonic shock, and 1×10^6 PMNn/mL in RPMI-1640-FCS added each to 24 cluster wells. MP and PMNn viability was $\geq 95\%$ by Trypan blue dye exclusion. Cell type purity was $\geq 98\%$. Cells were stimulated in duplicate with 10 μL of either rhIFN- γ (100 U/well), rhTNF- α (1 ng/well) (both RD-Systems), or PMA (160 nM/well) alone or in the presence of nMLIF (1) or sMLIF (American Peptide Corp., Sunnyvale, CA, USA) (10 μg /well), also in 10 μL samples. NO (in the form of nitrite) was measured by the Griess reaction (3) in the supernatant fluids. Controls consisted of unstimulated cells or cells exposed to nMLIF or sMLIF alone. Final volume of all wells was 1020 μL . MP and PMN were incubated for 72 and 24 h, respectively, the previously established optimal incubation times for NO production in these cells. Results were expressed as μM nitrite/100 μL supernatant fluid.

Results and Discussion

The number of cells employed in these experiments was adjusted to obtain quantitatively comparable amounts of constitutive and induced (5-10- [total of 2]) and 5-7-fold increases in MP and PMNn, respectively) NO production by human leukocytes per well. MP were the better producers of NO, because almost 100 times more PMNn than MP were required to achieve the same NO production per well. Also, rhIFN- γ turned out to be the better single inducer of NO production in MP and in PMNn. Additionally, the weak NO production by cells exposed to nMLIF or sMLIF alone was not significantly different from the constitutive NO production by the same cells (Table 1). All induced NO production models employed in this study were significantly ($p \geq 0.05$) and comparably inhibited by both nMLIF and by sMLIF, although the weaker production of NO by PMNn was apparently ($p < 0.05$) more inhibitable than that of MP. In MP, the NO production induced by rhIFN- γ was more vigor-

Address reprint requests to: Guadalupe Rico, Unidad de Investigación en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-SXXI, IMSS, Apdo. Postal 7-032, 06720 México, D.F., México. Telefax: (+525) 627-6943; E-mail: guadalupe_rico@mailer.conacyt.mx

Presenting author: Guadalupe Rico.

Table I.
Constitutive and induced nitric oxide production by human

	MP ^a (1.5 × 10 ⁶ /well/24 h)	PMN ^b (1 × 10 ⁶ /well/24 h)
Constitutive		
Culture medium	0.041 ± 0.009 (A)	0.045 ± 0.002 (F)
nMLIF ^c	0.084 ± 0.007 (B)	0.065 ± 0.002 (G)
sMLIF ^d	0.075 ± 0.002 (C)	0.076 ± 0.004 (H)
Induced		
rhIFN-γ	0.427 ± 0.014 (D)	0.306 ± 0.084 (I)
rhTNF-α	0.229 ± 0.023 (E)	ND
PMA ^e	ND ^f	0.218 ± 0.040 (J)

A vs. B: NS; A vs. C: NS; A vs. D: $p < 0.005$; A vs. E: $p < 0.005$; B vs. C: NS; D vs. E: $p < 0.005$; F vs. G: NS; F vs. H: NS; F vs. I: $p < 0.005$; F vs. J: $p < 0.005$; G vs. H: NS; and I vs. J: $p < 0.005$.

^aMononuclear phagocytes; ^bpolymorphonuclear neutrophils; ^cnative monocyte locomotion inhibitory factor; ^dsynthetic monocyte locomotion inhibitory factor; ^ephorbol myristate acetate; ^fnot done, and ^gnot significant.

ously inhibited by MLIF than the relatively weaker NO production induced by TNF-α in these cells. Both nMLIF and sMLIF significantly ($p \geq 0.05$) inhibited NO production by about 50% (0.427 vs. 0.230 or 0.231 $\mu\text{M}/100\mu\text{L}$, respectively) in rhIFN-γ-stimulated MP, and by about 30% (0.229 vs. 0.167 or 0.169 μM , respectively) when MP were stimulated with rhTNF-α. On the other hand, nMLIF and sMLIF significantly ($p \geq 0.005$) inhibited NO production by about 70–80%, both in rhIFN-γ (0.306 vs. 0.062 or 0.072 $\mu\text{M}/100\mu\text{L}$, respectively) and in PMA-stimulated PMNn (0.218 vs. 0.072 or 0.064 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$, respectively).

In inhibiting NO production, sMLIF and nMLIF performed comparably, confirming previous *in vitro* and *in vivo* observations with these materials. In addition to the described effects displayed by MLIF, including the inhibition of reactive oxygen intermediates in MP and PMNn (4), MLIF also inhibits the induced production of NO in these leukocytes. The ability of MLIF to inhibit NO in human MP and PMNn may be of biological relevance. It may contribute to the notorious inefficiency of PMNn in dealing with virulent *E. histolytica* by depressing the two leading oxida-

tive mechanisms (i.e., reactive oxygen intermediates and NO) that these cells would probably employ in such a confrontation. On the other hand, activated human MP kill virulent *E. histolytica* using both nonoxidative and oxidative processes (probably including NO). The oxidative lysis of *E. histolytica* by murine MP depends more on the generation of NO than on the production of reactive oxygen intermediates, the latter actually acting as cofactors for the ultimate effector NO molecule (2). Finally, NO also appears to play some steering role in the progress from an acute to a chronic inflammatory reaction (5). Thus, MLIF, by inhibiting NO production in PMNn and MP [as NO synthetase inhibitors (iNOS) do] may contribute, on the one hand, to the establishment of sterile amebic abscesses of the liver, but also to the notorious paucity of late inflammatory changes observed in these lesions.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT (Mexico) Grant No. 3206P-9608.

References

- Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas M, López-Osuna M, Lecuona M, Castro E, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of asexually grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 1985;7:527.
- Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by NO from L-arginine. *J Immunol* 1992;148:3999.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407.
- Rico G, Diaz-Guerra O, Giménez-Scherer JA, Kretschmer R. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res* 1992;23(5):157.
- Mridula B, Parssa F. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce NO by a cell maturation-dependent process. *Immunol Lett* 1995;48:59.

**THE MONOCYTE LOCOMOTION INHIBITORY FACTOR (MLIF)
PRODUCED BY *E. histolytica* INHIBITS INDUCED NITRIC OXIDE
PRODUCTION IN HUMAN LEUCOCYTES.**

Rico, G., Leandro, E., Rojas, S. and Kretschmer, R.R.

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Coordinación de Investigación
Médica.

Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

México, D. F.

Running title: *E. histolytica* peptide inhibits nitric oxide.

Keywords: *E. histolytica*, human leucocytes nitric oxide

Correspondence:

ROBERTO R. KRETSCHMER S. M.D.
Unidad de Investigación en Inmunología
Coordinación de Investigación Médica
Apdo. Postal 73-032 (PO Box)
México, D. F. 03020, México

SUMMARY

The native *monocyte locomotion inhibitory factor* (nMLIF), a pentapeptide produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*, as well as a synthetic construct of the same (sMLIF), inhibit the *induced* nitric oxide production of human mononuclear phagocytes and polymorphonuclear neutrophils stimulated by INF- γ , TNF- α or PMA. Thus, we have to add this affect of MLIF to the known inhibition of mononuclear phagocyte locomotion in mononuclear phagocytes and the depression of reactive oxygen intermediates production in both, mononuclear phagocytes and neutrophils. The inhibited nitric oxide production in both types of leucocytes may affect, on the one hand the killing of *Entamoeba histoytica* by neutrophils in the early inflammatory stages where the two types of inorganic oxidant molecules (ie. reactive oxygen intermediates and nitric oxide) would be used, and in the late stages, when both oxidative (including nitric oxide production) but also non oxidative mechanisms are employed by macrophages. On the other hand, depression of nitric oxide production may contribute to the paucity of the late, predominantly mononuclear leucocyte inflammatory reaction observed in amebic abscess of the liver, probably due to a weakening of the steering effect of nitric oxide on the progression of an the inflammatory reaction.

INTRODUCTION

Less than one percent of the worldwide 5×10^7 patients with intestinal disease caused by *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) develop amebic abscess of the liver (AAL) (Gutiérrez 1986), a condition with an unusual inflammatory progression, where an *early* intense acute inflammatory process is followed by an unexpectedly scarce *late*, mononuclear cell inflammatory reaction (Tsutsumi & Martínez-Palomo 1988). Equally remarkable, and perhaps related to the paucity of this *late* inflammation, is the perfect regeneration of the liver without scarring (*restitutio ad integrum*), that occurs following successful treatment of this condition (Sepúlveda & Martínez-Palomo 1982). This anti-inflammatory experiment of nature in man appears worth exploring. Since the inflammatory capacity of AAL patients is intrinsically normal before and after the amebic event (Arellano *et al.* 1996), a search for anti-inflammatory factors produced by the parasite seemed justified. This led to the description of a heat-stable oligopeptide synthesized by *E. histolytica* that , without harming the cells, inhibits the *in vitro* locomotion of human peripheral blood monocytes (mononuclear phagocytes (MP)), leaving that of human polymorphonuclear neutrophils (PMNn) (Kretschmer *et al.* 1985) and eosinophils (Rico & Kretschmer 1998) unaffected. The factor was named *monocyte locomotion inhibitory factor* (MLIF), even though it was subsequently found that MLIF also virtually cancels the production of reactive oxygen intermediates (i.e. H_2O_2 , OH° , $O_2^{\circ -}$) in MP, but now also in PMNn, sparing again eosinophils of this effect (Rico & Kretschmer 1998). The primary structure (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) of the pentapeptide was recently established by HPLC, mass spectrometry and Edman sequencing (Kretschmer, Rico & Giménez 2000).

Nitric oxide is as a highly versatile reactive oxidant molecule derived from arginine metabolism, that participates in a variety of physiological and pathological events, including lytic effects upon invading microorganisms (MacMicking, Xie & Nathan 1997). The capacity for *constitutive* and *induced* nitric oxide synthesis has been found in an extensive array of cell types, including human leukocytes (Green & Nacy 1993, Nathan 1987). Moreover, nitric oxide appears to be an important – perhaps the most important – lytic agent used *in vitro* by murine MP against *E. histolytica* (Lin & Chadee 1992, Wang, Keller & Chadee 1994), and human MP use both oxidative (probably including nitric oxide) and non-oxidative mechanisms to destroy virulent *E. histolytica in vitro* (Salata, Pearson & Ravdin 1985). It should be remembered that human and rodent PMNn – even in numerical superiority and assisted by antiamebic antibodies and complement – are rather incompetent in dealing with *E. histolytica in vitro* (Guerrant *et al.* 1981, López Osuna, Contreras & Kretschmer 1986). We now evaluated the effect of MLIF on the induced production of nitric oxide by human MP and PMNn, to gain a better understanding of the interaction between *E. histolytica* and human leucocytes.

MATERIAL AND METHODS

MLIF production: Fifty ml of 72 h log-phase axenic cultures of $2.0-2.5 \times 10^5$ *E. histolytica* HM1-IMSS (kindly provided by Dra. Cecilia Ximénez, Depto. Med. Exp. UNAM. México. D.F., México) were centrifuged at $200 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant fluid was ultrafiltered stepwise through PM-50, PM-30, PM-10, UM-2 and YC-05 Amicon filters (Amicon Corp., Lexington, MA) in order to obtain material below 1000 Da. Samples of 1.5 ml were then applied to Sephadex G-15 (Sigma

Chemical Co, St. Louis MO) chromatographic columns and eluted with phosphate buffered saline solution pH 7.4 (PBS). Native MLIF (nMLIF) activity is recovered in the 478-731 Da fraction (Kretschmer *et al.* 1985). A 96% pure synthetic construct of MLIF (sMLIF) was commercially obtained (American Peptide Co. Inc. Sunnyvale, CA). The peptide content of nMLIF and sMLIF was established by Biorad (Bradford 1976).

Leukocyte isolation: Thirty ml of venous heparinized blood was obtained from twelve healthy, non-smoking adult volunteer donors of either sex. Blood was diluted 1:2 with RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY); ten ml samples were layered over a 4 ml Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gradient ($\delta=1.077$) and centrifuged for 30 min at $400 \times g$, 18°C . For the isolation of peripheral blood MP (PBMP) the cell interface was recovered and washed twice with RPMI-1640 with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). One ml samples with three $\times 10^6$ cells containing 1.5×10^4 adherent MP were placed in 24 cluster plates (Falcon Plastics, Oxnard, CA) and were incubated for two h at 37°C with 5% CO_2 to allow for MP adherence. The supernatant fluid with non-adherent cells was discarded and each well was reconstituted by the addition of one ml of RPMI-1640-FCS. Plates were then incubated for seven days to allow for full PBMP maturation (Martin & Edwards 1993). Viability of adherent cells was $\geq 92\%$ by Trypan blue dye exclusion. For the isolation of PMN (mostly ($\geq 98\%$) neutrophils), the cell button obtained after the initial gradient, was diluted in one ml of PBS and was added to four ml of 3% Dextran (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) in 50 ml conic polystyrene tubes (Falcon Plastics, Oxnard, CA). The mixture was incubated for 30 min at 37°C in a 60° tilted position for sedimentation. The supernatant fluid was carefully removed with a

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

fine-tip Pasteur pipette, transferred to a glass tube and centrifuged at $400 \times g$ at 4°C for 10 min. The supernatant fluid wa

s eliminated and the cell-button exposed to a single NH_4Cl hypotonic shock (Roos & De Boer 1986). After washing, cells were resuspended in RPMI-1640-FCS, and one ml samples with one $\times 10^6$ PMN were placed in 24 cluster plates (Falcon Plastics, Oxnard, CA). PMN viability was $\geq 95\%$ by Trypan blue dye exclusion.

Human U937 MP cell line. This human promonocytic cell line (ATCC CRL-1593.2 American Type Culture Collection, Rockville, MD) was a generous gift from Dr. Vianney Ortiz (Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV, México D. F., México) and was maintained in RPMI-1640-FCS with 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Cells were expanded in the same medium and harvested during log phase. One ml samples of eight $\times 10^4$ U937-MP/ml were placed in 24 cluster plates (Falcon Plastics, Oxnard, CA) and were incubated for 24 h adding 10 μl of 1-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, Chemical Co, St. Louis MO) (160 nM/well) for full maturation. Viability of these cells was $\geq 96\%$ by Trypan blue dye exclusion.

Stimulation of cells: Mature PBMP and cell line MP were stimulated by the addition of rhIFN- γ (100 U/well) or of rhTNF- α (1 ng/well) (RD Systems, Minneapolis, MN), alone or in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ of nMLIF or sMLIF (1.73×10^{-7} M). PMNs were stimulated with rhIFN- γ (100 U/well) or PMA (160nM/well) alone or, just as with MP, in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ of nMLIF or sMLIF. Controls consisted of cells incubated in the culture medium alone, without cytokine stimulation (*i.e.* constitutive nitric oxide production), or cells exposed to nMLIF or sMLIF alone. Activators (rhIFN- γ , rhTNF- α and PMA) and MLIF (n, s) were added in 10 μl samples. The final volumen of each well was adjusted to 1020 μl with RPMI-1640-FCS when required.

All experiments (n = 12) were performed in duplicate. Preliminary studies had shown 72 h to be the optimal incubation time for MP, and 24 hs the optimal time for PMNn nitric oxide production (Kretschmer, Rico & Leandro 1999). MLIF-inhibition studies were therefore performed at these previously established incubation times. The cell-free supernatant fluid was collected by pipetting and was placed in plastic tubes (Falcon Plastics, Oxnard, CA) for centrifugation at 200 x g for 10 min. The supernatant fluid was removed and individually frozen at -70°C until assayed for nitric oxide content.

Nitric oxide determination. Nitric oxide production was measured as nitrite concentration in the supernatant fluid using a colorimetric assay based on the Greiss reaction (Ding, Nathan & Stuehr 1988) (Greiss Reagent System Promega Corporation, Madison WI). Samples of 100 µl of supernatant fluid were mixed with an equal volume of Greiss reagent (1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water) at room temperature for 10 min, and absorbance read at 540 nm in a Micro-Elisa Auto-reader MR 570 (Dynatech Laboratories, Virginia, MD). Sodium nitrite (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used to construct a standard curve of reference Results were expressed as µM nitric oxide/100µl supernatant fluid.

Statistical analysis. Results were statistically analyzed by the Fisher test for analysis of variance, Student's t-test and Mann Whitney U test (Siegel 1956).

RESULTS

The number of the three cell types employed in these experiments was adjusted so as to obtain quantitatively comparable amounts of *constitutive* and *induced* (five to ten, and five to seven fold increases in MP (PBMP and U937-MP cell line) and PMNn

respectively) nitric oxide production by leucocytes *per well* (Table 1). The different number of cells thus employed reveal that MP (specially PBMP, as opposed to the weaker U937-MP) were better producers of induced nitric oxide than PMNn, since about 10^2 more PMNn than PBMP (or 1.2×10^1 U937-MP) were required to achieve the same amount of nitric oxide production per well (Table 1). Of the single inducers used in these experiments, rhIFN- γ turned out to be the best choice for MP (both PBMP and U937-MP); for PMN, rhIFN- γ and PMA worked equally well (Table 1 and Fig. 1, 2, 3).

Furthermore, the weak increase - not inhibition - of nitric oxide production by cells when exposed to nMLIF or sMLIF (1.7×10^{-9} M) alone was not significantly different from the *constitutive* baseline nitric oxide production by the same cells (Table 1). Subtractive calculations were therefore not necessary, as the results provided an adequate framework for studying the effect of MLIF upon the *induced* production of nitric oxide by human leucocytes under conditions of single stimulation.

All the *induced* nitric oxide production models in this study were significantly ($p \leq 0.05$) and comparably inhibited by both nMLIF and by sMLIF, except when U-937 MP cells stimulated by TNF- α were exposed to nMLIF (*vide infra*). The weaker production of nitric oxide by PMNn (see number of cells employed) was, nevertheless, more inhibitable than that of the stronger nitric oxide production of MP ($p < 0.0001$) irrespective of the inducer (rhIFN- γ or PMA) employed ((Fig. 1,2,3). In PBMP, the nitric oxide production induced by rhIFN- γ was more vigorously inhibited by MLIF than the relatively weaker nitric oxide production induced by TNF- α in these cells (Fig. 1). Both nMLIF or sMLIF significantly ($p \leq 0.05$) inhibited nitric oxide

production by about 50% (0.427 vs. 0.230 or 0.231 μM respectively) in rhIFN- γ stimulated PBMP, and by about 30% (0.229 vs. 0.167 or 0.169 μM respectively) when the cells were stimulated with rhTNF- α (Fig. 1). When U937 cell line MP were employed, nMLIF or sMLIF again significantly ($p \leq 0.05$) inhibited nitric oxide production. but now only by about 30% (0.449 vs. 0.310 and 0.247 μM respectively) in rhIFN- γ , and by about 15% (0.207 vs. 0.177 and 0.164 μM respectively) in rhTNF- α stimulated cells, although - as said - inhibition using nMLIF, as opposed to sMLIF, was not significant in these cells (Fig. 2)). On the other hand, nMLIF and sMLIF significantly ($p < 0.0001$) inhibited nitric oxide production by about 80 % in both rhIFN- γ stimulated PMNn (0.306 vs. 0.062 or 0.072 μM respectively) and PMA stimulated PMNn (0.218 vs. 0.072 or 0.064 μM respectively) (Fig. 3).

DISCUSSION

The first observation that deserves to be recorded is that in these studies of inhibition of nitric oxide production by the amebic factor, the synthetic construct of MLIF (sMLIF) and the native material (nMLIF) performed similarly, thus confirming previous *in vitro* and *in vivo* experiments comparing these materials (Kretschmer *et al.* 2000). .

Thus, in addition to the inhibitory effect exerted by MLIF on the *in vitro* and the *in vivo* locomotion of MP (Kretschmer *et al.* 1985), and on the production of reactive oxygen intermediates (H_2O_2 , OH° , and $\text{O}_2^{\circ-}$) by both MP and PMNn, MLIF also inhibits the *induced* production of nitric oxide in both types of leucocytes. The ability of MLIF to inhibit nitric oxide in stimulated human MP and PMNn may be of biological

relevance in amebiasis. On the one hand, it may contribute to the notorious inefficiency of PMN neutrophils when dealing with virulent *E. histolytica* (Guerrant *et al.* 1981, López Osuna *et al.* 1986) by depressing the two leading oxidative mechanisms (i.e. reactive oxygen intermediates and nitric oxide) these cells would probably employ in such a confrontation. On the other hand, activated human MP are capable of killing virulent *E. histolytica* using non-oxidative (Wang *et al.* 1994), but also oxidative (Salata *et al.* 1987) processes, the latter probably including nitric oxide. The oxidative lysis of *E. histolytica* by murine MP at least, depends more on the generation of nitric oxide than on the production of reactive oxygen intermediates, the latter participating as cofactors for the ultimate effector nitric oxide molecule (Lin & Chadee 1992).

These two independently produced - yet related - classes of inorganic oxidants (Ding *et al.* 1988) have been implicated in the overall cytotoxic effects exerted by MP upon microorganisms (Reed, Nathan & Phil 1987). Nitrites are accumulated in the supernatant fluid of human MP cultures after prolonged exposure to cytokines, but also as a result of the presence of infectious agents (Denis 1991), and Muñoz-Fernández *et al.* (1992) described the nitric oxide-dependent killing of the protozoan *Trypanosoma cruzi* in human macrophages activated by IFN- γ or TNF- α . Moreover, nitric oxide may also have a steering role in the progression from an acute to a chronic inflammatory reaction (Mirudla & Parissa 1995), as treatment with nitric oxide synthetase inhibitors (iNOS) not only reduces the effectiveness of acute inflammation in rats (Ialenti *et al.* 1992), but also protects against subsequent *late* inflammatory tissue damage (Buckberg *et al.* 1992, Oury *et al.* 1992). MLIF, by inhibiting (like iNOS) nitric oxide production by PMNs and MP, may then contribute, first to the unopposed establishment of microbiologically sterile amebic "abscesses" in the liver, and then to

**Constitutive and induced nitric oxide production by
human leucocytes ($\mu\text{M}/100 \mu\text{l}$)**

	PBMP ^a (1.5×10^4 /well/72h)	U937-MP ^b (8×10^4 /well/72h)	PMN ^c (1×10^6 /well/24h)
Constitutive			
culture medium	$0.041 \pm 0.009^{\text{d}}$	$0.043 \pm 0.010^{\text{m}}$	$0.045 \pm 0.002^{\text{f}}$
nMLIF ^d	$0.084 \pm 0.007^{\text{h}}$	$0.077 \pm 0.006^{\text{n}}$	$0.065 \pm 0.002^{\text{s}}$
sMLIF ^e	$0.075 \pm 0.002^{\text{i}}$	$0.096 \pm 0.047^{\text{o}}$	$0.076 \pm 0.004^{\text{t}}$
Induced			
rhIFN - γ	$0.427 \pm 0.014^{\text{j}}$	$0.449 \pm 0.040^{\text{p}}$	$0.306 \pm 0.084^{\text{u}}$
rhTNF - α	$0.229 \pm 0.023^{\text{k}}$	$0.207 \pm 0.013^{\text{q}}$	ND
PMA ^f	ND ⁱ	ND	$0.218 \pm 0.040^{\text{v}}$

a peripheral blood mononuclear phagocytes
b U937 mononuclear phagocyte cell line
c polymorphonuclear neutrophils
d native *monocyte locomotion inhibitory factor*
e synthetic *monocyte locomotion inhibitory factor*
f phorbol miristate acetate
g $x \pm \text{SEM}$
i not done
w not significant

g vs h	NS ^w	m vs n	NS	r vs s	NS
g vs i	NS	m vs o	NS	r vs t	NS
g vs j	p<0.005	m vs p	p<0.005	r vs u	p<0.005
g vs k	p<0.005	m vs q	p<0.005	r vs v	p<0.005
h vs i	NS	n vs o	NS	s vs r	NS
j vs k	p<0.005	p vs q	p<0.005	u vs v	NS

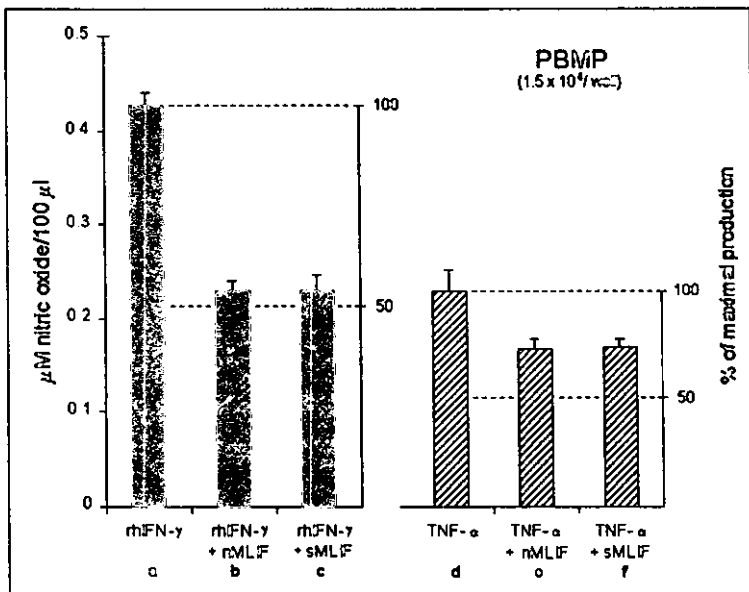


Figure 1 Inhibition of induced nitric oxide production ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) by nMLIF and sMLIF

Statistical analysis

a vs b	p < 0.005	d vs e	p < 0.05	a vs d	p < 0.0001
a vs c	p < 0.005	d vs f	p < 0.05	b vs e	p < 0.001
b vs c	NS	e vs f	NS	c vs f	p < 0.005

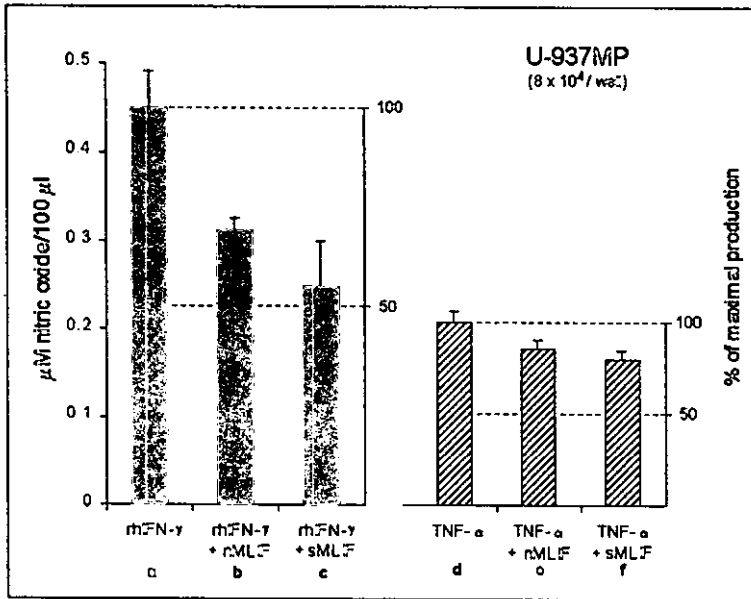


Figure 2 Inhibition of induced nitric oxide production ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) by nMLIF and sMLIF

Statistical analysis

a vs b	p < 0.05	d vs e	NS	a vs d	p < 0.0001
a vs c	p < 0.05	d vs f	p < 0.005	b vs e	p < 0.01
b vs c	NS	e vs f	NS	c vs f	NS

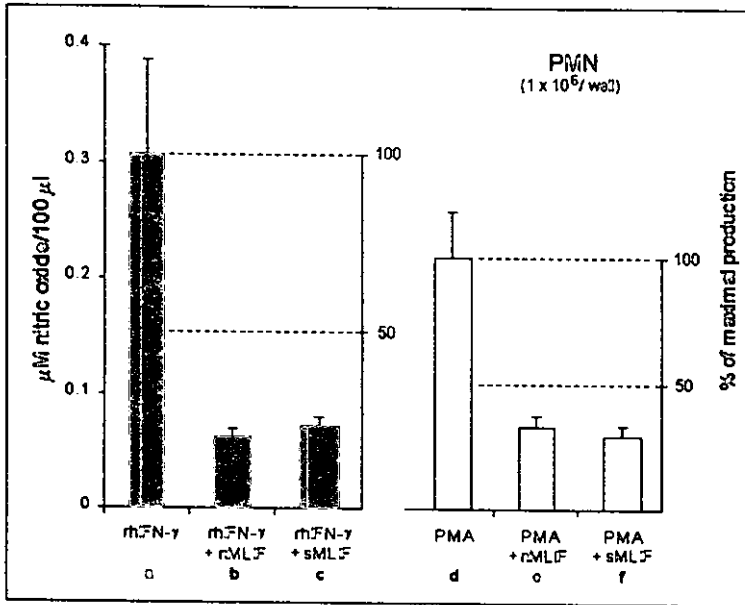


Figure 3 Inhibition of induced nitric oxide production ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) by nMLIF and sMLIF

Statistical analysis

a vs b	p < 0.0001	d vs e	p < 0.0001	a vs d	NS
a vs c	p < 0.0001	d vs f	p < 0.0001	b vs e	NS
b vs c	NS	e vs f	NS	c vs f	NS

the notorious paucity of late inflammatory changes observed in these lesions (Tsutsumi & Martínez-Palomo 1988)

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by CONACYT (México) grant no.3206P-9608. We thank Ms. Berenice Ramírez for the patient typing of this manuscript.

REFERENCES

Arellano J., Pérez-Rodríguez M., López-Osuna M. *et al.* (1996) Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SC01 in Mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunology* **18**, 491-498

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**, 248-254

Buckberg G.D., Matheis G., Sherman M.P., Haybron D.M. & Ignarro R.J. (1992) Myocardial reoxygenation injury after ischaemia is mediated by the L-arginine: nitric oxide pathway. In *The Biology of Nitric Oxide*, ed. S. Moncada, MA. Marletta, Jr.JB. Hibbs, EA. Higgs, p 52, Portland Press, London

De Groote M.A. & Fang F.C. (1995) NO inhibitions: Antimicrobial properties of nitric oxide. *Clinical Infectious Diseases* **21** (Suppl 2), S162-S165

- Denis M. (1991) Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercule bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cellular Immunology* 132, 150-157
- Denis M. (1994) Human monocytes/macrophages : NO or no NO? *Journal of Leukocyte Biology* 55, 682-684
- Ding A.H., Nathan C.F. & Stuehr D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 141, 2407-2412
- Green S.J. & Nacy C.A. (1993) Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 6, 384-396
- Guerrant R.L., Brush J., Ravdin J.I., Sullivan J.A. & Mandell G.L. (1981) Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Infectious Diseases* 143, 83-93
- Gutiérrez G. (1986) Epidemiología y control de la amibiasis en México. *Archivos de Investigación Médica* 17, 375-383
- Ialenti A., Ianaro A., Moncada S. & Di Rosa M. (1992) Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 211, 177-182

- Kretschmer R., Collado M.L., Pacheco M.G. *et al.* (1985) Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunology* 7, 527-543
- Kretschmer R., Rico G. & Leandro Z. E. (1999) The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* inhibits nitric oxide production in human macrophages. *FASEB Journal* 13, A660
- Kretschmer R., Rico G. & Giménez J.A. (2000) Structure and origin of an anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Exp Biol.*
- Lin J.Y. & Chadee K. (1992) Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 148, 3999-4005
- López-Osuna M., Contreras B.A. & Kretschmer R.R. (1986) *In vitro* studies of the interaction of polymorphonuclear leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica* 17, 243-246
- MacMicking J., Xie Q.W. & Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15, 323-350
- Marletta M.A. (1989) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends in Biochemistry Science* 14, 488-492

- Martin J. H. J. & Edwards S.W. (1993) Changes in mechanisms of monocyte-macrophages mediated cytotoxicity during culture. *Journal of Immunology* **150**, 3478-3486
- Mridula B. & Parissa F. (1995) Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process. *Immunology Letters* **48**, 59-64
- Muñoz-Fernández M.A., Fernández M.A. & Fresno M. (1992) Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology Letters* **33**, 35-40
- Nathan C.F. (1987) Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **79**, 319-327
- Oury T.D., Ho Y.S., Piantadosi C.A. & Crapo J.D. (1992) Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proceedings of the National Academy of Science* **89**, 9715-9719
- Pérez-Tamayo R. & Brandt H. (1971) In Amibiasis *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*. ed. R.A. Marcial-Rojas, p. 145, Williams and Wilkins, Baltimore

- Reed S.G., Nathan C.F., Phil D.L. *et al.* (1987) Recombinant granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and releases hydrogen peroxide: comparison with interferon-gamma. *Journal of Experimental Medicine* **166**, 1734-1746
- Rico G., Díaz-Guerra O., Giménez-Scherer J.A. & Kretschmer R. (1992) Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leucocytes. *Archives of Medical Research* **23** (5), 157-159
- Rico G. & Kretschmer R. (1998) The human monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. *Parasitology Research* **84**, 522-523
- Roos D. & De Boer M. (1986) Purification and cryopreservation of phagocytes from human blood. In *Methods of Enzymology*, ed. G. Disabato, J. Everse, p. 225. Academic Press, New York
- Salata R.A., Pearson R.D. & Ravdin J.I. (1985) Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amoebae by the activated macrophage. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 491-499
- Sepúlveda B. & Martínez-Palomo A. (1982) Immunology of amebiasis by *E. histolytica*. In *Immunology of Parasitic Disease*, ed. S. Cohen & K.S. Warren, p. 170, Blackwell Scientific Publications, Oxford

- Siegel S. (1956) Non-parametric Statistics for Behavioral Sciences, ed Mc Graw Hill, Book Co, p. 116, New York
- Tsutsumi V. & Martinez-Palomo A. (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology* **130**, 112-119
- Walsh J.A. (1986) Problems in recognition and differences in amebiasis: estimation of global magnitude of morbidity. *Review of Infectious Diseases* **8**, 228-238
- 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 tumor cells. *Immunology* **83**, 601-610