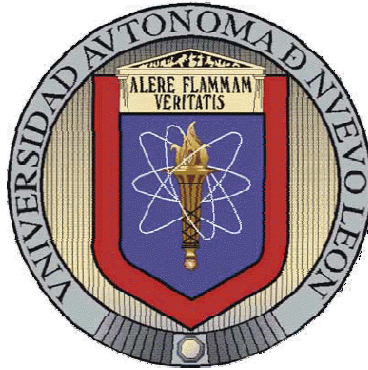


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *E. histolytica*
INDUCTORES DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
EN FAGOCITOS HUMANOS**

Por

RUTH CORRAL SYMES

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad
en Inmunobiología**

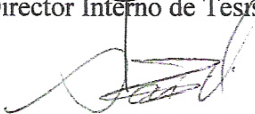
Julio, 2008.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *E. histolytica*
INDUCTORES DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
EN FAGOCITOS HUMANOS**


Comité de Tesis



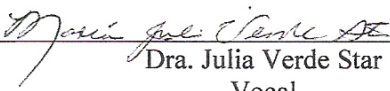
Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director Interno de Tesis




Dr. Salvador Said Fernández
Director Externo de Tesis



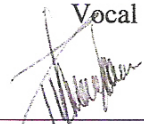
Dr. Ricardo Gómez Flores
Secretario




Dra. Julia Verde Star
Vocal



Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal



Dra. Rebeca Palacios Corona
Vocal



Dra. Diana Reséndez Pérez
Sub-Director de Estudios de Posgrado

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN

El Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González.

La División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey N. L., bajo la dirección del Dr. Salvador Said Fernández.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento:

A la Facultad de Ciencias Biológicas y al Departamento de Posgrado de la Universidad Autónoma de Nuevo León por darme la oportunidad de realizar estudios de posgrado y por todas las facilidades recibidas durante mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme el apoyo de beca No. 193885.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por el apoyo otorgado durante la realización de esta tesis, permitiéndome el uso de sus instalaciones, equipos y reactivos.

Al Dr. Salvador Said Fernández por el apoyo brindado en el transcurso de mi formación, por todas sus enseñanzas, por estar al pendiente de mis actividades, por la revisión y crítica del presente trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González por el apoyo brindado durante mi formación, por la revisión y crítica del presente trabajo.

Al Dr. Ricardo Gómez Flores, a la Dra. Diana Reséndez y a la Dra. Julia Verde Star por sus valiosas críticas y sugerencias brindadas en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Rebeca Palacios Corona por participar activamente en mi formación, por su asesoramiento en el desarrollo, crítica y revisión de esta tesis. Por sus consejos profesionales y personales, por darme su tiempo y su afecto, pero sobretodo por ayudarme a recuperar la confianza en mí misma.

Al Dr. Benito Mata Cárdenas por su asesoría constante en el cultivo de amibas, por todas sus enseñanzas y por toda la ayuda brindada.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal por su apoyo y asesoría en el desarrollo de esta tesis, por sus enseñanzas en el laboratorio, por la crítica y revisión de esta tesis. Y finalmente, por ser un gran ejemplo a seguir.

Al Dr. Moisés Franco por su asesoría en la etapa final de esta tesis, por sus críticas y sugerencias, y por las facilidades brindadas en el uso de sus instalaciones, equipos y reactivos.

Al Dr. Vianney Ortiz (CINVESTAV, México) por proporcionarnos las líneas celulares THP-1 y U937.

Al M.C. Víctor Torres por su apoyo y asesoría constante en el manejo de HPLC y Espectrometría de Masas, así como en el análisis e interpretación de los resultados.

Al M.C. Alberto López por su participación en la parte experimental de este proyecto.

Al M.C Gerardo Lozano Garza por el apoyo brindado en el manejo de los hámsters Sirio Dorados y por su participación en la parte experimental de este proyecto.

A María José Covarrubias por su compañerismo en las horas de trabajo, por su apoyo en los momentos más difíciles, por hacer amenas las desveladas en el laboratorio y por ser una gran amiga.

A Manuel, Toñito, Ofelia, Leticia, Liliana, Silvia, Chuy y Alma por el apoyo brindado, por su compañerismo y amistad.

A mi esposo y a mi familia por el amor, paciencia, comprensión y apoyo brindados durante mi formación.

A todas las personas que contribuyeron de una forma y otra en el desarrollo de este trabajo y que no mencione, gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT	16
2. INTRODUCCIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo General	
4.2 Objetivos Particulares	
4.3 Metas	
5. ANTECEDENTES	20
5.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	20
5.2 Epidemiología	20
5.3 Genética	21
5.4 Ciclo Vital y Enfermedad Clínica	21
5.5 Patogenicidad	23
5.6 Respuesta inmune frente a <i>E. histolytica</i>	24
5.6.1 Respuesta innata	24
5.6.1.1.Sistema Complemento	
5.6.1.2.Monocitos y Macrófagos	
5.6.1.3.Neutrófilos	
5.6.1.4.Linfocitos Natural Killer y Eosinófilos	
5.6.2 Respuesta adaptativa	25
5.6.2.1.Inmunidad humoral	
5.6.2.2.Inmunidad celular	
5.6.2.2.1. Activación de macrófagos mediada por linfocitos T	
5.6.3 Características del Óxido Nítrico (NO)	27
5.6.4 Síntesis de NO	28
5.6.5 Expresión de la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en infección e inflamación	29
5.6.6 Problemática en la producción de NO por macrófagos humanos	30
5.6.7 Regulación del transporte de L-arginina en macrófagos murinos y humanos	30
5.7 Desarrollo de Vacunas contra <i>E. histolytica</i>	30

6. MÉTODOS	32
6.1 Origen de los reactivos	32
6.2 Material biológico	33
6.2.1 Sangre	33
6.2.2 Línea celular THP-1 y U937	33
6.2.3 Línea celular J774	33
6.2.4 Cepa de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS	33
6.2.5 Animales de Laboratorio	34
6.3 Estandarización del modelo para la producción de NO en fagocitos humanos (FgH)	34
6.3.1 Preparación del medio de cultivo RPMI-1640	34
6.3.2 Composición y preparación de Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS)	34
6.3.3 Preparación de Lipopolisacáridos (LPS) de <i>Escherichia coli</i> serotipo 0127:B8	34
6.3.4 Preparación de Forbol-12-miristato acetato (PMA)	35
6.3.5 Preparación de N ^G - monometil-L-arginina (L-NMMA)	35
6.3.6 Aislamiento, cultivo y estimulación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP)	35
6.3.7 Cultivo y estimulación de monocitos humanos THP-1 y U937	36
6.3.8 Cultivo y estimulación de macrófagos murinos J774	37
6.3.9 Cultivo y estimulación de células totales de sangre periférica	37
6.3.10 Determinación de nitritos por la técnica de Griess (Stuerh, 1989)	38
6.3.11 Determinación de la producción total de NO por la técnica de Griess	38
6.4 Obtención del antígeno total amibiano (ATA) y determinación de su efecto sobre la producción total de NO en FgH	40
6.4.1 Obtención del Suero bovino para cultivo de amibas	40
6.4.2 Preparación del medio PEHPS	40
6.4.3 Cultivos amibianos axénicos	41
6.4.4 Curva de Crecimiento de <i>E. histolytica</i>	41
6.4.5 Inducción de Absceso Hepático Amibiano (AHA) en hámsters	41
6.4.6 Obtención de amibas virulentas a partir de un AHA	42
6.4.7 Cultivos masivos de amibas virulentas	42
6.4.7.1. Cultivo en Spinner	
6.4.7.2. Cultivo en tubo	
6.4.8 Obtención del ATA	42
6.4.9 Cuantificación de Proteínas	43
6.4.10 Determinación de la producción total de NO en FgH estimulados con ATA	44
6.5 Obtención de fracciones de antígeno digerido con tripsina (ADT) mediante HPLC	44
6.5.1 Solución de Tripsina	44
6.5.2 Solución de carbonato de amonio 0.4 M	44

6.5.3 Digestión	44
6.5.4 Fraccionamiento del ADT mediante HPLC	44
6.6 Identificación de fracciones con mayor habilidad para inducir la producción de NO en FgH	45
6.7 Determinación del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) en plasma	45
6.8 Secuenciación de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas	46
6.8.1 Digestión del ATA para su posterior secuenciación	46
6.8.2 Solubilización de péptidos hidrofóbicos	47
6.8.3 Secuenciación	47
7. RESULTADOS	49
7.1 Estandarización del modelo para la producción de NO en FgH	49
7.2 Obtención del ATA y determinación de su efecto sobre la producción total NO en FgH	59
7.3 Obtención de fracciones de ADT mediante HPLC	64
7.4 Identificación de fracciones con mayor habilidad para inducir la producción de NO en FgH	68
7.5 Determinación de TNF- α en plasma	69
7.6 Secuenciación de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas	70
8. DISCUSIÓN	71
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
10. LITERATURA CITADA	76
11. APÉNDICE.- TABLAS DE MÉTODOS	97

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Enzimas Diana del Óxido Nítrico	28
II.	Preparación de la curva estándar de nitrato de sodio	97
III.	Curva Estándar para la determinación de proteínas por el método de Lowry	97
IV.	Programa para generar el gradiente de ácido trifluoroacético y acetonitrilo	98
V.	Programa para generar el gradiente de acetonitrilo	98

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Formas morfológicas de <i>E. histolytica</i>	21
2. Ciclo Vital de <i>E. histolytica</i>	22
3. Absceso Hepático Amibiano	23
4. Reacción de Griess	39
5. Curva estándar para la determinación de nitritos	49
6. Producción basal de nitritos por monocitos y monocitos en co-cultivo con linfocitos	50
7. Producción de nitritos en CMSP	51
8. Morfología de células THP-1	52
9. Producción de nitritos en células THP-1 (diseño experimental No.1)	52
10. Producción de nitritos en células THP-1 (diseño experimental No.2)	53
11. Producción de nitritos en células THP-1 (diseño experimental No.3)	54
12. Producción de nitritos en células U937 y J774	55
13. Curva estándar para determinar la producción total de NO	56
14. Producción total de NO en FgH estimulados con LPS	57
15. Inhibición de la producción de NO por L-NMMA	58
16. Curva típica de crecimiento de la cepa HM1:IMSS de <i>E. histolytica</i>	59
17. Logaritmo natural del número de trofozoítos/mL contra tiempo de incubación	60
18. Obtención de amibas virulentas a partir de un AHA	61

19. Curva estándar de Seroalbumina Bovina	62
20. Determinación de la Concentración de Proteínas	62
21. Producción total de NO en FgH estimulados con ATA	63
22. Separación de Fracciones del ADT mediante HPLC	64
23. Overlay	65
24. Espectro de picos mayoritarios	66
25. Cromatograma de tripsina	67
26. Producción total de NO en FgH estimulados con fracciones amibianas	68
27. Curva estándar para la determinación de TNF- α	69
28. Producción de TNF- α en FgH estimulados con ATA y fracciones amibianas	70

NOMENCLATURA

ADT	Antígeno digerido con tripsina
AHA	Absceso hepático amibiano
ATA	Antígeno total amibiano
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
°C	Grados Centrígados
CIBIN	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CMSP	Células Mononucleares de sangre periférica
cNOS	Sintasa constitutiva del óxido nítrico
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
CR3	Receptor del complemento tipo 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EHP	Extracto de hígado y páncreas
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorbancia ligado a enzima
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FgH	Fagocitos humanos
FMN	Flavín mononucleótido
fmol	Fentomol
g	Gramos

GalNAc	N-acetilgalactosamina
GFP	Glucofibrinopéptido
h	Horas
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks
HCAT	Transportador humano de aminoácidos catiónicos
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IC	Inmunidad celular
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico
IRN	Intermediarios reactivos de nitrógeno
IRO	Intermediarios reactivos de oxígeno
K	Kilos
kDa	Kilodaltons
L	Litro
lag	Fase de Latencia o Adaptación
lb	Libras
log	Fase logarítmica
ln	Logaritmo natural
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
LPPG	Lipopéptidofosfoglicano
LPS	Lipopolisacáridos
L _{teff}	Punto de Calibración inicial (long tube effective)
MCAT	Transportador murino de aminoácidos catiónicos

M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mOsm	Miliosmoles
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
N	Normal
NADPH	Fosfato de Nicotinamida adenín dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
NK	Natural killer
nM	Nanomolar
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasa del óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución salina amortiguada de Fostatos
pg	Picogramos
plg	Pulgada

PMA	Forbol-12-Miristato Acetato
PMN	Polimorfonuclear
pmol	Picomol
p/p	Peso/peso
RNA _m	Ácido Ribonucleíco mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SAB	Seroalbúmina bovina
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
SFB	Suero Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SRHEP	Proteína de <i>E. histolytica</i> rica en serina
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
T _H	T cooperador
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
V	Volts
v/v	Volumen/volumen

1. RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad producida por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad amebicida de macrófagos activados depende principalmente de la síntesis inducible de óxido nítrico (NO). Varios antígenos han sido probados como vacunas en modelos animales. Sin embargo, aún no se ha demostrado que alguno de estos sea capaz de inducir una respuesta inmune protectora en seres humanos. Nosotros propusimos como alternativa aislar y caracterizar antígenos de *E. histolytica* capaces de activar fagocitos humanos (FgH) con producción de NO y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Se determinó la producción de nitritos, en co-cultivos de monocitos y linfocitos humanos provenientes de sangre periférica, en las líneas monocíticas humanas THP-1 y U937, y en células totales de sangre periférica estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). No se encontraron diferencias significativas en la producción de nitritos entre las células no estimuladas y los grupos experimentales ($P > 0.05$). Las diferencias significativas se observaron en la línea de macrófagos murinos J774 ($P < 0.05$). Sin embargo, al estimular células totales de sangre periférica durante 5 h con LPS y determinar la producción total de NO en plasma, mediante la reducción de nitratos a nitritos, se obtuvieron los mejores resultados ($P < 0.05$). Este modelo se utilizó para evaluar la respuesta de los FgH frente a los antígenos amibianos obtenidos.

La producción de NO en FgH estimulados con antígeno total amibiano (ATA) y con fracciones amibianas obtenidas mediante HPLC, fue dosis-dependiente. Las fracciones que indujeron la mayor producción de NO fueron la fracción F6 y F7, produciendo 25 ± 2 y 23.31 ± 2 μM , respectivamente, a una concentración de 500 ng/mL. Por otro lado, las células estimuladas con ATA y con la fracción F7 produjeron 65.2 pg/mL y 9.6 pg/mL de TNF- α , respectivamente. En ambos casos las diferencias fueron significativas con respecto a las células no estimuladas ($P < 0.05$). Nuestros resultados e investigaciones previas mostraron que existen numerosas limitaciones en modelos diseñados para determinar producción de NO en fagocitos humanos. Las principales son estimulación inadecuada, inhibición transcripcional, enzima sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) no funcional, y falta de sustrato y de cofactores indispensables.

Considerando que el TNF- α aumenta la citotoxicidad dependiente de NO de los macrófagos contra *E. histolytica*, nosotros proponemos que los antígenos aislados en el presente proyecto son excelentes inmunógenos y por tanto, candidatos para desarrollar una vacuna; porque contribuyen al desarrollo de los mecanismos efectores celulares más efectivos en la defensa del hospedero contra este parásito.

ABSTRACT

Amoebiasis is a disease produced by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *In vitro* studies have demonstrated that the amebicidal activity of activated macrophages mainly depends on the inducible synthesis of nitric oxide (NO). Several antigens have been proved as vaccines in animal models. Nevertheless, none of these has demonstrated to induce any immune protective response in human beings. As an alternative, we have proposed to isolate and characterize antigens of *E. histolytica* capable of activate human phagocytes (HFc) with NO and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production.

The nitrite production was determined in human peripheral co-cultures of monocytes and lymphocytes, THP-1 and U937 human monocyte cell lines and whole peripheral human blood cells. All of them were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). No significant differences in nitrite production were observed between non-stimulated cells and that of the experimental groups ($P > 0.05$). An important production of NO was observed when J774 murine macrophages ($P < 0.05$) were used; but the best results were obtained using whole peripheral human blood cells during 5 h in the presence of LPS. In these model NO production was determined in plasma, using the Griess method by means of the reduction of nitrates to nitrites. Thus, this latter model was used to evaluate the response of the HFc primed with the amebic antigens. NO production by HFc primed with total amebic antigen (ATA) and with the amebic fractions obtained with HPLC was dose-dependant. F6 and F7 fractions induced the highest NO production (25 ± 2 and $23.31 \pm 2 \mu\text{M}$, respectively) with an antigen concentration of 500 ng/mL. On the other hand, the cells stimulated with ATA and the F7 fraction produced 65.2 pg/mL and 9.6 pg/mL of TNF- α , respectively. In both cases the differences were significant comparing with non stimulated cells ($P < 0.05$).

Our results, in agreement with those of other workers, showed that numerous limitations exist to determine NO production in human phagocytes. The main of these are an inadequate stimulation, transcriptional inhibition, not functional inducible nitric oxide synthase (iNOS), and lacking of substrate and specific cofactors.

Considering that TNF- α increases NO-dependent macrophage cytotoxicity against *E. histolytica* and that they contribute to develop effective cellular effector mechanisms in the defense against this parasite, we are proposing that the antigens isolated from *E. histolytica* trophozoites in the present study are excellent immunogens, and therefore, these are idoneous candidates to develop an anti-*E. histolytica* vaccine.

2. INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el protozooario parásito responsable de la amibiasis. Las principales formas clínicas de esta enfermedad son colitis ulcerativa, disentería y absceso hepático. Con menor frecuencia se presenta amibiasis en piel y cerebro (Ravdin, 1989; Vohra *et al.*, 2003).

Se han identificado varios antígenos de superficie de trofozoítos de *E. histolytica* capaces de inducir una respuesta celular y/o humoral protectora en animales de experimentación, principalmente en gerbos y ratones (Krupp, 1974; Jain *et al.*, 1980; Sepúlveda, 1980; Sharma, 1985; Meerovitch, 1988; Jiménez-Cardoso, 1989; Stanley, 1996) pero estos antígenos no necesariamente son capaces de inducir el mismo tipo de respuesta en células inmunes humanas.

En el presente trabajo nosotros identificamos, aislamos y secuenciamos antígenos de *E. histolytica* que fueron capaces de activar a fagocitos humanos con una producción de óxido nítrico (NO) significativamente superior a las células no estimuladas.

Debido a que la producción de NO es la principal respuesta protectora del sistema inmune frente a *E. histolytica* y a que esta respuesta se observó en células humanas, proponemos que la principal contribución de este trabajo es que por primera vez se identificaron antígenos capaces de despertar una respuesta celular significativa en células humanas y no en células de animales de laboratorio. Es decir, contamos ahora con antígenos de *E. histolytica* que despiertan una respuesta inmune en humanos y por lo tanto contamos con excelentes candidatos para desarrollar una vacuna contra la amibiasis.

3. HIPÓTESIS

Algunos péptidos provenientes de trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de inducir producción de óxido nítrico en fagocitos humanos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar antígenos de *E. histolytica* que sean capaces de inducir producción de óxido nítrico en fagocitos humanos.

4.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la producción de óxido nítrico y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en fagocitos humanos provenientes de sangre periférica o de líneas celulares estimulados con antígenos amibianos.
2. Determinar la secuencia de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas.

4.3 Metas

1. Estandarizar el modelo de producción de óxido nítrico en fagocitos humanos.
2. Obtener Antígeno Total Amibiano (ATA) y analizar su habilidad para estimular producción de óxido nítrico en fagocitos humanos
3. Obtener, mediante HPLC, fracciones de Antígeno Digerido con Tripsina (ADT).
4. Identificar aquellas fracciones con mayor habilidad para inducir producción de óxido nítrico en fagocitos humanos.

5. ANTECEDENTES

La función del sistema inmunológico es la defensa frente a agentes extraños; incluidos microorganismos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos. Esto con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción (Abbas and Lichtman, 2004).

Una vía importante para este propósito es el sistema fagocítico mononuclear (SFM), el cual tiene como precursores a las células madre pluripotenciales; y éstas dan origen, entre otras, a las siguientes células: 1) monoblastos, 2) promonocitos, 3) monocitos y 4) macrófagos (Roitt *et al.*, 2001).

Los macrófagos son importantes células efectoras en la inmunidad innata y adaptativa. Su función en la inmunidad innata consiste en fagocitar microorganismos y sintetizar citocinas que reclutan y activan células inflamatorias. Por otro lado, actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) en las respuestas inmunitarias adaptativas mediadas por linfocitos T; los cuales, al ser estimulados por el antígeno, activan a los macrófagos para eliminar los microorganismos fagocitados mediante la producción de enzimas lisosómicas, enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) y óxido nítrico (NO) (Abbas and Lichtman, 2004).

Gran parte de la actividad antimicrobiana de los macrófagos contra bacterias, hongos, parásitos y protozoarios se debe al NO y las sustancias derivadas de él (Ramírez *et al.*, 2007; Goldsby *et al.*, 2004).

5.1 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es el agente causal de la amibiasis (Ramírez *et al.*, 2007; García *et al.*, 2007; Pertuz *et al.*, 2004; Spinella *et al.*, 1999; Martínez-Palomo, 1987) y pertenece al **Reino** Protista.; **Filo** Amoebozoa, **Clase** Archamoebae, **Orden** Entamoebida, **Familia** Entamoebidae, **Género** *Entamoeba* y **Especie** *histolytica* (Schaudinn, 1903).

5.2 Epidemiología

E. histolytica infecta 100 millones de personas y produce 100,000 muertes por año (Stauffer and Ravdin, 2003; Petri *et al.*, 2002). Durante los años 90's, se reconoció oficialmente una forma morfológicamente idéntica a *E. histolytica* denominada: *E. dispar* (no-patogénica) (OMS 1997 a y b; PAHO, 1997; Diamond *et al.*, 1993; Abd-Alla *et al.*, 1993). Ambas especies se unen a las células epiteliales del colón pero únicamente *E. histolytica* es capaz de inducir una respuesta inflamatoria y la patogénesis subsecuente (Sharma *et al.*, 2005).

5.3 Genética

E. histolytica tiene un genoma pequeño (aproximadamente 20 MB) y repetitivo que contiene secuencias codificantes para proteínas involucradas en funciones altamente conservadas y procesos celulares. Sin embargo, existen áreas del genoma que expresan polimorfismos genéticos.

Un proyecto en colaboración entre el US Institute of Genomic Research (Rockville, Maryland, USA) y el Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (Cambridge, UK) está luchando por secuenciar el genoma completo de *E. histolytica*; y para propósitos comparativos, está determinando la secuencia parcial de otras cuatro especies de protozoarios intestinales (*E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. terrapinae* y *E. invadens*) (Mann, 2002; Hall, 2003; Loftus *et al.*, 2003, 2005). Resultará interesante elucidar los genes y proteínas específicos que hacen patogénica a *E. histolytica*.

5.4 Ciclo Vital y Enfermedad Clínica

El ciclo vital de *E. histolytica* tiene 2 fases: quiste (forma infectiva) y trofozoíto (forma invasiva) (Stanley, 2005) (ver figura 1).

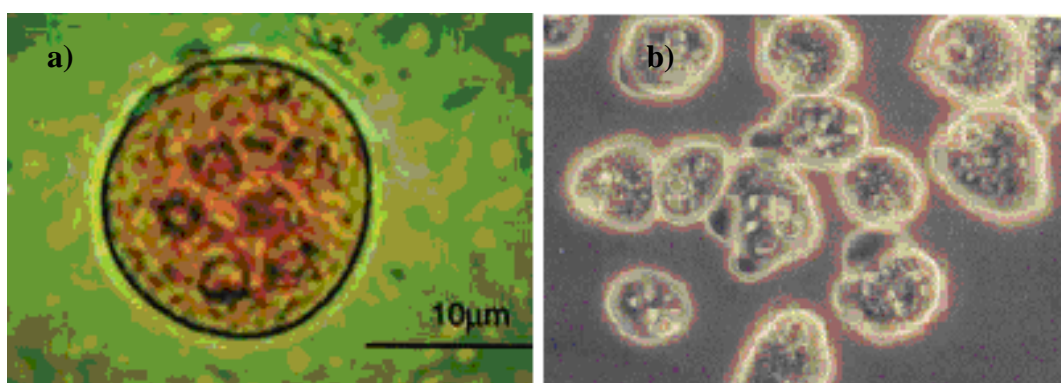


Figura 1. Formas morfológicas de *E. histolytica*: a) Quiste y b) Trofozoítos

El quiste es ingerido por el hospedero a través de agua o alimentos contaminados con heces fecales. El desenquistamiento ocurre en la luz del intestino delgado. La proteína de superficie del trofozoíto (lectina) reconoce los azúcares galactosa y N-acetilgalactosamina (GalNAc) presentes en la superficie de las células del hospedero (Stauffer and Ravdin, 2003; Ravdin and Guerrant, 1891; Petri *et al.*, 1987). La interfase de la lectina con las barreras de mucina del intestino del hospedador es el momento en que se define el transcurso de la enfermedad (Chadee *et al.*, 1987).

Si la lectina del parásito se une a las glicoproteínas de mucina que delimitan el lumen intestinal, se produce una infección no-invasiva (luminal), caracterizada por la ausencia de signos clínicos. El ciclo celular continúa mientras los trofozoítos se reproducen por expansión clonal y se inicia el enquistamiento (Eichinger, 2001). En

cambio, si el trofozoíto penetra la capa de mucina y la lectina se une directamente a GalNac, se desencadena una cascada de eventos que lleva a la muerte celular y al progreso de la enfermedad invasiva (Ravdin and Guerrant, 1891) predominando en las formas de colitis amibiana y absceso hepático amibiano (AHA) (García *et al.*, 2007; Pertuz *et al.*, 2004; Stauffer and Ravdin, 2003; Martínez-Palomo, 1987).

La amibiasis extraintestinal se caracteriza por la invasión de las amibas al intestino grueso, de donde por vía porta comúnmente llegan al hígado y se establecen, produciendo daño localizado a los hepatocitos (ver figura 2).

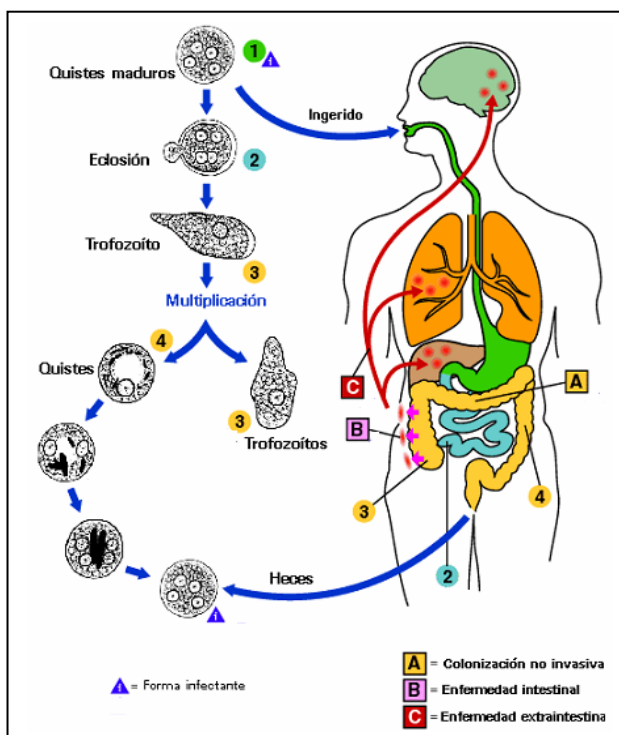


Figura 2. Ciclo Vital de *E. histolytica*.

El AHA es un área bien delimitada donde el tejido hepático es reemplazado por material necrótico de color amarillento y cremoso, sólido blando o semilíquido; frecuentemente espeso y mucoide. Los trofozoítos se encuentran distribuidos en la periferia del absceso mientras que la porción central se encuentra libre de estos (Ventura *et al.*, 2003).

El tamaño del AHA varía de lesiones puntiformes hasta masas de material necrótico que puede sustituir hasta el 90% del hígado normal (Martínez, 1989) (ver figura 3). De hecho, uno de los métodos para medir virulencia en *E. histolytica* consiste en la evaluación del daño producido por las amibas inoculadas directamente en hígado de hámster (Kretschmer, 1994).

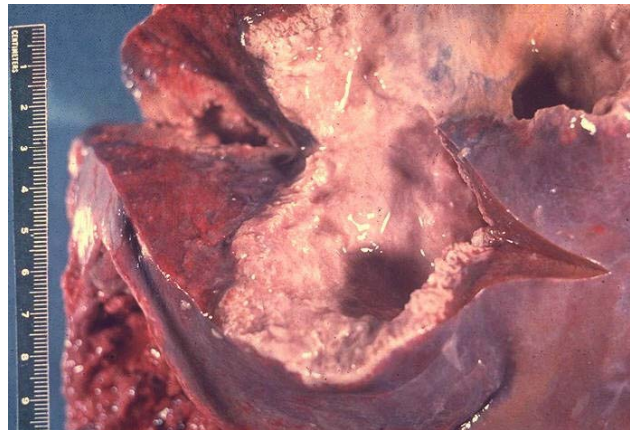


Figura 3. Absceso Hepático Amibiano

La amibiasis extraintestinal también puede presentarse en el pulmón, originada por contigüidad de las lesiones hepáticas; en el cerebro, causada por diseminación sanguínea; y en piel, causando úlceras dérmicas (Vohra *et al.*, 2003; Ravdin, 1989).

5.5 Patogenicidad

Los trofozoítos destruyen una gran variedad de líneas celulares, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y macrófagos (Stauffer and Ravdin, 2003; Guerrant *et al.*, 1981; Salata *et al.*, 1985,1986) por un mecanismo contacto-dependiente iniciado vía galactosa/GalNAc (Ravdin *et al.*, 1981,1989).

El trofozoíto inserta en la célula del hospedero un complejo proteico formador de poros, mediante el cual elimina leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (Espinosa and Martínez-Palomo, 2000). Este complejo se denomina amebaporo y es similar al sistema del complemento humano (Leippe, 1991).

Las fosfolipasas A también juegan un papel muy importante en la destrucción celular (Said-Fernández *et al.*, 1988; Vargas-Villarreal *et al.*, 1995, 1998).

Las cisteín proteasas degradan proteínas extracelulares y de las membranas celulares (Stanley, 2005; Que and Reed, 1997). Modulan la migración de leucocitos mediante el rompimiento proteolítico de quimiocinas, interfiriendo así con el proceso inflamatorio (Pertuz *et al.*, 2004). Su expresión varía entre *E. histolytica* y *E. dispar* explicando así al menos un mecanismo que permite la invasión a la mucosa del colón (Bruchhaus *et al.*, 2003; Stanley, 2003).

La capacidad de destrucción también es dependiente del calcio. Se ha demostrado que segundos después del contacto con el trofozoíto, el calcio de la célula del hospedador se incrementa ocurriendo la muerte celular (Ravdin *et al.*, 1988).

La activación de la caspasa 3, una molécula efectora distal en la vía de apoptosis, parece constituir un paso crucial en la muerte celular (*in vitro*) y en la formación del AHA (*in vivo*) (Huston *et al.*, 2000; Yan and Stanley, 2001; Ragland *et al.*, 1994).

La virulencia es directamente proporcional a la habilidad de la amiba de causar apoptosis y fagocitar las células muertas. Aparentemente este proceso limita sustancialmente la respuesta inflamatoria del hospedero (Huston *et al.*, 2003).

5.6 Respuesta Inmune frente a *E. histolytica*

La defensa frente a *E. histolytica* está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata (mediada en parte por monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa, (mediada por linfocitos T). Sin embargo, este parásito ha desarrollado múltiples efectos inmunomodulatorios que le han permitido convertirse en un exitoso patógeno.

5.6.1 Respuesta innata

5.6.1.1 Sistema del Complemento.

La resistencia inicial frente a *E. histolytica* depende de los mecanismos innatos. Más allá de las barreras físicas, químicas y mecánicas, el parásito debe enfrentar al sistema del complemento. Sin embargo, el trofozoíto ha adquirido resistencia al complejo C5b-9 a través de la expresión de un epítipo que presenta una reacción antigénica cruzada con CD59 (antígeno leucocitario que previene el ensamblaje del complejo de ataque de membrana) (Braga *et al.*, 1992). Por su parte, las cisteín proteasas degradan los componentes C3a y C5a del complemento (Reed *et al.*, 1995).

5.6.1.2 Monocitos y macrófagos.

Junto con los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos constituyen la primera línea de defensa y están situados de forma estratégica para evitar el ingreso del parásito al hospedero. Pueden ser atraídos por los efectos quimiotácticos de las amibas o por citocinas producidas por neutrófilos, células endoteliales o células de Kupffer.

Los macrófagos secretan citocinas que activan a los fagocitos y estimulan la reacción celular de la inmunidad innata conocida como inflamación. Al persistir más tiempo en los lugares de inflamación, son las células efectoras que predominan en las fases avanzadas de la respuesta inmunitaria innata. Sin embargo, se ha demostrado que las amibas lisan monocitos y macrófagos inactivados (Salata *et al.*, 1985).

Las respuestas funcionales de estos fagocitos en la defensa frente a la amibiasis constan de pasos secuenciales: atracción activa hacia las zonas de inflamación, reconocimiento no específico del parásito, fagocitosis y destrucción mediante la síntesis de moléculas microbicidas como los intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) y de nitrógeno (IRN). Una de las principales moléculas citotóxicas es el NO, el cual es sintetizado por la acción de una enzima que se denomina sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Abbas and Lichtman, 2004).

Es importante señalar que las citocinas producidas durante las reacciones innatas (P.j. IL-12) actúan como segundas señales para estimular la proliferación de los linfocitos T y B específicos del antígeno y que los mecanismos efectoras de la inmunidad innata son empleados como parte de las respuestas adaptativas para eliminar al parásito, tal y como se mostrará más adelante.

5.6.1.3 Neutrófilos.

Los neutrófilos son las células más abundantes en los tejidos inflamados y se ha demostrado que proveen resistencia natural frente a la amibiasis en ratones Balb/c (Velázquez *et al.*, 1998) y en ratones con inmunodeficiencia combinada severa SCID (por sus siglas en Inglés) [Seydel *et al.*, 1997] sugiriendo que desempeñan un papel protector durante la respuesta temprana del hospedero (Jarrillo *et al.*, 2002).

Es posible que los neutrófilos lleguen donde se encuentran localizadas las amibas por la actividad quimiotáctica de las proteínas amibianas de membrana (Guerrant *et al.*, 1981; Chadee *et al.*, 1987; Salata *et al.*, 1989), y por los fragmentos C5a y C3a producidos por activación del complemento en la superficie de la amiba (Reed *et al.*, 1989, 1995; Reed and Gigli, 1990).

La interacción entre tofozoítos y neutrófilos podría mediarse inicialmente por la lectina de 170 kDa de *E. histolytica* (Burchard and Bilke, 1992) trayendo como consecuencia una mayor expresión del receptor de complemento de tipo 3 (CR3) con 2 efectos: promoviendo la formación de conglomerados de neutrófilos alrededor de las amibas y la desgranulación de neutrófilos (Ross, 2000).

Las enzimas y péptidos catiónicos anti-microbianos presentes en los gránulos participan en la destrucción de las amibas y en el reclutamiento de células que median la respuesta innata y adaptativa (Chertov *et al.*, 2000).

Los neutrófilos que han estado en contacto con amibas, expresan iNOS, pero en menor cantidad que la expresada por macrófagos. El estímulo que induce su expresión en neutrófilos es desconocido, pero podría ser similar al descrito en macrófagos (Jarrillo-Luna *et al.*, 2000).

5.6.1.4 Linfocitos Natural Killer y Eosinófilos.

No hay reportes de la presencia de linfocitos natural killer (NK) en los infiltrados inflamatorios de amibiasis hepática experimental en animales susceptibles (hámster y gerbos) (Shibayama *et al.*, 1992; Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988; Tsutsumi *et al.*, 1984) y en especies resistentes (rata y cobayos) (Canales *et al.*, 1986; Tsutsumi *et al.*, 1990).

Considerando que los linfocitos NK están presentes solo ocasionalmente en los infiltrados inflamatorios, y sin contacto con el trofozoíto, se ha sugerido que no participan directamente en la eliminación de *E. histolytica* (Jarrillo-Luna *et al.*, 2002).

Por otro lado, los eosinófilos, al ser escasos en las lesiones con menos de 4 días de evolución, no están involucradas en la destrucción de *E. histolytica*. Sin embargo, estudios *in vitro* realizados con eosinófilos humanos activados y eosinófilos de gerbos revelaron que estas células son capaces de eliminar al parásito (Velázquez *et al.*, 1995).

5.6.2 Respuesta adaptativa

5.6.2.1 Inmunidad humoral.

La infección con *E. histolytica* ha demostrado despertar la producción de IgA e IgG frente a la lectina de unión a galactosa/GalNAc (Abd-Alla *et al.*, 2000, 2004, 2006; Ravdin *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2003; Beving *et al.*, 1996). A pesar de los

altos títulos de anticuerpos, estos no curan ni previenen el establecimiento de la enfermedad (Jarrillo *et al.*, 2002). Aunado a esto, estudios en modelos animales no han sido concluyentes acerca del papel de los anticuerpos contra *E. histolytica* (Zhang and Stanley, 1994; Zhang *et al.*, 1994 a, b, 1992). Por tanto, resulta cuestionable que la inmunidad humoral sea una respuesta protectora efectiva (Seydel *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 1995; Trissl, 1982).

5.6.2.2 Inmunidad celular.

El desarrollo de la inmunidad en un organismo parasitado es un proceso complejo que depende de las interacciones de diferentes tipos de células en un período de tiempo (Ventura-Juárez *et al.*, 2003).

En la inmunidad celular (IC) frente a los microorganismos fagocitados, la especificidad de la respuesta se debe a los linfocitos T (Abbas and Lichtman, 2004); pero la función efectora real, es decir, la destrucción de las amibas, está mediada por los propios fagocitos.

De tal forma que la IC sirve para potenciar las acciones microbidas de los fagocitos y eliminar así a los microorganismos, desempeñando un papel importante en el control y prevención de la amibiasis invasiva (Vohra *et al.*, 2003).

Esta cooperación entre los linfocitos T y los macrófagos demuestra que existe una relación importante entre la inmunidad innata y adaptativa: mediante la secreción de citocinas, los linfocitos T estimulan la función y dirigen la actividad de las células efectoras inespecíficas de la inmunidad innata (fagocitos) convirtiendo así a estas células en agentes de la inmunidad adaptativa.

5.6.2.2.1 Activación de macrófagos mediada por linfocitos T. El papel de los macrófagos en la resistencia frente a amibiasis invasiva se ha examinado en diferentes especies. Ratones tratados con sílica son susceptibles de desarrollar AHA, posiblemente por alteraciones en la función de macrófagos. Aunado a esto, la sílica podría tener efectos tóxicos directos sobre linfocitos, favoreciendo así la formación de lesiones (Jarrillo-Luna *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los linfocitos son importantes en la protección frente a la amibiasis ya que los ratones con SCID (Cieslak *et al.*, 1992) y los ratones C3H tratados con suero anti-linfocitos (Wijesundera, 1980) desarrollan lesiones hepáticas. Aunado a esto, durante el desarrollo de lesiones amibianas, los linfocitos B son activados dependiendo de la presencia de los linfocitos T CD4⁺ (Jarrillo *et al.*, 2002).

La activación de los linfocitos T CD4⁺, es primordial en la respuesta inmune celular y depende de que éstos sean capaces de reconocer en la superficie de las células presentadoras de antígeno a los antígenos específicos de los parásitos acoplados a proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

Existen dos clases de proteínas del CPH, las de clase I y las de clase II. Las de clase I se encuentran en casi todas las células de mamífero y presentan antígenos sintetizados dentro de ellas (por ejemplo, fragmentos de proteínas virales). Esta respuesta no es de nuestro interés, considerando que las amibas son parásitos extracelulares, por lo cual, nos enfocaremos a las glicoproteínas del CPH clase II. Es imprescindible que los macrófagos fagociten al microorganismo y digieran sus proteínas, reduciéndolas a péptidos de 13-18 aminoácidos en los fagolisosomas, y que estos antígenos sean presentados en su superficie ensamblados en las proteínas del CPH clase II (Roit *et al.*, 2001).

Una vez que ocurre la presentación del antígeno, los linfocitos T CD4⁺ (subpoblación T_H1) activados sintetizan IFN- γ . Esta citocina activa a otros macrófagos para que sean capaces de reconocer y destruir a los microorganismos que presenten en su superficie los mismos determinantes antigénicos que desencadenaron la respuesta inmune celular.

Algunas citocinas como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la interleucina-4 (IL-4) y el factor estimulador de colonias de macrófagos-1 (M-CSF-1) incrementan la actividad amebicida de monocitos, macrófagos peritoneales y células de Kupffer murinas (Sánchez *et al.*, 2002; Ghadirian *et al.*, 1992,1993; Denis and Chadee, 1989).

Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad amebicida de macrófagos activados es dependiente de la producción de IRN (Lin and Chadee, 1992; Lin *et al.*, 1993, 1994; Seguin *et al.*, 1997), principalmente de la síntesis inducible de NO (Lin and Chadee, 1992) siendo la actividad de la iNOS importante en el control de la amibiasis hepática en ratones inmunocompetentes (Seydel *et al.*, 2000).

Por otro lado, la interacción de los monocitos con la lectina de *E. histolytica* induce la síntesis de TNF- α . Esta citocina y el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) estimulan la producción de NO por macrófagos murinos (Lin *et al.*, 1994, 1995; Seguin *et al.*, 1995, 1997).

5.6.3 Características del Oxído Nítrico (NO)

El NO es un importante regulador y mediador de procesos incluyendo la relajación del músculo liso, neurotransmisión y citotoxicidad mediada por macrófagos contra microorganismos y células tumorales (Weinberg *et al.*, 1995; Hibbs, 1991; Moncada and Higgs, 1993; Nathan, 1992).

Es el resultado de la combinación enzimática de un único átomo de nitrógeno con un único átomo de oxígeno. Al presentar un electrón no apareado, el NO busca otra molécula que acepte o comparta su electrón (Feldman *et al.*, 1993; Nathan, 1992).

Las moléculas blanco incluyen oxígeno, cuya interacción con el NO resulta en la oxidación en nitrito y nitrato (NO₂⁻ y NO₃⁻), inactivando la molécula; grupos tiol, metales y otros radicales a través de los cuales el NO ejerce sus efectos. En un ambiente abundante en estos blancos, el NO tendrá una vida media corta, típicamente en el rango de segundos.

La combinación de NO con formas superóxido forma peroxinitratos, dióxido de nitrógeno o radicales hidroxilos, con la capacidad de dañar células blanco.

Cuando el NO interacciona con grupos prostéticos hemo o grupos tiol en las proteínas, puede formar complejos que activan o inactivan enzimas blanco, regulando de esta forma, funciones celulares (ver tabla I).

La inhibición enzimática parece ser el mecanismo por el cual el NO generado por la estimulación con citocinas puede inhibir el crecimiento de células blanco, microorganismos invasores y células tumorales .

TABLA I

Enzimas diana del Óxido Nítrico

Enzima	Función
Activación	
Guanilato ciclasa soluble	Formación de GMPc
Ciclooxigenasa	Síntesis de eicosanoides
Inactivación	
Aconitasa	Ciclo TCA
NADH: ubiquinona oxidoreductasa	Transferencia de electrones
Succinato: ubiquinona oxidoreductasa	Transferencia de electrones
Ribonucleótido reductasa	Síntesis de DNA
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Glicólisis
Citocromo P450	Gluconeogénesis
NADPH oxidasa	Biotransformación
Cliclooxigenasa	Generación de radicales O ₂
	Síntesis de eicosanoides
*Ciclooxigenasa inducible aparenta activarse por la estimulación con pequeñas concentraciones de NO mientras que altas concentraciones pueden inhibirla.	

A pesar de que las acciones del NO son en su mayoría locales, éste tiene la capacidad de difundirse rápidamente atravesando las membranas celulares para llegar a los sitios blanco gracias a su naturaleza lipofílica, esto a diferencia de muchos productos secretados que usan transportadores de membrana específicos.

El NO libre se consume rápidamente y es inactivado ya sea al ser liberado de la célula, dentro de la célula o en la circulación donde interacciona con el grupo hemo de la hemoglobina (Timothy, 1995).

Existe evidencia de que el NO, a través de su reactividad puede formar aductos con albúmina y glutatión (Keaney *et al.*, 1993; Gaston *et al.*, 1993) en la forma de nitrosotioles, los cuales pueden circular o difundirse a sitios remotos y liberar el NO bioactivo.

5.6.4 Síntesis de NO

L-arginina, el único sustrato para la síntesis de NO en sistemas biológicos, contiene dos nitrógenos guanidinos químicamente equivalentes que aceptan fácilmente electrones en el proceso de oxidación donde el fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (NADPH) actúa como fuente de electrones, el oxígeno se deriva del oxígeno molecular, N^G-hidroxi-L-arginina es formada como un intermediario de vida corta, y se forma citrulina como coproducto (Feldman *et al.*, 1993; Nathan, 1992).

Esta reacción se lleva a cabo por una de las 3 isoformas de la sintasa del óxido nítrico (NOS). Todas usan mononucleótido y dinucleótido de flavin-adenina (FMN y FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) y hemo-protoporfirina IX como cofactores. Las flavinas almacenan y transfieren electrones al grupo hemo, el cual lleva a cabo el proceso de oxidación (Abu-Soud and Stuehr, 1993). BH₄ parece ser importante en el mantenimiento de la enzima en su forma activa (dimérica) (Baek *et al.*, 1993).

Sin embargo, cada isoforma exhibe patrones de expresión y mecanismos de regulación únicos, y por tanto, patrones especializados de síntesis de NO. Dos de las enzimas siempre están presentes, se activan por estímulos que incrementan los niveles de calcio intracelular y se denominan constitutivas (cNOS).

La tercera isoforma, la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), se expresa únicamente después de la estimulación de las células con citocinas, microorganismos o productos microbianos. La cantidad de NO generado por una célula que expresa iNOS esta limitada solamente por la cantidad de enzima (dependiente del nivel de expresión génica) y la disponibilidad de sustrato y cofactores.

Basándonos en estas características de regulación, pequeñas cantidades de NO liberado intermitentemente por cNOS participan en procesos fisiológicos de señalización celular mientras que grandes cantidades de NO generado por iNOS, ejercen funciones asociadas con infección o inflamación (p.j., actividad antimicrobiana).

5.6.5 Expresión de la enzima sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) en infección e inflamación

Macrófagos, condrocitos, neutrófilos, hepatocitos, e islotes pancreáticos tienen la capacidad de expresar iNOS. La mayoría de estas células presentan un fuerte sinergismo ejercido por agentes simultáneos pero las señales efectivas pueden variar de célula a célula. P.j., los macrófagos murinos responden a la combinación de lipopolisacáridos (LPS) e IFN- γ (Stuehr and Marletta, 1985) mientras que los hepatocitos requieren la exposición simultánea a IL-1, TNF- α , IFN- γ y LPS para exhibir altos niveles de expresión (Curran *et al.*, 1990; Geller *et al.*, 1993).

El modelo celular ideal para la expresión de iNOS son los macrófagos murinos (Hibbs *et al.*, 1987; Stuehr and Marletta, 1985). En monocitos y macrófagos humanos, se detectan bajos niveles de síntesis de NO después de la exposición prolongada a citocinas o LPS (Denis, 1991). Una explicación es que la síntesis de NO en células estimuladas con citocinas es dependiente de la BH₄ recién sintetizada (Gross and Levi, 1992).

El entendimiento de estas relaciones es importante debido a que manipular los niveles de cofactor puede proveer los medios para incrementar o disminuir terapéuticamente los niveles de actividad de la iNOS.

La expresión de iNOS es parte de la respuesta adaptativa durante la inflamación o infección, en la cual, la estimulación de la enzima por el microorganismo o por citocinas producidas contribuye a la eliminación del agente patógeno.

Parásitos intracelulares como Malaria (Nussler *et al.*, 1991), Leishmania (Green *et al.*, 1990), algunos virus, hongos y bacterias son susceptibles de ser eliminados o inhibidos por NO (Karupiah *et al.*, 1993; Granger *et al.*, 1988; Malawista *et al.*, 1992).

Bajo ciertas circunstancias, el NO inducido puede ser benéfico mientras que en otras situaciones puede ser dañino dependiendo del grado y duración de la expresión así como del ambiente en el cual se expresa la enzima. P.j., la expresión crónica de iNOS en un ambiente donde las moléculas que potencian la toxicidad del NO se encuentran presentes o donde los mecanismos de protección naturales se encuentran ausentes podría permitir que esta molécula presente efectos adversos.

5.6.6 Problemática en la producción de NO por macrófagos humanos

Los macrófagos murinos expresan altos niveles de RNAm de iNOS y la proteína después de la estimulación con LPS y citocinas incluyendo IFN- γ , IL-1 y TNF- α , convirtiendo la L-arginina en L-citrulina y NO.

A pesar de que los hepatocitos humanos, los condrocitos, la línea celular DLD-1 proveniente de cáncer de colón humano y macrófagos peritoneales pueden expresar RNAm de iNOS y producir altos niveles de NO (Charles *et al.*, 1993; Nussler *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1993, Geller *et al.*, 1993), existen varios reportes señalando que los fagocitos mononucleares humanos expresan el RNAm de iNOS y la proteína pero la actividad de la enzima y los niveles basales de producción de NO $_2^-$ y NO $_3^-$ no son modificados por el tratamiento con LPS \pm IFN. Los fagocitos mononucleares humanos no producen BH $_4$, sin embargo, incrementar los niveles de este cofactor, no los capacita para producir altos niveles de NO (Weinberg *et al.*, 1995).

5.6.7 Regulación del transporte de L-arginina en macrófagos murinos y humanos

Los sistemas de toma de L-arginina desempeñan un papel importante en la regulación de la síntesis de NO. En el sistema murino, la toma de L-arginina del ambiente extracelular hacia el ambiente intracelular de macrófagos es llevado a cabo por dos permeasas diferentes, MCAT-1 (constitutiva) y MCAT-2B (inducible) [Baydoun *et al.*, 1993; Wileman *et al.*, 1995]. El tratamiento de las células J774.1 con IFN- γ y LPS resulta en un incremento significativo en la expresión de MCAT-2B, en el transporte de L-arginina y en la producción de NO (Venketaraman *et al.*, 2003; Peteroy *et al.*, 2001).

En macrófagos humanos, las permeasas homologas son HCAT-1 y HCAT-2B (Baydoun *et al.*, 1993; Wileman *et al.*, 1995). Sin embargo, se desconocen los agentes y citocinas que activan a esta última.

La ausencia o bajos niveles de NO están asociados con un transporte disminuido de L-arginina en macrófagos derivados de monocitos humanos de sangre periférica y en macrófagos peritoneales de la línea C57BL6 (Venketaraman *et al.*, 2003).

Experimentos realizados con macrófagos humanos cultivados *in vitro* sugieren que estos exhiben un transporte diferente de L-arginina en respuesta a estímulos comparados con macrófagos murinos.

5.7 Desarrollo de Vacunas contra *E. histolytica*

A diferencia de otros protozoarios parásitos (por ej. *Plasmodium sp*) que tienen un ciclo de vida complejo con numerosos estadios, y antígenos estadio-específicos, *E. histolytica* existe solo como trofozoíto o quiste. Considerando lo anterior y el hecho de que los humanos son el único reservorio conocido del parásito, una vacuna efectiva podría teóricamente erradicar al protozoario (Stanley Jr., 1996).

Existen hallazgos que sugieren que la inmunidad protectora frente a la amibiasis se desarrolla después de la infección. Los individuos con un episodio previo de enfermedad intestinal son menos propensos a desarrollar una infección recurrente (Sepúlveda and Martínez-Palomo, 1982).

Estudios en modelos animales proveen la evidencia más fuerte de la existencia de inmunidad protectora completa o parcial frente al AHA como resultado de la infección inducida experimentalmente o de la vacunación con lisados crudos de *E. histolytica* (Sharma *et al.*, 1985; Jiménez-Cardoso *et al.*, 1989; Krupp, 1974; Jain *et al.*, 1980; Sepulveda , 1980; Merovitch and Chadee, 1988). Algunos antígenos son:

- Proteína de *E. histolytica* rica en Serina (SREHP). Derivada de la cepa HM1:IMSS, altamente inmunogénica (Stanley *et al.*, 1990, 1991). Localizada en la membrana celular de los trofozoítos. Previene la formación del AHA en gerbos (Zhang *et al.*, 1994). Los monos inmunizados con este antígeno desarrollan altos títulos de anticuerpos (Stanley *et al.*, 1995).
- Lectina de unión a galactosa/GalNAc. Complejo molecular formado por una subunidad pesada transmembranal altamente inmunogénica de 170 kDa unida por enlaces disulfuro a una subunidad ligera de 35 kDa y asociada no covalentemente con una subunidad intermedia de 150 kD. Estimula una respuesta celular tipo T_H1 y la producción de anticuerpos séricos en un modelo murino (Guacher *et al.*, 2002). La inmunización oral de gerbos con un vector atenuado de *Salmonella* expresando una porción de la lectina de unión a galactosa/GalNAc demostró protección frente al AHA (Mann BJ *et al.*, 1997). La liberación oral de la cadena pesada (170CR2) utilizando una proteína externa de *Yersinia sp* estimulo la producción de anticuerpos y demostró ser protectora frente al AHA en gerbos (Lotter *et al.*, 2003).
- Proteína rica en Cisteína. Uno de los principales epítomos de la lectina de unión a galactosa/GalNAc que induce inmunidad humoral (IgA e IgG) en pacientes asintomáticos y con AHA (Abd-Alla *et al.*, 2003).
- Vacunas multicomponentes
Vacunas conteniendo antígenos recombinantes de *E. histolytica* que pueden brindar mayor protección pero que pueden resultar en una toxicidad incrementada y en una eficacia reducida a través de interferencia antigénica (Stanley, 1996).

Sin embargo, es importante señalar que la protección contra el AHA podría no correlacionarse con la protección frente a colonización intestinal y que estos antígenos no necesariamente son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en seres humanos porque eso depende de la unión de péptidos a las moléculas del CPH. Esto despertó el interés de nuestro grupo de investigación en aislar y secuenciar antígenos de *E. histolytica* que sean capaces de despertar una respuesta celular protectora en células inmunes humanas.

6. MÉTODOS

6.1 Origen de los reactivos

Enseguida se enlistan los fabricantes y los productos grado reactivo, que se utilizaron en el presente trabajo:

Aldrich Chemical, Co. Inc. (Milwaukee, WI, USA), ácido trifluoroacético (TFA).
Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V. (Cuautitlán Itzcalli, Estado de México, México), peptona de caseína, jeringas y agujas desechables.
Calbiochem (San Diego, California, USA), Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) y N^G- monometil-L-arginina (L-NMMA).
Caledon Laboratories Ltd (Georgetown, Ontario, CANADA), ácido bórico y metanol.
Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA), Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay kit.
Cheminova de México (Coyoacán, México D.F., México), pentobarbital sódico.
CTR (Monterrey, Nuevo León, México), ácido orto-fosfórico.
Difco Labs (Detroit, Michigan, USA), peptona de caseína.
GIBCO (Grand Island, NY, USA), solución salina balanceada de Hanks (HBSS).
Infra S.A. de C.V. (Monterrey, N.L., México), nitrógeno, grado NF UN 1066.
J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA), alcohol iso-propílico y etanol.
Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA), kit de ELISA para la determinación del Factor de necrosis tumoral alfa humano (TNF- α).
Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V. (Monterrey, N. L., México), hidróxido de sodio (NaOH).
Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA), tripsina modificada grado secuenciación.
De Representaciones e Investigaciones Médicas (Guadalajara, Jal., México), bencilpenicilina sódica cristalina y sulfato de estreptomina.
Sigma Chem Co (St Louis, Missouri, USA), ácido ascórbico, ácido fórmico, agarosa, seroalbúmina bovina (SAB) fracción V, azul tripano, bicarbonato de amonio, carbonato de amonio, cloroformo, dextrosa, dietilpirocarbonato, ditiotreititol, mezcla estándar de péptidos para HPLC, iodoacetamida, glucofibrinopéptido-B (GFP), hidróxido de sodio, L-Cisteína, Leucina-encefalina, lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8, medio RPMI-1640, N-(1-naftil-etilendiamina), nitrito de sodio, reactivo de Folin Ciocalteu's, suero fetal bovino (SFB), sulfanilamida, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, tripsina, Tris-HCl y Trizma base.
Spectrum Quality Products Inc (Gardenia, CA, New Brunswick, NJ, USA), fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, cloruro de sodio y cloruro de benzalconio.
TEDIA Company Inc (Fairfield, OH, USA), alcohol iso-propílico y acetonitrilo.
United States Biological (Swampscott, MA, USA), EDTA disódica.

6.2 Material biológico

6.2.1 Sangre

Se obtuvo sangre periférica de 3 voluntarios sanos, adultos, sin antecedentes de absceso hepático amibiano. La sangre se utilizó para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y para realizar cultivos de células totales de sangre periférica. Las muestras de cada donador se manejaron con independencia en cada experimento.

6.2.2 Línea celular THP-1 y U937

Para estandarizar la producción de NO *in vitro* por fagocitos humanos (FgH), se utilizaron monocitos humanos de las líneas THP-1 (American Type Culture Collection [ATCC], TIB-202) y U937 (ATCC, CRL-1593.2). La primera fue aislada de un paciente con leucemia monocítica aguda (Pérez *et al.*, 1995); y la segunda de un paciente con linfoma histiocítico (Martín *et al.*, 2000). Estas células se mantuvieron en cultivo continuo en medio RPMI-1640 suplementado con el 10% de SFB. Ambas líneas celulares, cuando se han diferenciado muestran un fenotipo similar al de los macrófagos, expresan el marcador de superficie CD14 y son capaces de fagocitar microorganismos (Gross *et al.*, 2004). Ambas líneas nos fueron gentilmente donadas por el Dr. Vianney Ortiz del CINVESTAV, México.

6.2.3 Línea celular J774

Se utilizó la línea de macrófagos murinos J774 (ATCC, TIB-67), aislada de un ratón BALB/cN con sarcoma de células reticulares. Se caracteriza por exhibir adherencia, citología y propiedades fagocíticas de macrófagos (Ralph *et al.*, 1975). Esta línea celular se utilizó como referencia durante la estandarización del modelo para la producción de NO por FgH. Esto porque los macrófagos murinos son excelentes productores de NO *in vitro*, a diferencia de los macrófagos humanos (Weinberg *et al.*, 1995).

6.2.4 Cepa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS

Se utilizó la cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS, la cual se ha mantenido en condiciones axénicas en medio PEHPS (Said Fernández *et al.*, 1998) mediante cultivo continuo por 23 años en el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN).

6.2.5 Animales de Laboratorio

Se utilizaron hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*), sexo masculino, 100 g de peso corporal, de dos a dos años y medio de edad, provenientes del bioterio del CIBIN. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 18 a 20 °C, en jaulas de acrílico con cubierta de rejilla metálica y se alimentaron con nutricubos para roedores (Lab. Diet. 50001, USA) y agua *ad libitum*.

6.3 Estandarización del modelo para la producción de NO en fagocitos humanos (FgH)

6.3.1 Preparación del medio de cultivo RPMI-1640

Se disolvió un frasco de medio en polvo RPMI-1640 suplementado con L-glutamina (2mM) en 900 mL de agua desionizada y se añadieron 2g de NaHCO₃. Se ajustó el pH a 7.1 con HCl 1N o con NaOH 1N y se aforó a 1000 mL. Se descartó una alícuota de 100 mL. Se añadieron 100 mL de SFB (Sigma Chem Co) previamente descomplementado por calentamiento a 56 °C por 30 min. Se esterilizó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa HAWP (poros de 0.22 µm). Se incubó el medio una semana a 37 °C, para probar su esterilidad y se almacenó a 4 °C.

6.3.2 Composición y preparación de Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS)

NaCl 6.5 g ; K₂HPO₄ 2.8 g ; KH₂PO₄ 0.4 g

Se disolvieron los componentes en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 mL con agua bidestilada. Se ajustó la osmolaridad a 300 mOsm/kg con NaCl. Esta solución se distribuyó en alícuotas de 10 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg². Los tubos conteniendo la solución se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

6.3.3 Preparación de Lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8

El vial conteniendo originalmente 1 mg de LPS se reconstituyó con 1 mL de medio RPMI (libre de SFB) en condiciones de esterilidad y se mezcló por inversión. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -20 °C. A partir de esta solución, se tomaron los volúmenes necesarios para preparar las diferentes concentraciones de LPS.

6.3.4 Preparación de forbol-12-miristato acetato (PMA)

El vial conteniendo originalmente 25 mg de PMA se reconstituyó con 1 mL de DMSO estéril y se mezcló por inversión hasta que el contenido se disolvió por completo. Para obtener una solución de 10 μM de PMA, se realizaron dos diluciones seriadas 1:2 de la siguiente manera. Se tomó una alícuota de 500 μL y se depositó en un tubo Eppendorf (Westbury, NY, USA) estéril de 2 mL de capacidad, conteniendo 500 μL de DMSO y se mezcló por inversión. Se repitió este procedimiento una vez más y se descartaron 500 μL . Se realizaron alícuotas y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3.5 Preparación de N^{G} - monometil-L-arginina (L-NMMA)

El vial conteniendo originalmente 25 mg de L-NMMA se reconstituyó con 25 mL de PBS y se mezcló por inversión hasta que el contenido se disolvió por completo. De esta forma, se obtuvo una concentración de 1 mg/mL. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. A su vez, se tomó una alícuota de 100 μL y se disolvió en 9,900 μL de PBS y se mezcló por inversión. De esta solución se tomaron 1000 μL y se disolvieron en 9,000 μL de PBS para obtener una concentración final de 1 ng/ μL . Se realizaron alícuotas y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3.6 Aislamiento, cultivo y estimulación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP)

Se colectó la sangre venosa del voluntario sano, utilizando tubos Vacutainer estériles conteniendo heparina sódica como anticoagulante. Se agregaron 3 mL de sangre a cada tubo cónico de polipropileno conteniendo 3 mL de Ficoll-Hypaque estéril, procurando no mezclar las fases. Se centrifugó a 1,500 rpm por 15 min y se recuperó la capa de CMSP (monocitos y linfocitos). Se distribuyeron las CMSP en tubos cónicos de polipropileno estériles, se realizaron 3 lavados con PBS estéril centrifugando a 1,500 rpm por 10 min y descartando los sobrenadantes. Posteriormente, se resuspendieron las CMSP en un volumen suficiente de medio RPMI (adicionado con SFB) para ajustar su concentración a 1×10^6 CMSP/mL. En condiciones de asepsia, se inoculó 1 mL de la suspensión celular a cada pozo. En este caso utilizamos placas estériles de 24 pozos, las cuales, se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al 5% durante 12 h.

El grupo control consistió en cultivos de CMSP sin tratar. Se incluyó sistemáticamente una serie de pozos conformados únicamente por monocitos, para lo cual, se descartó el medio sobrenadante (células no adherentes [linfocitos]) y se realizaron 2 lavados con PBS y se añadió medio RPMI fresco (adicionado con el 10% de SFB). La producción basal de nitritos (NO_2^-) de este grupo se comparó con el grupo control.

Los grupos experimentales, recibieron 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, respectivamente. Se incubaron bajo las mismas condiciones y se transfirieron los sobrenadantes a tubos eppendorf estériles a las 72 y 96 h, respectivamente. Las muestras se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.3.7 Cultivo y estimulación de monocitos humanos THP-1 y U937

Las líneas celulares en suspensión, THP-1 y U937, se cultivaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% en frascos de cultivo de 175 mm conteniendo medio RPMI adicionado con el 10% de SFB. Al ser confluentes las células, el contenido de los frascos se transfirió a tubos cónicos de polipropileno estériles de 50 mL de capacidad, se centrifugaron a 600 g durante 10 min y se descartaron los sobrenadantes. Se realizó un lavado con HBSS (libre de rojo de fenol) centrifugando en las mismas condiciones y se descartó nuevamente el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspendió en medio RPMI fresco y se transfirió a frascos de cultivo estériles siendo incubados en las condiciones antes mencionadas.

Diseño experimental No.1 con células THP-1

Para los experimentos, se ajustó la densidad celular a 8.5×10^5 células/mL y en condiciones de asepsia, se inocularon 2 mL de esta suspensión celular a cada pozo y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% por 12 h. Se realizaron 2 lavados con HBSS y se adicionó medio RPMI fresco (adicionado con el 10% de SFB).

El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales recibieron 10 nM de PMA solo y en combinación con 2.5 µg/mL de LPS (concentración final). Se incubaron bajo las mismas condiciones y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf estériles a las 24 y 48 h, respectivamente. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Diseño experimental No. 2 con células THP-1

En condiciones de asepsia, se ajustó la densidad celular a 1×10^6 células/pozo y el volumen final se llevó a 2 mL con medio RPMI (adicionado con el 10% de SFB) y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% por 12 h. Se realizaron 2 lavados con medio HBSS y se adicionó medio RPMI fresco (adicionado con el 10% de SFB).

El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales recibieron 5 µg/mL de LPS solo o en combinación con 10 nM de PMA. Se incubaron bajo las mismas condiciones y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf estériles a las 24, 48 y 72 h respectivamente. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Diseño experimental No. 3 con células THP-1.

En condiciones de asepsia, se ajustó la densidad celular a 1×10^6 células/pozo y el volumen final se llevó a 2 mL con medio RPMI (adicionado con el 10% de SFB). El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales se dividieron en 4 grupos. El primer grupo recibió a las 0.0 h de incubación, 10 nM de PMA; el segundo grupo, 20 nM de PMA; el tercer grupo, 10 nM de PMA a las 0.0 h y 2.5 µg/mL de LPS a las 24 h; y el cuarto grupo, 20 nM de PMA a las 0.0 h y 5 µg/mL de LPS a las 24 h. Se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf estériles a las 24, 48 y 72 h respectivamente. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Diseño experimental No. 4 con células U937

En condiciones de asepsia, se ajustó la densidad celular a 1×10^6 células/pozo y el volumen final se llevó a 2 mL con medio RPMI (adicionado con el 10% de SFB). El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales se dividieron en 2 grupos. El primer grupo se pre-estimuló a las 0.0 h de incubación con 10 nM de PMA y a las 24 h se lavaron las células con HBSS, se añadió medio RPMI fresco y se estimularon con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. El segundo grupo se pre-estimuló a las 0.0 h con 10 nM de PMA, a las 24 h se realizó el lavado, se añadió medio RPMI fresco (adicionado con el 10% de SFB) y se estimuló con una combinación de 10 nM de PMA y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf estériles a las 0, 24, 48 y 72 h respectivamente. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.3.8 Cultivo y estimulación de la línea celular de macrófagos murinos J774

En condiciones de asepsia, se ajustó la densidad celular a 1×10^6 células/pozo y el volumen final se llevó a 2 mL con medio RPMI (adicionado con el 10% de SFB). Se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% por 24 h. Se realizaron 2 lavados con medio HBSS y se adicionó medio RPMI fresco (adicionado con el 10% de SFB). El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales recibieron 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% y se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf estériles a las 0, 24, 48 y 72 h respectivamente. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.3.9 Cultivo y estimulación de células totales de sangre periférica

Se colectó la sangre de un adulto sano utilizando tubos para colección de sangre total con EDTA como anticoagulante. Se colocaron 3 mL de sangre total en tubos estériles de poliestireno (12 x 75 mm) para cultivo celular (BD Falcon, Franklin Lakes, NY, USA).

El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales recibieron concentraciones variables de LPS (2, 25, 50, 100, 150 y 200 ng/mL) para realizar una curva dosis respuesta y determinar la concentración ideal de LPS. Así mismo, se incluyeron otros 2 grupos que recibieron 300 y 350 ng/mL de L-NMMA, los cuales se incubaron por 3 h y posteriormente se estimularon con 100 ng/mL de LPS. Los tubos conteniendo las muestras de sangre, se colocaron en un rotor y se incubaron durante 5 h a temperatura ambiente, a excepción de los grupos que recibieron L-NMMA, estos se incubaron por 2 h. El plasma se colectó por centrifugación de la sangre a 2,500 rpm durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.3.10 Determinación de Nitritos por la técnica de Griess (Stuerh, 1989)

Stock de Nitritos.

Se disolvieron 0.069 g de nitrito de sodio en 100 mL de agua bidestilada. Así se obtuvo una concentración 10 mM. La solución se almacenó a 4 °C protegida de la luz. Se tomó una alícuota de 100 μ L y se llevó a 1,000 μ L con medio RPMI-1640 (libre de SFB) para obtener una solución 1 mM. A partir de esta solución se realizó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62.5 μ M, 31.25 μ M, 15.62 μ M, 7.81 μ M, 3.9 μ M, 1.95 μ M, 0.975 μ M, 0.487 μ M, 0.243 μ M y 0.121 μ M.

Solución A.

Se disolvió 0.1 g de naftiletildiamida en 100 mL de agua bidestilada. La solución se almacenó en frascos de borosilicato de 120 mL de capacidad, color ámbar, con tapón de rosca y protegidas de la luz a una temperatura de 0-4 °C.

Solución B.

Se disolvió 1 g de sulfanilamida en 100 mL de ácido ortofosfórico al 5% (v/v). La solución se almacenó en frascos de borosilicato de 120 mL de capacidad, color ámbar, con tapón de rosca y protegidas de la luz a una temperatura de refrigeración de 0-4 °C.

Reactivo de Griess

Se preparó mezclando una parte de la solución A con una parte de B, inmediatamente antes de usarse.

Procedimiento.

Se añadieron 100 μ L de RPMI-1640 libre de SFB a los pozos blanco. En el resto de los pozos se colocaron por duplicado 100 μ L de los estándares y de los sobrenadantes provenientes del cultivo celular (CMSP, THP-1, U937 y J774, según los experimentos). Se añadieron 100 μ L del reactivo de Griess. Se permitió el desarrollo de color por 10 min a temperatura ambiente. Se determinó la A_{540} y por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la cual se determinó la producción de NO_2^- . Se graficó el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado.

6.3.11 Determinación de la producción total de NO por la técnica de Griess

Los productos finales del NO *in vivo* son nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). La proporción relativa de NO_2^- y NO_3^- es variable y no puede predecirse con certidud. Por tanto, el mejor índice de la producción total de NO es la suma de nitritos y nitratos.

El primer paso consiste en la conversión de NO_3^- a NO_2^- utilizando la enzima denominada nitrato reductasa. El segundo paso consiste en la adición de los reactivos de Griess, los cuáles convierten los NO_2^- en un compuesto azo de color morado. La medida fotométrica de la absorbancia debida a este cromóforo determina la concentración de NO_2^- (ver figura 4).

Esta técnica se utilizó para determinar la producción total de NO en muestras de plasma, como resultado de la estimulación de células totales de sangre periférica.

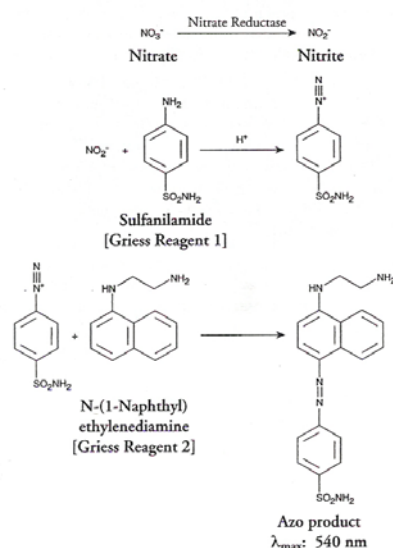


Figura 4 . Reacción de Griess.

Buffer de ensayo

El contenido del vial se diluyó a 100 mL con agua Mili-Q y se almacenó a 4 °C.

Nitrato Reductasa

El contenido del vial se reconstituyó con 1.2 mL de buffer de ensayo manteniéndose en hielo durante su uso. La solución se almacenó a -20 °C.

Cofactores

El contenido del vial se reconstituyó con 1.2 mL de buffer de ensayo manteniéndose en hielo durante su uso. La solución se almacenó a -20 °C.

Estándar de Nitrato.

El contenido del vial se reconstituyó con 1.0 mL de buffer de ensayo, se agitó y se almacenó a 4 °C . Una vez reconstituido, el vial se diluyó antes de realizar el ensayo.

Reactivos de Griess A y B.

No requieren preparación previa. Se almacenaron a 4 °C.

Preparación de las muestras.

El plasma se ultrafiltró a través de filtros con corte a 10 o 30 kDa para reducir el ruido de fondo debido a la presencia de hemoglobina. Los filtros (Amicon o Millipore) se pre-enjuagaron con agua Mili-Q estéril antes de ultrafiltrar las muestras de plasma.

Preparación de la curva estándar de nitrato de sodio.

En un tubo Eppendorf estéril se colocaron 0.9 mL de buffer de ensayo y se añadieron 0.1 mL del estándar de nitrato y se agitó en vortex para obtener una concentración de 200 μM . A partir de esta solución se realizó una curva de calibración (apéndice, tabla II).

Procedimiento.

Se añadieron 200 μL de buffer de ensayo a los pozos blanco. No se añadieron otros reactivos a estos pozos. Se colocaron 80 μL de plasma y se adicionaron 10 μL de la mezcla de cofactores y 10 μL de la mezcla de nitrato reductasa en cada pozo. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente por 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 50 μL del reactivo de Griess A y 50 μL del reactivo de Griess B a cada uno de los pozos. Se permitió el desarrollo de color por 10 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la A_{540} y por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la cual se determinó la producción total de NO como la suma de NO_3^- y NO_2^- . Se graficó el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado.

6.4 Obtención del antígeno total amibiano (ATA) y determinación de su efecto sobre la producción total de NO en FgH

6.4.1 Obtención del Suero bovino para cultivo de amibas

El suero se obtuvo a partir de sangre colectada en el rastro de la ciudad de Monterrey, la cual al coagularse permitió la separación del mismo. Una vez separado el suero, se esterilizó por filtración a través de una serie de filtros HAWP Millipore de 10 a 0.22 μm . El suero se distribuyó en volúmenes de 40 a 100 mL en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Previo a su uso se descomplementó por calentamiento a $56\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min y se probó su esterilidad, sembrando 1 mL de cada botella de suero a probar en 10 mL de medio RPMI-1640 y se incubó por una semana a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

6.4.2 Preparación del medio PEHPS

Extracto de Hígado y Páncreas (EHP) 250 mL; peptona de caseína 10 g; D-glucosa 6 g; L-cisteína 1.0 g; ácido ascórbico 0.20 g; KH_2PO_4 0.60 g; K_2HPO_4 1 g.

Se disolvieron todos los componentes en 650 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 mL con agua bidestilada. Se realizaron alícuotas de 5 mL en tubos de 13×100 mm de capacidad y se esterizaron en autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$ y 15 lb/plg². Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso y se añadieron 0.5 mL de suero por cada 5 mL de medio de cultivo, 48 horas antes de realizar la resiembra

6.4.3 Cultivos amibianos axénicos

La cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* se mantuvo en cultivo en medio PEHPS (Said-Fernández y col, 1988) incubándola a 36.5 °C (Incubadora National Heinicke Co. OR, E.U.A.). Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mayor densidad de trofozoítos y el mejor aspecto de éstos se colocó en agua-hielo por 10 min y el número de amibas se determinó utilizando un hemocitómetro, y se inocularon a cada tubo con medio PEHPS. Los cultivos se resembraron cada 72 h, en fase logarítmica de crecimiento.

6.4.4 Curva de Crecimiento de *E. histolytica*

Se cultivaron 5×10^3 trofozoítos/mL trofozoítos en tubos de ensayo de 13×100 mm conteniendo 5.5 mL de medio PEHPS bajo condiciones axénicas. Se realizó el conteo por triplicado en cámaras de Neubauer a las 24, 48, 72, 96 y 120 h.

Se graficó el logaritmo natural del número de trofozoítos/mL contra el tiempo en horas y se determinó la ecuación de la recta por regresión lineal. Se determinó el tiempo de duplicación y de generación, respectivamente (López-Revilla and Rodríguez-Báez, 1981).

6.4.5 Inducción de Absceso Hepático Amibiano (AHA) en hámsters

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal, con una solución de 0.065 g/ml de pentobarbital sódico de uso veterinario con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre No.23 y se indujo una anestesia profunda en 5 minutos con una dosis de 6.5 mg/100g de peso corporal. Después se procedió a rasurar el vientre del hámster y desinfectar el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25%. Se realizó una incisión de 1.5 cm en la línea media, abajo del esternón con tijeras y se expuso el hígado. Se inocularon 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS de cultivos suplementados con suero, suspendidos en 0.1 ml de medio PEHP basal, directamente en el lóbulo derecho del hígado, con una aguja calibre No. 23. Después de la inoculación, se limpió bien la herida producida por la aguja con un hisopo estéril de algodón, empapado con solución salina isotónica, y se suturó la incisión, mediante surgete continuo, abarcando los planos muscular y seroso de la piel, con seda estéril del 00.

6.4.6 Obtención de amibas virulentas a partir de un AHA

Siete días después de haber inducido la formación de AHA, se realizó una laparotomía exploratoria a cada animal. A partir de las lesiones se recuperaron los trofozoítos virulentos realizando cortes del tejido afectado de 0.5 cm y se sembraron en medio basal PEHP y se añadieron 0.01 mL de la mezcla de trabajo de penicilina-estreptomicina (1,000X). Se incubaron a 36.5 °C y se sembraron cada 72 h. El tratamiento con antibióticos se llevó a cabo hasta que en 2 resiembras sucesivas no hubiera contaminación detectable en ausencia del antibiótico. Estas amibas se re-inocularon dos veces más en pases por hígado de hámster, verificando que las amibas produjeran en cada pase AHA grado V (Cruz-Vega *et al.*, 1997) para que estuvieran expresando su mayor virulencia. Estas amibas se utilizaron para el resto de los experimentos.

6.4.7 Cultivos masivos de amibas virulentas

6.4.7.1 Cultivo en Spinners.

Los cultivos masivos se obtuvieron utilizando frascos para cultivo en suspensión (spinners) de 900 mL de capacidad. El inóculo fue de 5×10^3 trofozoítos/mL en 600 mL de medio basal (PEHP) con 60 mL de suero bovino (PEHPS). Los cultivos se mantuvieron estáticos por 48 h y por 24 h en agitación a 36.5 °C (Said-Fernández and Mata-Cárdenas, 1992). Posteriormente, el contenido se transfirió a tubos cónicos estériles de borosilicato de 125 mL de capacidad, se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min a 4 °C y se aspiraron los sobrenadantes. El sedimento se resuspendió con PBS estéril y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se realizaron 2 lavados más con PBS.

6.4.7.2 Cultivo en tubo.

Se inocularon 100 tubos de 13 × 100 mm conteniendo cada uno 5 mL de medio PEHPS con 5,000 trofozoítos/mL. Se incubaron a 36 °C por 48 h. Se enfriaron en agua-hielo durante 10 min. Se agitaron suavemente para desprender la pastilla de amibas, se centrifugaron a 1500 rpm por 15 min a 4 °C y se aspiraron los sobrenadantes. El sedimento se resuspendió con PBS estéril, se transfirió a un tubo cónico estéril de borosilicato de 125 mL y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se realizaron 2 lavados más con PBS.

6.4.8 Obtención del ATA

Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo cónico estéril de borosilicato de 125 mL de capacidad, con tapón de rosca, conteniendo 8 perlas de vidrio estériles. Se realizó una extracción con 20 volúmenes de una mezcla de cloroformo-metanol. El contenido del tubo se expuso a un flujo continuo de nitrógeno estéril hasta evaporar completamente los disolventes. Se resuspendió el extracto amibiano en Tris-HCl

0.08M pH 8, se agitó en vortex y se sonicó por 30 min a temperatura de laboratorio. El ATA se vació a un tubo eppendorff estéril, se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min y se repartió en alícuotas de 0.5 mL bajo condiciones de esterilidad. Se añadió 1 mL de TRIS-HCl a una de las alícuotas, se agregaron 15 μ L NaOH 10 N, se agitó vigorosamente y se calentó a fuego directo durante 3 seg por tres ocasiones con intervalos de 10 seg entre cada evento. Se ajustó el pH a 7.4 agregando HCl 10N. Se repartió nuevamente en alícuotas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.4.9 Cuantificación de Proteínas

La concentración de las proteínas en los extractos amibianos fue determinada por el método de Lowry.

Solución A. Se disolvieron 2 g de carbonato de sodio en 100 mL de NaOH 0.1 N. La solución se almacenó en una botella de borosilicato de color ámbar con tapón de rosca a temperatura ambiente.

Solución B1. Se disolvieron 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua desionizada.

Solución B2. Se disolvió 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua desionizada.

Solución C. Se mezclaron 49 ml de solución A, 0.5 ml de solución B1 y 0.5 ml de solución B2. (Inmediatamente antes de usarse).

Solución D. Se diluyeron 3 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252) con 3 ml de HCl 1 N. (Inmediatamente antes de usarse).

Solución estándar. Se disolvieron 10 mg de SAB (fracción V) en 10 mL de agua desionizada con agitación lenta. Se almacenó a -20°C en un tubo de polipropileno con capacidad para 15 mL, hasta su uso.

Se colocaron por triplicado diluciones seriadas de SAB que conformaron la curva estándar (apéndice, tabla III) y las muestras amibianas en tubos de ensayo de 13×100 mm. Se aforó con agua bidestilada a 200 μ L. Se añadió a cada muestra 1 mL de la solución C y se mezcló todo. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μ L la solución D, se agitó y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 750 nm. Se graficó la A_{750} en función de la concentración de SAB (expresada como μg de proteína/mL). Se calculó por interpolación, mediante regresión lineal, la concentración de proteínas contenida en las preparaciones del ATA.

6.4.10 Determinación de la producción total de NO en FgH estimulados con ATA

Se utilizó el modelo descrito en el punto 6.3.9. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. El testigo positivo recibió 100 ng/mL de LPS. Los grupos experimentales recibieron 100 y 500 ng/mL de ATA. Se determinó la producción total de NO mediante la técnica descrita en el punto 6.3.11.

6.5 Obtención de fracciones de antígeno digerido con tripsina (ADT) mediante HPLC

6.5.1 Solución de Tripsina

Se pesaron 10 mg de Tripsina, se disolvieron con 10 mL de agua Mili-Q para obtener una solución de 1mg/mL y se esterilizó por filtración (0.22 μ M). Se realizaron alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5.2 Solución de carbonato de amonio 0.4 M

Se pesaron 0.4564 g de carbonato de amonio y se disolvieron en 10 mL de agua de 10 mOsm/Kg, obtenida en un equipo Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) y se esterilizó por filtración (0.22 μ M). Se realizaron alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5.3 Digestión

Se ajustó la concentración del ATA a 2 mg de proteínas/mL con Tris-HCl (0.08M, pH 8.0) y se mezcló con un volumen de carbonato de amonio 0.4 M y un volumen apropiado de la solución de tripsina para ajustar ésta a una concentración de 1:50 (p/p con respecto a la concentración de proteínas amibianas). La preparación se incubó por 12 h a temperatura ambiente. El producto de la digestión (ADT) se ultrafiltró utilizando cartuchos de corte a 5,000 kDa (Millipore) y se centrifugó a temperatura ambiente a 14,000 rpm por 30 min y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

6.5.4 Fraccionamiento del ADT mediante HPLC

El ADT se separó mediante HPLC, con cromatógrafo (Waters Corporation) equipado con un controlador modelo 600, un inyector 717 plus, un detector de fotodiodos 996 y un degasificador de solventes Degassit. Los registros se analizaron

en un procesador Dell Optiplex GX1 equipado con el software para cromatogramas Waters Millennium 32. Se aplicó la técnica de fase reversa, utilizando una columna modelo Symetry C18 (Waters, Milford, MA, USA) (3.9× 150 mm y PAA 5µm) y un guarda columna modelo Sentry 18(Waters).

Solución de Acetonitrilo al 100%

El acetonitrilo al 100% se filtró a vacío empleando filtros HA (poros 0.45 µM). Se colocó en el reservorio A. Esto constituyó la fase orgánica.

Solución de Ácido Trifluoroacético (TFA) al 1%

Se adicionaron 10 mL de TFA a 900 mL de Agua Mili-Q y se aforaron a 1000 mL empleando un matraz volumétrico. Dicha solución se filtró a vacío empleando filtros HA (poros 0.45 µM). Se colocó en el reservorio B. Esto constituyó la fase acuosa.

Procedimiento:

Como fase móvil se utilizó un gradiente de concentración preparado a partir de ácido TFA y acetonitrilo, ambos grado HPLC (apéndice, tabla IV).

El flujo se mantuvo constante a 1mL/min, se colectaron las fracciones y se evaporaron en el concentrador de fracciones. Cada fracción se reconstituyó y esterilizó con una mezcla de DMSO-RPMI (libre de SFB) relación 50/50 (v/v) (Molina *et al.*, 2006). Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Las fracciones se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.6 Identificación de fracciones con mayor habilidad para inducir la producción de NO en FgH

Se utilizó el modelo descrito en el punto 6.3.9. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. El testigo positivo recibió 100 ng/mL de LPS. Los grupos experimentales recibieron 100 y 500 ng/mL de las fracciones obtenidas mediante HPLC. Se determinó la producción total de NO mediante la técnica descrita en el punto 6.3.11.

6.7 Determinación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) en plasma

Se utilizó el modelo descrito en el punto 6.3.9. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. El testigo positivo recibió 100 ng/mL de LPS. Los grupos experimentales recibieron 500 ng/mL de ATA y de las fracciones obtenidas mediante HPLC. Se realizó la determinación de TNF-α mediante la técnica de ELISA (Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzima).

Buffer de lavado

En un recipiente estéril se añadieron 50 mL del buffer de lavado 30X y se diluyeron a un volumen final de 1.5 L con agua Mili-Q estéril. El buffer reconstituido se mezcló y se almacenó en refrigeración (2-8 °C).

Estándares

Los estándares se prepararon justo antes de usarse. El estándar conteniendo 2,000 pg/mL se reconstituyó con 1,240 μ L de agua Milli-Q estéril. Se mezcló invirtiendo suavemente el vial hasta que el contenido se disolvió por completo.

Se prepararon diluciones seriadas 1:2 para generar la curva estándar de la siguiente manera. Se colocaron 200 μ L del diluyente para las muestras en 7 tubos. Se colocaron 200 μ L del estándar reconstituído en el primer tubo (1,000 pg/mL) y se mezclaron bien. Se tomaron 200 μ L de esta dilución y se colocaron en el siguiente tubo (500 pg/mL) y se mezcló todo. Se realizaron 5 diluciones seriadas (usando 200 μ L) para completar la curva. Los puntos de la curva fueron 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 0 pg/mL. Este último fue el blanco constituido por 200 μ L de diluyente para muestras.

Procedimiento

Se adicionaron 50 μ L de diluyente para muestra a cada pozo. Se adicionaron 50 μ L de los estándares o muestras (por duplicado) a cada pozo. Se cubrió la placa con una cubierta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, se removió la cubierta y se lavó la placa 3 veces con el buffer de lavado. Se añadieron 100 μ L del anticuerpo biotilado a cada pozo. Se cubrió la placa con una cubierta adhesiva y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Se removió la cubierta y se lavó la placa 3 veces. Se añadieron 100 μ L de estreptavidina-HRP a cada pozo. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se removió la cubierta y se lavó la placa 3 veces. Se añadieron 100 μ L de TMB sustrato a cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min (sin cubrir la placa). Se detuvo la reacción adicionando 100 μ L de la solución STOP a cada pozo. Se midió la A_{450} . Se calculó por regresión lineal la concentración de TNF- α en cada pozo.

6.8 Secuenciación de los péptidos de interés mediante espectrometría de masas

6.8.1 Digestión del ATA para su posterior secuenciación

Bicarbonato de Amonio 100 mM.

Se pesaron 79.10 mg de NH_4HCO_3 y se disolvieron en 10 mL de agua Milli-Q.

Bicarbonato de amonio 50 mM.

Se realizó una dilución 1:2 a partir de la solución de NH_4HCO_3 100 mM utilizando agua Milli-Q.

Ditiotreitol (DTT) 200mM.

Se pesaron 30.84 mg de DTT y se disolvieron en 1 mL de NH_4HCO_3 100 mM.

Iodoacetamida 1 M.

Se pesaron 37 mg de Iodoacetamida y se disolvieron en 200 μ L de NH_4HCO_3 100 mM.

Tripsina.

100 μg de Tripsina (Gold Mass-Spec Grade, promega) se disolvieron con 100 μL de ácido acético 50 mM obteniendo una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se dividió en alícuotas y se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de la muestra.

La muestra conteniendo 2 mg de proteína se llevó a 100 μL con NH_4HCO_3 50 mM.

Reducción disulfuro.

Se añadieron 5 μL de DTT a los 100 μL de muestra. La muestra se calentó a ebullición por 10 minutos. Se agitó en vortex y se dió un spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 h.

Alquilación.

La muestra se alquiló añadiendo 4 μL de la solución de iodoacetamida. Se agitó en vortex y se dió un spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 h.

Neutralización.

Se neutralizó la idoacetamida remanente añadiendo 20 μL de DTT. Se agitó en vortex y se dió un spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 h.

Digestión.

La muestra se digirió utilizando una solución de tripsina manteniendo una relación 1:50 (p/p). Se agitó en vortex y se dió un spin. Se incubó 18 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$. La muestra se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

6.8.2 Solubilización de péptidos hidrofóbicos

Se colocó una alícuota de la muestra (ADT) en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se rotuló como péptidos hidrofílicos. La pastilla resultante se sometió a un lavado con agua Milli-Q y se resuspendió con 500 μL de Isopropanol al 70%. Se sonicó durante 10 min. Se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se rotuló como péptidos hidrofóbicos. Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Los sobrenadantes conteniendo los péptidos (tanto hidrofílicos como hidrofóbicos) se utilizaron para el resto de los experimentos.

6.8.3 Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó la técnica de HPLC acoplada a espectrometría de masas. Los datos se adquirieron con columna C_{18} ($2.1 \times 150\text{ mm}$ y PAA $3\mu\text{m}$), mediante fase reversa. La espectrometría de masas se realizó utilizando la interfase ESI en modo positivo, el equipo híbrido cuadrupolar-tiempo de vuelo (modelo QTOF-micro, Waters) acoplado al sistema de HPLC (Waters Alliance 2695), ambos

controlados por el software MassLynx (v4.0). La información fue procesada con el software ProteinLynx Global Server, version 2.2, el cual utiliza la base de datos Swissprot-MASCOT.

El método cromatográfico y de detección fueron optimizados utilizando albúmina sérica bovina y la mezcla estándar de péptidos. Los experimentos fueron realizados por triplicado bajo las siguientes condiciones.

Método cromatográfico.

Fase móvil acuosa (A2). Se preparó acetonitrilo al 1% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio A.

Fase móvil orgánica (B2). Se preparó acetonitrilo al 80% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio B.

La columna se mantuvo a una temperatura de 50 °C y la muestra a 4 °C. Como fase móvil se utilizó un gradiente de concentración preparado a partir de acetonitrilo, grado HPLC (apéndice, tabla V). El flujo se mantuvo constante a 0.2 mL/min y se utilizó un volumen de inyección de 15 µL.

Método de espectrometría de masas

Leucina encefalina.

Solución Stock. Para obtener una solución de 250 ng/µL, se disolvieron 25 mg en 100 mL 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

Solución Spec. Para obtener una solución de 2ng/µL se tomaron 800 µL del stock y se añadieron a 40 mL de MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

Glucofibrino-péptido (GFP)(C66H95N19O26 15569 Da).

Solución stock. Para obtener una solución de 32 pmol/µL, se añadieron 2000 µL al vial conteniendo originalmente 64 nmol. Se almacenó a -20°C.

Solución intermedia. Para obtener una solución de 1 pmol/µL, se tomaron 100 µL de la solución stock y se añadieron 3 100 µL de una mezcla de 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido acético. La solución se almacenó a -20°C.

Solución spec. Para obtener una solución de 100 fmol/µL, se tomaron 220 µL de la solución intermedia y se añadieron 2000 µL de una mezcla de 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido acético.

Condiciones de calibración

El espectrómetro de masas se calibró con la solución spec de leucina encefalina, con la cual se llevó a cabo el cálculo de los parámetros de resolución y el ajuste del valor del punto de calibración inicial (L_{teff}).

Para la calibración de un solo punto, se utilizó la solución spec del GFP. El ion doblemente cargado $[(M+2H)^{2+}]$ con valor de masa exacta de 785 Da se liberó a través del sprayer de referencia de la fuente NanoLockSpray.

Voltaje del capilar: 3500 V

Voltaje del cono de extracción: 2 V

Voltaje de extracción de la muestra: 35 V

Temperatura de desolvatación: 350 °C

Análisis de resultados.

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el Data Bank Search, el AutoMod-Query y el de *Novo-Query*.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización del modelo para la producción de NO en FgH

Como primer paso en la estandarización del modelo para la producción de NO por FgH se aislaron CMSP mediante separación por gradiente y se determinó la producción de nitritos de estos cultivos, bajo diferentes condiciones experimentales. La figura 5, muestra una curva estándar típica para la determinación de nitritos por la técnica de Griess.

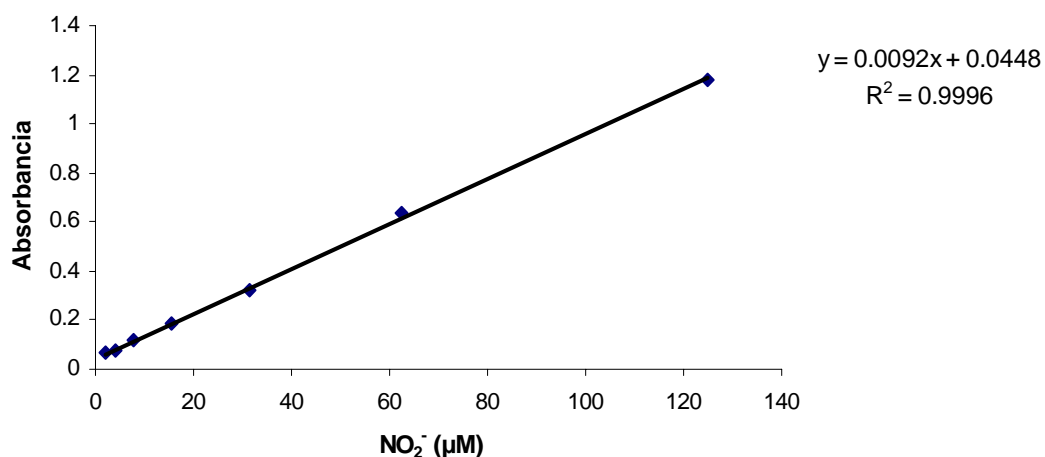


Figura 5. Curva Estándar para la determinación de nitritos. En una microplaca de 96 pozos se colocaron por duplicado 100 µL de las concentraciones variables del nitrito de sodio. Se añadieron 100 µL del reactivo de Griess. Se permitió el desarrollo de color por 10 min a temperatura ambiente. Se determinó la A_{540} y por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la cual se determinó la producción de NO_2^- .

En la figura 6, se observa un incremento en la producción basal de nitritos con respecto al tiempo de incubación, tanto en el cultivo de monocitos como en el co-cultivo de monocitos y linfocitos. Sin embargo, la producción de nitritos fue mayor en el co-cultivo ($P < 0.05$).

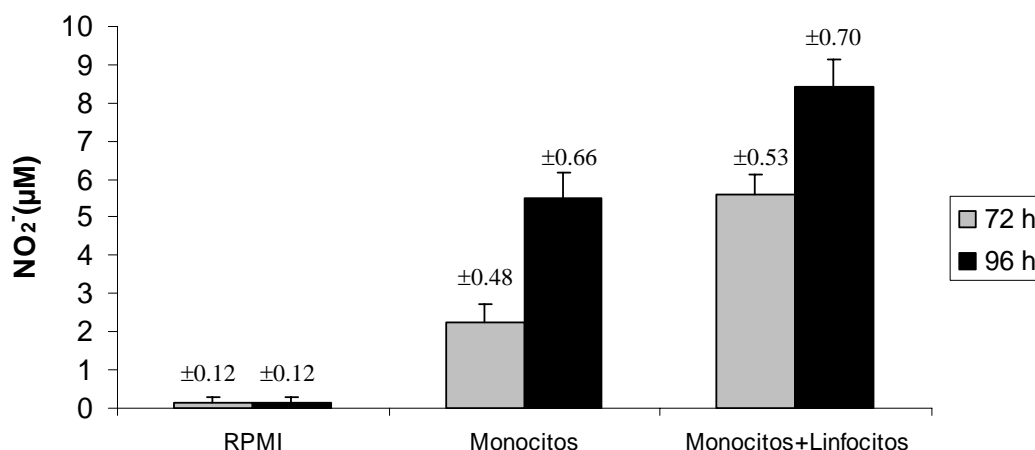


Figura 6. Producción basal de nitritos en monocitos y monocitos en co-cultivo con linfocitos. Se realizaron cultivos con 1×10^6 CMSP/mL y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 12 h. Se incluyó sistemáticamente un grupo de pozos conformados únicamente por monocitos, para lo cual se descartaron las células no adherentes. Además se incluyó otro grupo conformado por monocitos y linfocitos mezclados. Las preparaciones se incubaron, por separado, bajo las mismas condiciones y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. La producción basal de nitritos fue mayor en el grupo conformado por monocitos y linfocitos ($P < 0.05$).

En otro grupo de experimentos dirigidos a evaluar la producción de NO en CMSP estimuladas con 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, no se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos con respecto al control ($P > 0.05$). Esto a pesar del incremento en la producción de nitritos con respecto al tiempo de incubación. (figura 7).

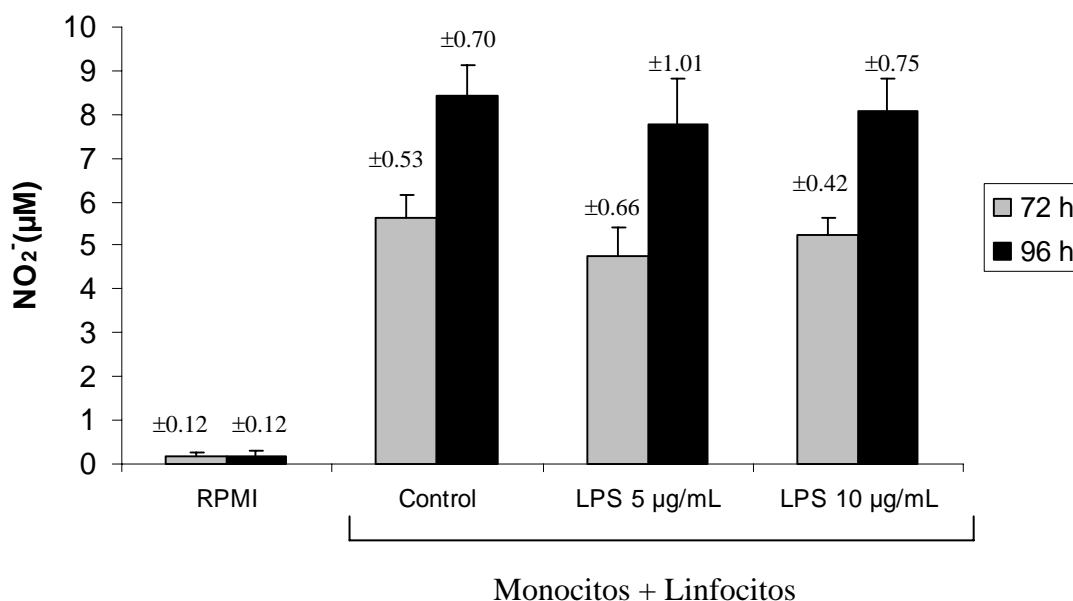


Figura 7. Producción de nitritos en CMSP. Se realizaron cultivos con 1×10^6 CMSP/mL y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% durante 12 h. Los títulos al pie de las barras indican el tratamiento recibido por cada cultivo. Las barras tituladas RPMI corresponden a medio sin células. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales, recibieron 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Las preparaciones se incubaron bajo las mismas condiciones y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. No se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos entre los cultivos no estimulados y los tratados con LPS ($P > 0.05$).

En otro ensayo evaluamos la producción de nitritos en la línea monocítica humana THP-1. Las células que recibieron el tratamiento con 10 nM de PMA mostraron adherencia y cambios en sus características morfológicas como incremento de tamaño y presencia de pseudópodos (Figura 8).

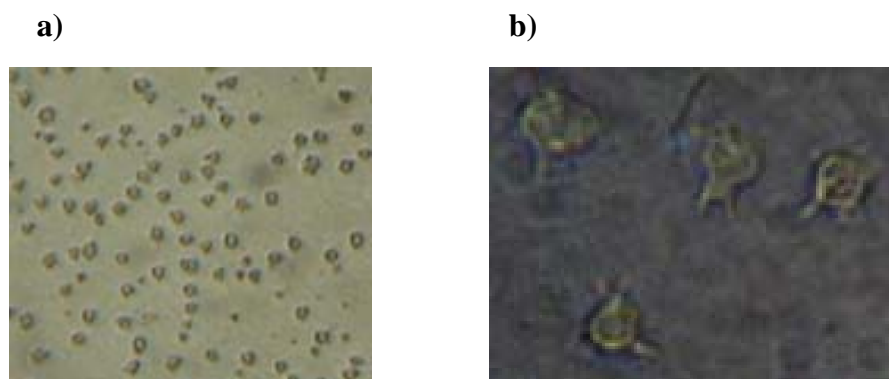


Figura 8. Morfología de células THP-1. a) Grupo control y b) Células estimuladas con 10 nM de PMA. Las células que recibieron el tratamiento con 10 nM de PMA mostraron cambios en sus características morfológicas como incremento de tamaño y presencia de seudópodos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos en células estimuladas únicamente con 10 nM de PMA ni en combinación con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS con respecto al control ($P > 0.05$ [figura 9]).

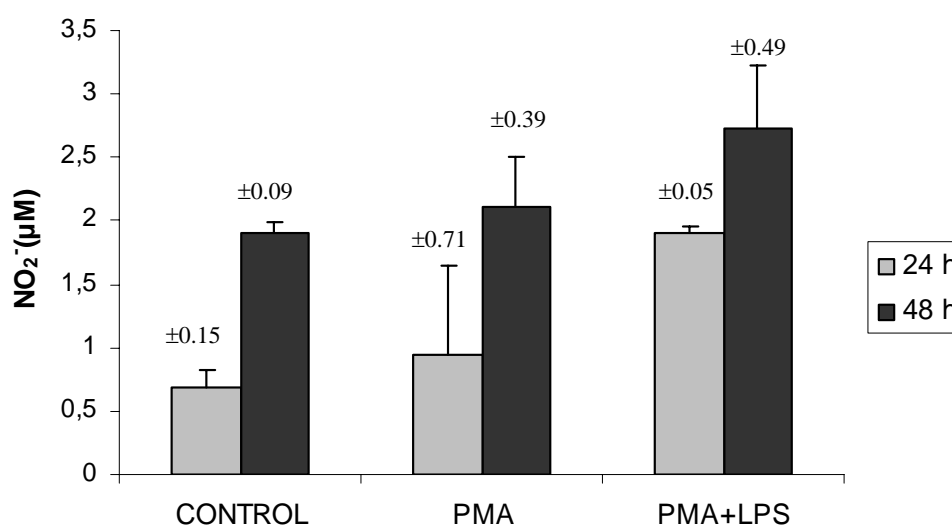


Figura 9. Producción de Nitritos en células THP-1 (diseño experimental No.1). Se realizaron cultivos con 2 mL de una suspensión de 8.5×10^5 células/mL y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% por 12 h. Se realizaron 2 lavados con medio HBSS y se adicionó medio RPMI fresco suplementado con 10% de SFB. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Las barras marcadas como (PMA) corresponden a los resultados obtenidos con cultivos tratados con 10 nM de PMA y las marcadas como (PMA+LPS) se incubaron en presencia de 10 nM de PMA y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Las preparaciones se incubaron, por separado, bajo las mismas condiciones y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. No se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos entre los controles y los cultivos tratados ($P > 0.05$).

En la figura 10, se observa que el tratamiento de las células THP-1 a una densidad de 1×10^6 células/pozo, adicionadas con $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS o con $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS y 10 nM de PMA, no produjo un incremento significativo de la producción de nitritos con respecto al control ($P > 0.05$).

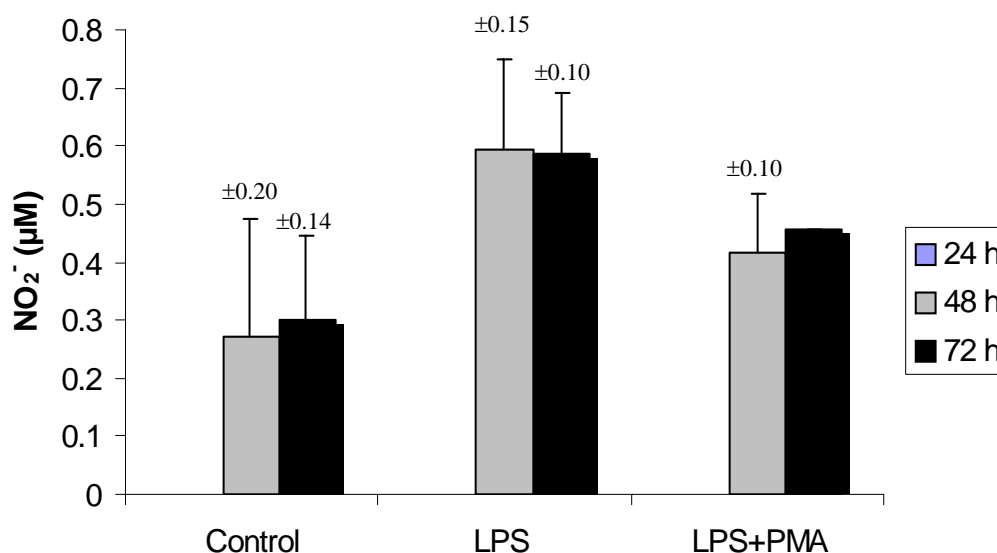


Figura 10. Producción de Nitritos en células THP-1 (diseño experimental No. 2). Se realizaron cultivos con 1×10^6 células/pozo y se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al 5% por 12 h. Los cultivos se lavaron 2 veces con medio HBSS y se les adicionó medio RPMI fresco suplementado con 10% de SFB. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Las barras marcadas como (LPS) corresponden a los cultivos tratados con $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS y las marcadas como (LPS+PMA) se trataron con $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS y 10 nM de PMA. Las preparaciones se incubaron, bajo las mismas condiciones y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. No se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos entre el control y los tratamientos ($P > 0.05$).

La figura 11 muestra que el tratamiento de las células THP-1 a una densidad de 1×10^6 células/pozo con 10 y 20 nM de PMA no favoreció significativamente el incremento de producción de nitritos con respecto al control. También puede apreciarse que el pre-tratamiento de las células con PMA y su posterior activación con LPS a 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tampoco indujo una mayor producción de nitritos con respecto al control.

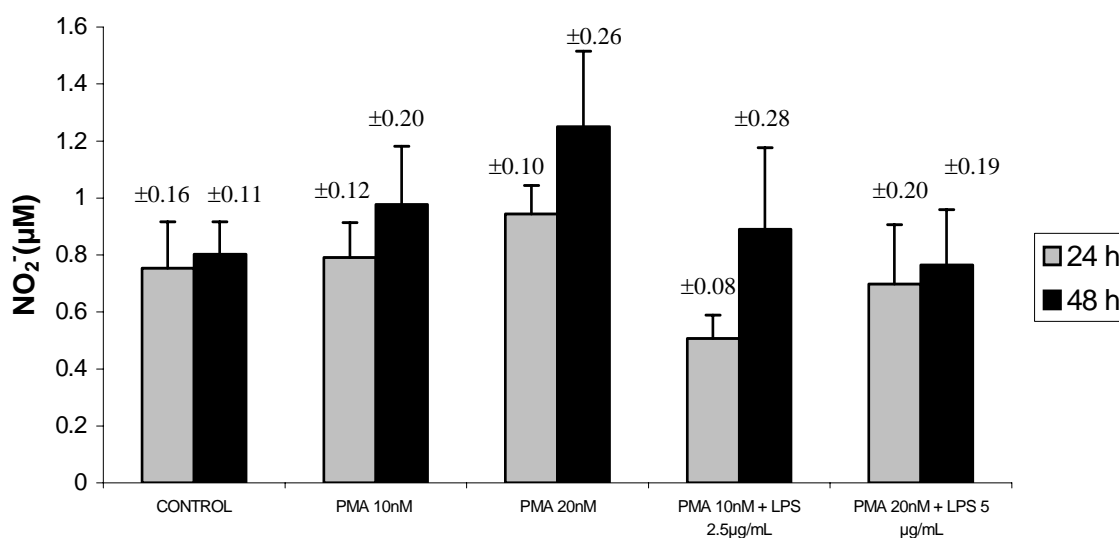


Figura 11. Producción de Nitritos en células THP-1 (diseño experimental No.3).

Se realizaron cultivos con 1×10^6 células/pozo y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% por 12 h. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales, se dividieron en 4 grupos. El primero recibió 10 nM de PMA, a las 0.0 h de incubación; el segundo grupo, 20 nM de PMA; el tercer grupo, 10 nM de PMA a las 0.0 h y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS a las 24 h; y el cuarto grupo, 20 nM de PMA a las 0 h y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS a las 24 h. Las preparaciones se incubaron y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. No se observaron diferencias significativas en la producción de nitritos entre el control y los tratamientos ($P > 0.05$).

La figura 12, muestra que el tratamiento de los macrófagos murinos con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS estimuló un incremento significativo en la producción de nitritos desde las 24 h. Estas diferencias, con respecto a los controles no tratados ($P < 0.05$), fueron evidentes también a las 48 y a las 72 h después de haber recibido el estímulo. Las diferencias entre la producción de nitritos en los grupos experimentales con respecto a sus respectivos controles fue considerablemente mayor (37 veces) a las 24 h que a las 48 ó 72 h (2.6 y 2.3 veces, respectivamente). Por el contrario, el pre-tratamiento de macrófagos humanos (derivados de la línea U937) con PMA y su posterior estímulo con LPS solo o en combinación con PMA no estimuló la producción de nitritos (figura 12).

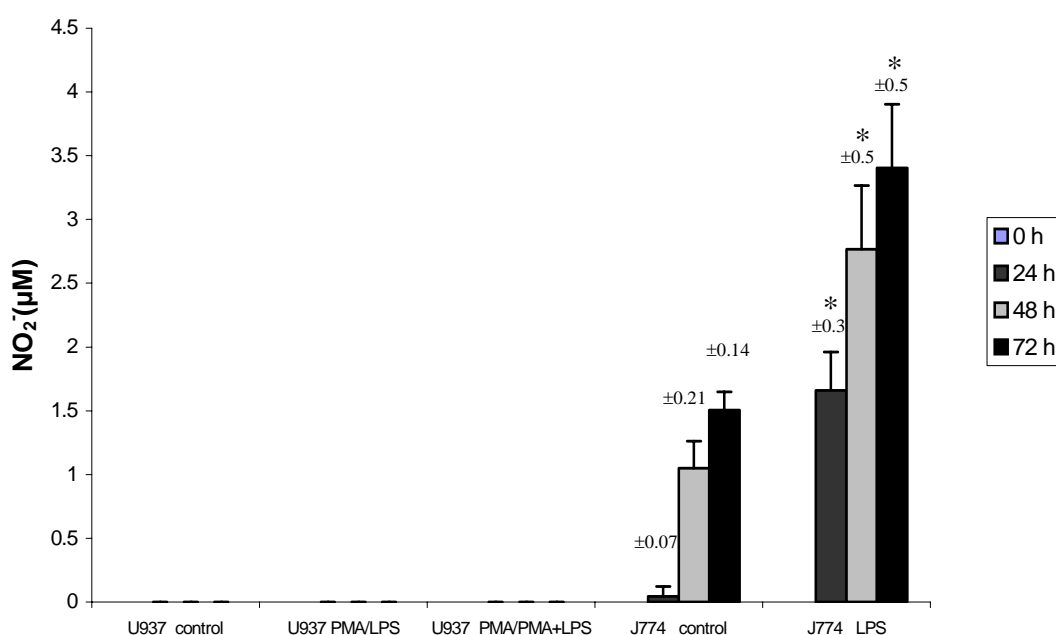


Figura 12. Producción de nitritos en células U937 y J774. Se realizaron cultivos con 1×10^6 células/pozo. Los controles consistieron en cultivos de células U937 ó J774 sin tratar. Los cultivos experimentales de la línea U937 pre-estimularon con 10nM de PMA y se dividieron en 2 grupos. El primero se estimuló con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS a las 24 h, y el segundo se trató con una combinación de 10 nM de PMA y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Los cultivos experimentales de las células J774 recibieron únicamente 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% y se determinó la producción de nitritos por el método de Griess. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y los cultivos tratados de la línea J774 ($P < 0.05$).

Se estimularon cultivos de células totales de sangre periférica humana con LPS. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a determinar la producción total de NO en el plasma mediante la conversión de NO_3^- a NO_2^- y la adición de los reactivos de Griess. La figura 13 muestra una curva estándar representativa para determinar la producción total de NO.

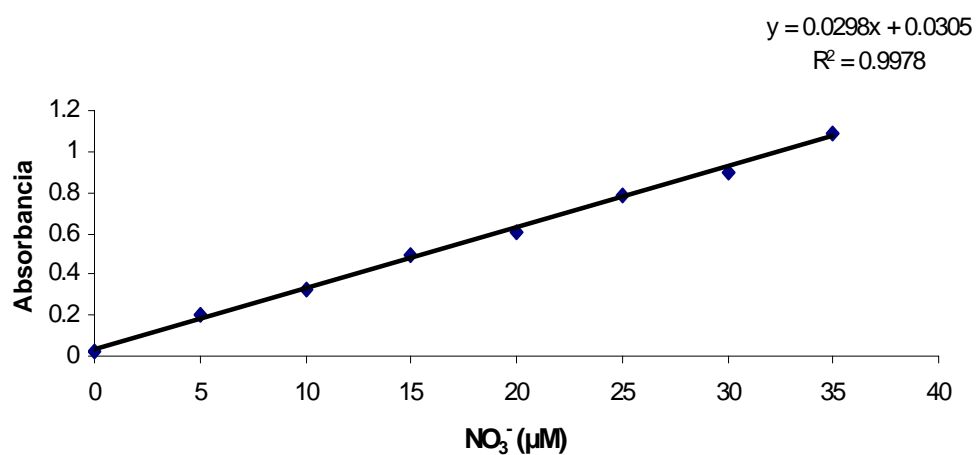


Figura 13. Curva estándar para determinar la producción total de NO. Se preparó la curva estándar a partir de una solución de nitrato de sodio. Se adicionaron 10 μL de la mezcla de cofactores y de la mezcla de nitrato reductasa en cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 4 h. Se añadieron 50 μL del reactivo de Griess A y 50 μL del reactivo de Griess B a cada uno de los pozos. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se determinó A_{540} y por regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta a partir de la cual se determinó la producción total de NO como la suma de NO_3^- y NO_2^- .

La concentración basal de NO en plasma (14.5 ± 0.05) no fue modificada por el tratamiento con LPS a una concentración de 2 ng/mL (15.6 ± 0.5). Sin embargo, la producción de NO se incrementó significativamente después de la estimulación con 25, 50, 100, 150 y 200 ng/mL de LPS ($P < 0.05$). Esta respuesta fue dosis-dependiente (Figura 14). Elegimos la concentración de 100 ng/mL, que estimuló una producción de NO 3.7 veces mayor que la de los controles no tratados para utilizarla en el resto de los experimentos.

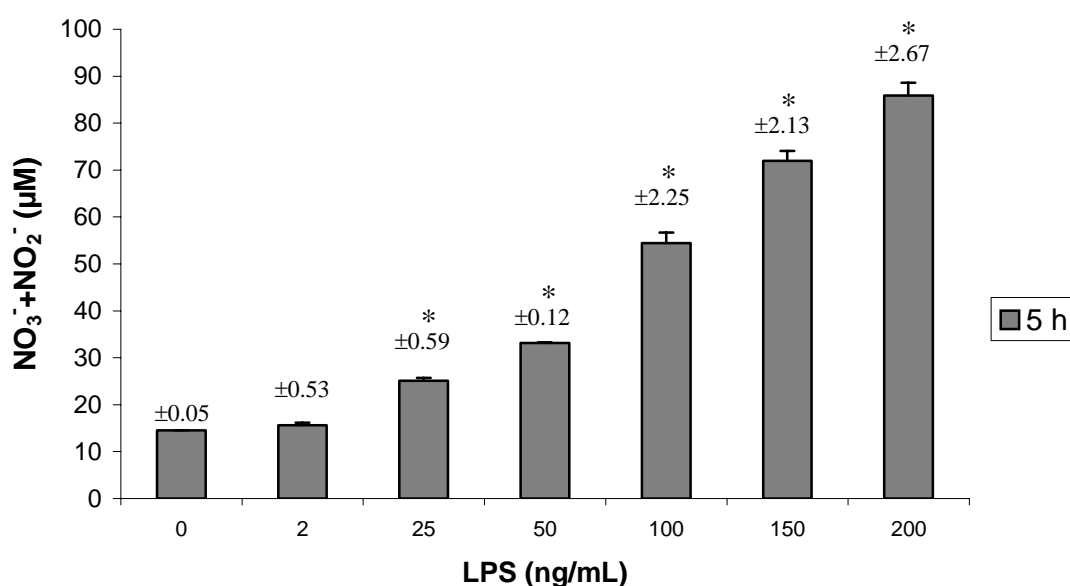


Figura 14. Producción total de NO en FgH estimulados con LPS . Se colocaron 3 mL de sangre total en tubos estériles. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los cultivos experimentales recibieron concentraciones variables de LPS (2, 25, 50, 100, 150 y 200 ng/mL). Las células se colocaron en un rotor y se incubaron durante 5 h a temperatura ambiente. El plasma se colectó por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la producción total de NO mediante la conversión de NO₃⁻ a NO₂⁻ y la adición de los reactivos de Griess. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y los cultivos tratados ($P < 0.05$).

Se adicionó L-NMMA, un inhibidor competitivo de NOS para evaluar su efecto en la producción de NO por fagocitos humanos. Las células estimuladas con 100 ng de LPS en la presencia de L-NMMA, mostraron una reducción significativa de la producción de NO ($P < 0.05$) en comparación con las células tratadas bajo las mismas condiciones experimentales, en ausencia del L-NMMA (figura 15). La concentración de 300 ng/mL de L-NMMA que inhibió la producción de NO 33% con respecto a los controles positivos, se utilizó en el resto de los experimentos.

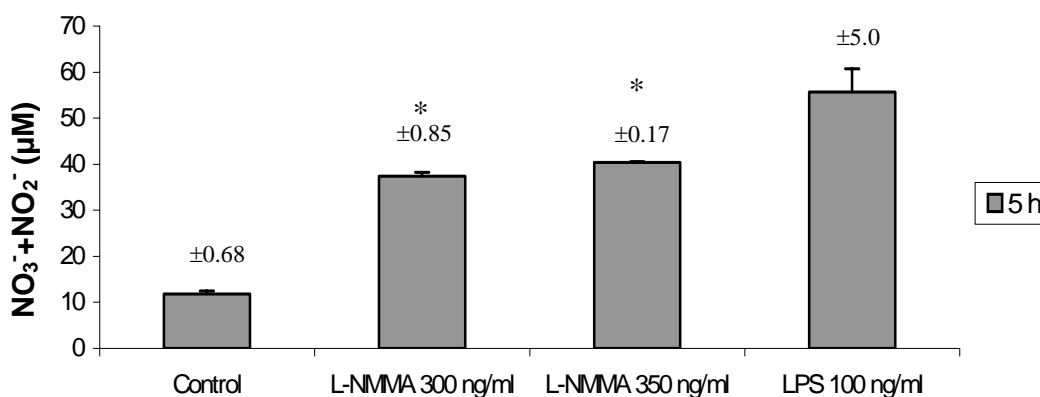


Figura 15. Inhibición de la producción de NO por L-NMMA. Se colocaron 3 mL de sangre total en tubos estériles. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los testigos positivos se estimularon con 100 ng/mL de LPS. Ambos grupos se incubaron a temperatura ambiente por 5 h. Los cultivos experimentales recibieron 300 y 350 ng/mL de L-NMMA, se incubaron por 3 horas, se estimularon con 100 ng/mL de LPS y se incubaron por 2 horas más. El plasma se colectó por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la producción total de NO mediante la conversión de NO_3^- a NO_2^- y la adición de los reactivos de Griess. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el control positivo y los cultivos tratados con L-NMMA.

7.2 Obtención del ATA y determinación de su efecto sobre la producción total de NO en FgH

Como segunda etapa de este estudio se obtuvo una curva de crecimiento de los cultivos amibianos, y con éstos datos se determinaron los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación y generación) de *E. histolytica*. Estos datos fueron necesarios para obtener cultivos amibianos en la fase exponencial de crecimiento, en la cual las amibas están en las mejores condiciones fisiológicas.

La figura 16 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*, en donde se observan las fases características del crecimiento amibiano: fase lag (latencia o adaptación), fase log (logarítmica o de crecimiento exponencial), la fase estacionaria, y la fase de muerte celular. La fase de crecimiento exponencial abarcó de las 45 a las 90 h de incubación (45 h).

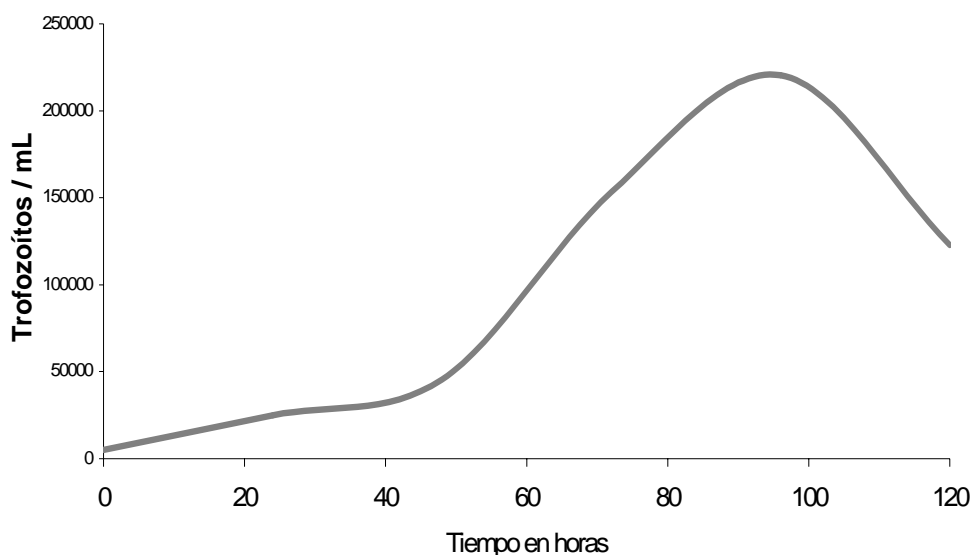


Figura 16. Curva típica de crecimiento de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Se inocularon 5×10^3 trofozoitos/mL en tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca, de 13×125 mm conteniendo 5.5 mL de medio PEHPS bajo condiciones axénicas. Los tubos se incubaron a 36.5°C por varios tiempos. Se realizó el conteo por triplicado en cámaras de Neubauer a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Se observan las fases del crecimiento amibiano características: lag (adaptación [0-45 h], log (logarítmica o de crecimiento exponencial [45 a 90 h]), estacionaria (90 a 100 h), y la fase de muerte celular a las 100 h de incubación.

La figura 17 muestra la gráfica del logaritmo natural del número de trofozoítos/mL contra el tiempo de incubación en horas. Se determinó la ecuación de la recta por regresión lineal para calcular los tiempos de duplicación y generación, los cuales fueron de 21.45 h y 30.95 h respectivamente. Se definió el inóculo y los días de cultivo necesarios para obtener cultivos creciendo en fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.

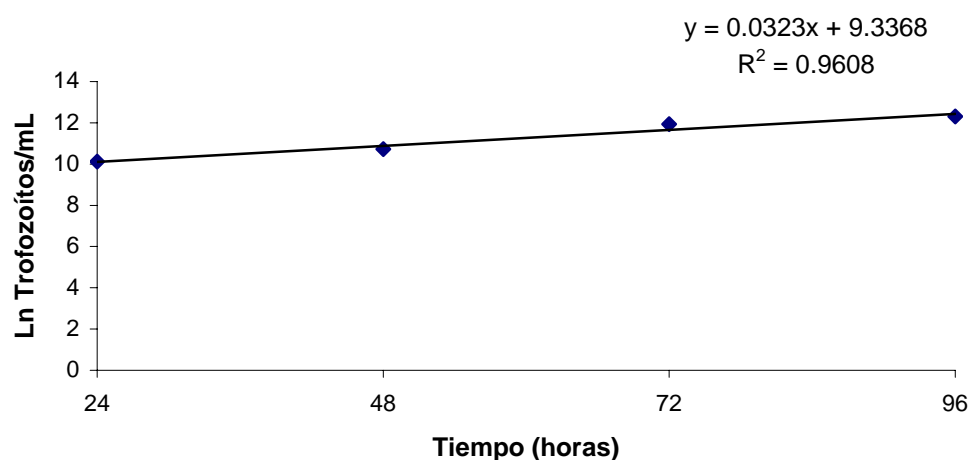


Figura 17. Logaritmo natural del número de trofozoítos/mL contra tiempo de incubación. En tubos de 13×125 mm con tapón de rosca, con 5.5 mL de medio PEHPS se inocularon 5×10^3 trofozoítos/mL y se incubaron a 36.5 °C, bajo condiciones axénicas. Los trofozoítos se contaron a diferentes tiempos de incubación (a las 24, 48, 72, 96 y 120 h) con una cámara de Neubauer y se graficó el ln natural del número de trofozoítos/mL contra el tiempo de incubación expresado. Se determinó la ecuación de la recta por regresión lineal y se calcularon los tiempos de generación y de duplicación.

En la figura 18, se observa un AHA obtenido después de inocular 1×10^6 trofozoítos en el lóbulo ventral del hígado de hámsteres Sirios Dorados. Se observa un área bien delimitada donde el parénquima del hígado fue remplazado por material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa.

Los trofozoítos virulentos se recuperaron a partir de las lesiones y se re-inocularon dos veces más en pases por hígado de hámster, verificando que las amibas produjeran en cada pase AHA grado V (Cruz-Vega *et al.*, 1997) para que estuvieran expresando su mayor virulencia. Estas amibas se utilizaron para la obtención del ATA.

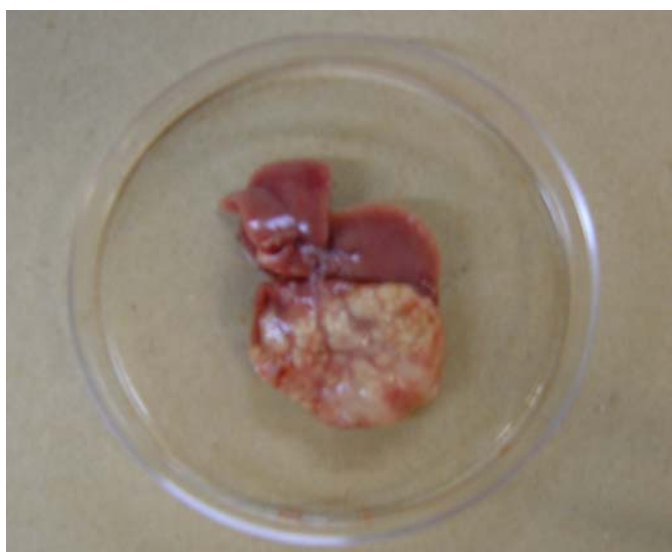


Figura 18. Obtención de amibas virulentas a partir de un AHA. Se inocularon 1×10^6 trofozoítos de la cepa HM1:IMSS en el lóbulo ventral del hígado de hámsteres Sirios Dorados (*Mesocricetus auratus*). Siete días después de la inoculación, se observaron los AHA, ocupando la mayor parte del hígado (lesiones grado V).

La figura 19, muestra la curva de calibración empleada para determinar la concentración de proteínas totales de extractos de trofozoítos de *E. histolytica*. Se graficó la A_{750} en función de la concentración de SAB y se obtuvo la ecuación de la recta y el valor de R cuadrada.

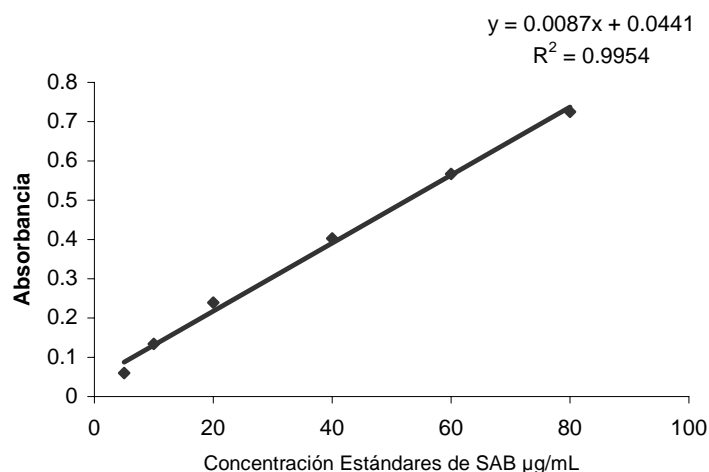


Figura 19. Curva Estándar de Seroalbúmina Bovina. Se preparó una curva estándar a partir de una solución de trabajo de 1 mg de SAB/mL. Las mediciones se hicieron por triplicado y se graficó la $A_{750\text{ nm}}$ en función de la concentración de SAB.

Con la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración, se calculó por interpolación, mediante regresión lineal, la cantidad de proteínas contenidas en las preparaciones del ATA. En la figura 20, se observa la concentración de proteína total obtenida en frascos *Spinner* y en tubos de cultivo. Se obtuvo la mayor producción de biomasa, y por tanto, de proteínas, mediante el método de cultivo en tubos.

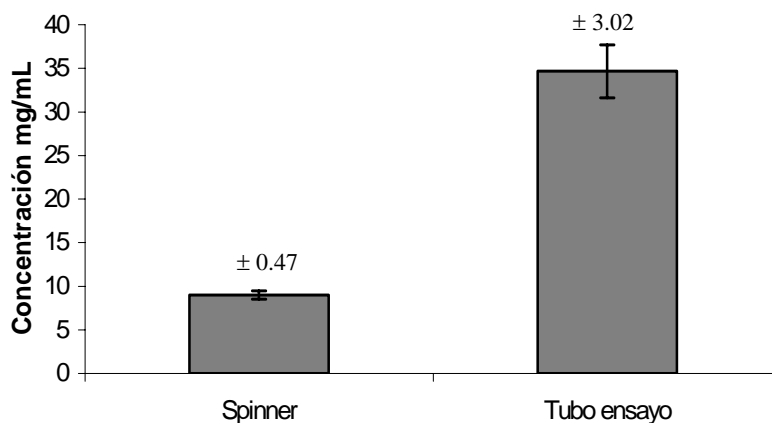


Figura 20. Determinación de la Concentración de Proteínas. Se prepararon volúmenes variables de muestras de ATA, obtenidas de cultivos en frascos *spinner* de 650 mL de capacidad y en tubos de cultivo de vidrio de 16 × 125 mm con tapón de rosca. Se calculó por interpolación, mediante regresión lineal la cantidad de proteínas contenidas en las preparaciones de ATA.

Para analizar el efecto del ATA en la estimulación de la producción de NO por fagocitos humanos, se llevaron a cabo experimentos probando una dosis de 100 y 500 ng/mL de ATA. En la figura 21, se muestra que el tratamiento de FgH con ATA incrementó significativamente la producción de NO ($P < 0.05$). A una concentración de 100 ng/mL, el ATA indujo una producción de NO 9.5 veces mayor que la producción basal, en los testigos no tratados, 1.3 veces mayor que la inducida por 100 ng/mL de LPS. En tanto que con 500 ng/mL de ATA se observó una liberación de NO 28.7 y 3.8 veces mayor que la basal y que en presencia de LPS, respectivamente. El tratamiento con L-NMMA, inhibió 56.8% de la producción de NO en los cultivos de FgH.

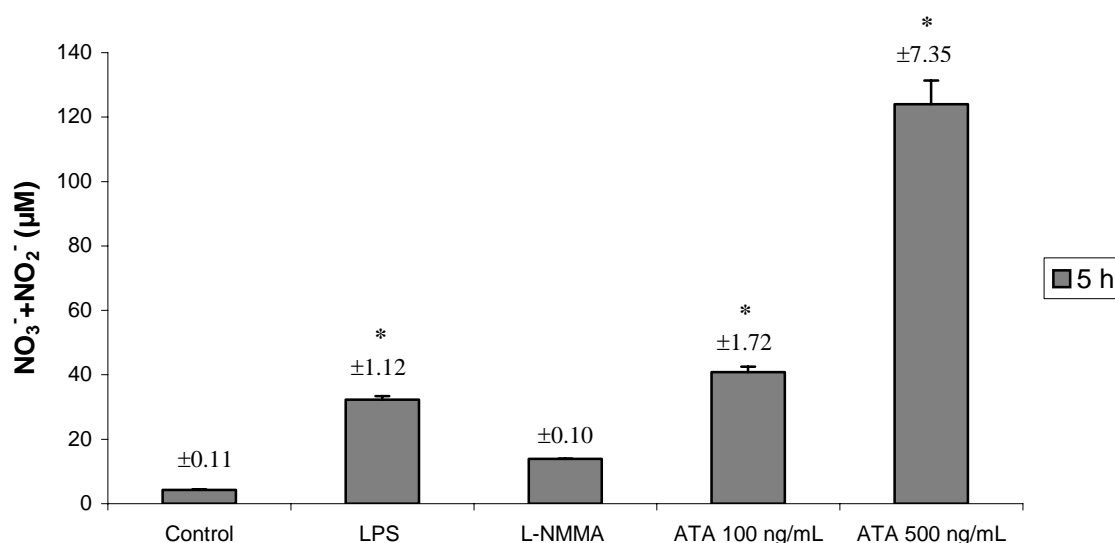


Figura 21. Producción total de NO en FgH estimulados con ATA. Se colocaron 3 mL de sangre total en tubos estériles. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los testigos positivos se estimularon con 100 ng/mL de LPS. Las barras marcadas como (L-NMMA) corresponden a los resultados obtenidos con los cultivos estimulados con 100 ng/mL de LPS en presencia de L-NMMA. Los cultivos experimentales recibieron 100 y 500 ng/mL de ATA, respectivamente. Las preparaciones se colocaron en un rotor y se incubaron a temperatura ambiente por 5 h. Se colectó el plasma por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la producción total de NO mediante la conversión de NO_3^- a NO_2^- y la adición de los reactivos de Griess. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y los cultivos tratados ($P < 0.05$).

7.4 Obtención de fracciones de ADT mediante HPLC

Una vez corroborada la capacidad del ATA para inducir la producción de NO por Fgh, se procedió a realizar la digestión con tripsina. El ADT se separó mediante HPLC, fase reversa, usando un gradiente de concentración preparado a partir de ácido trifluoroacético y acetonitrilo.

En la figura 22, se observa el cromatograma obtenido. La colecta se realizó en los siguientes tiempos de retención: 1)7.2-7.9; 2)9-10; 3)10.1-12.8; 4)14-16; 5) 16-18; 6)19-23; 7)28.4-30; 8)30-35; y 9)39-45 minutos.

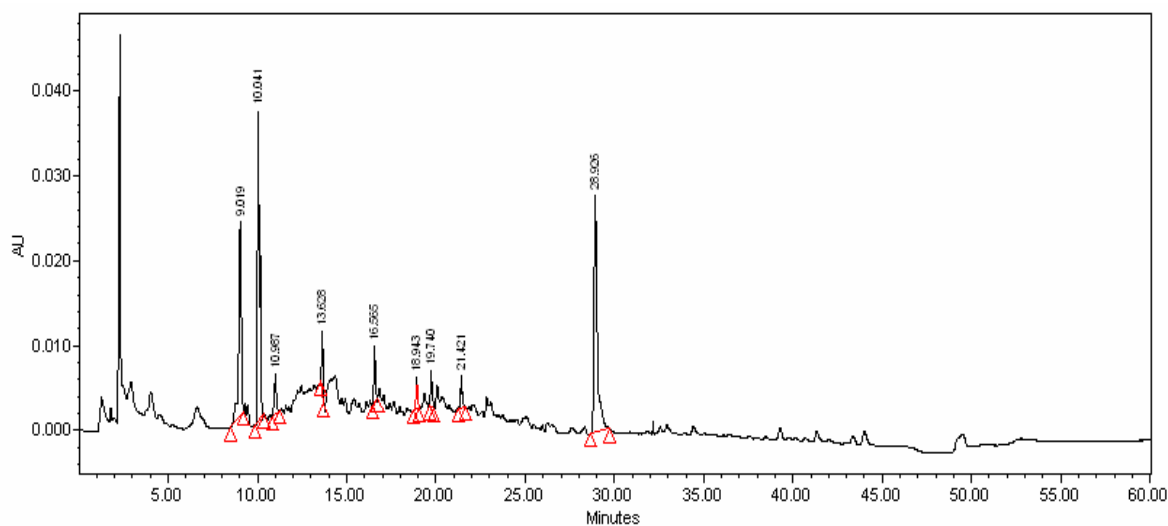


Figura 22. Separación de Fracciones del ADT mediante HPLC. El ATA se digirió con tripsina y los péptidos se separaron mediante HPLC. Se inyectaron al cromatógrafo 10 μ L para el estudio analítico y 25 μ L para la colección de fracciones. La colecta se realizó en los siguientes tiempos de retención: 1)7.2-7.9; 2)9-10.1; 3)10.1-12.8; 4)14-16; 5) 16-18; 6)19-23; 7)28.4-30; 8)30-35; y 9)39-45 min.

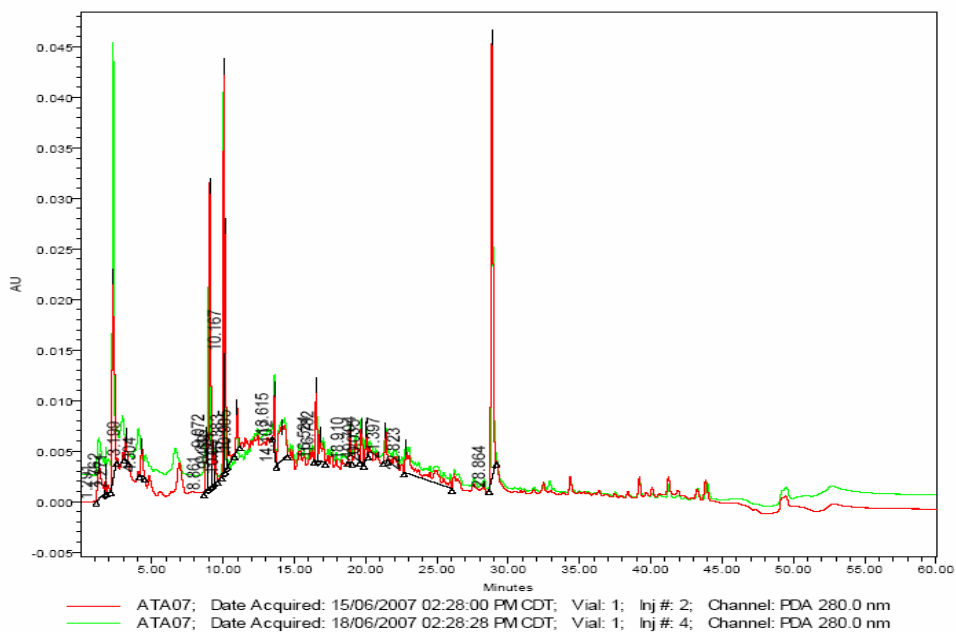
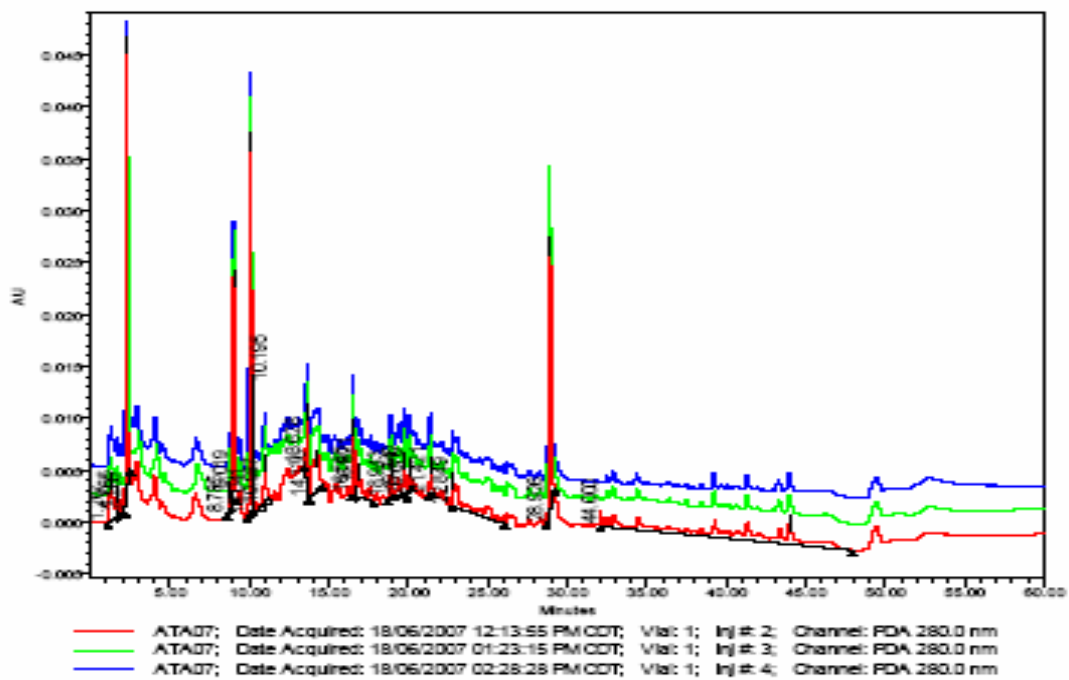


Figura 23. Overlay. Se observa la reproducibilidad de los cromatogramas obtenidos en diferentes tiempos.

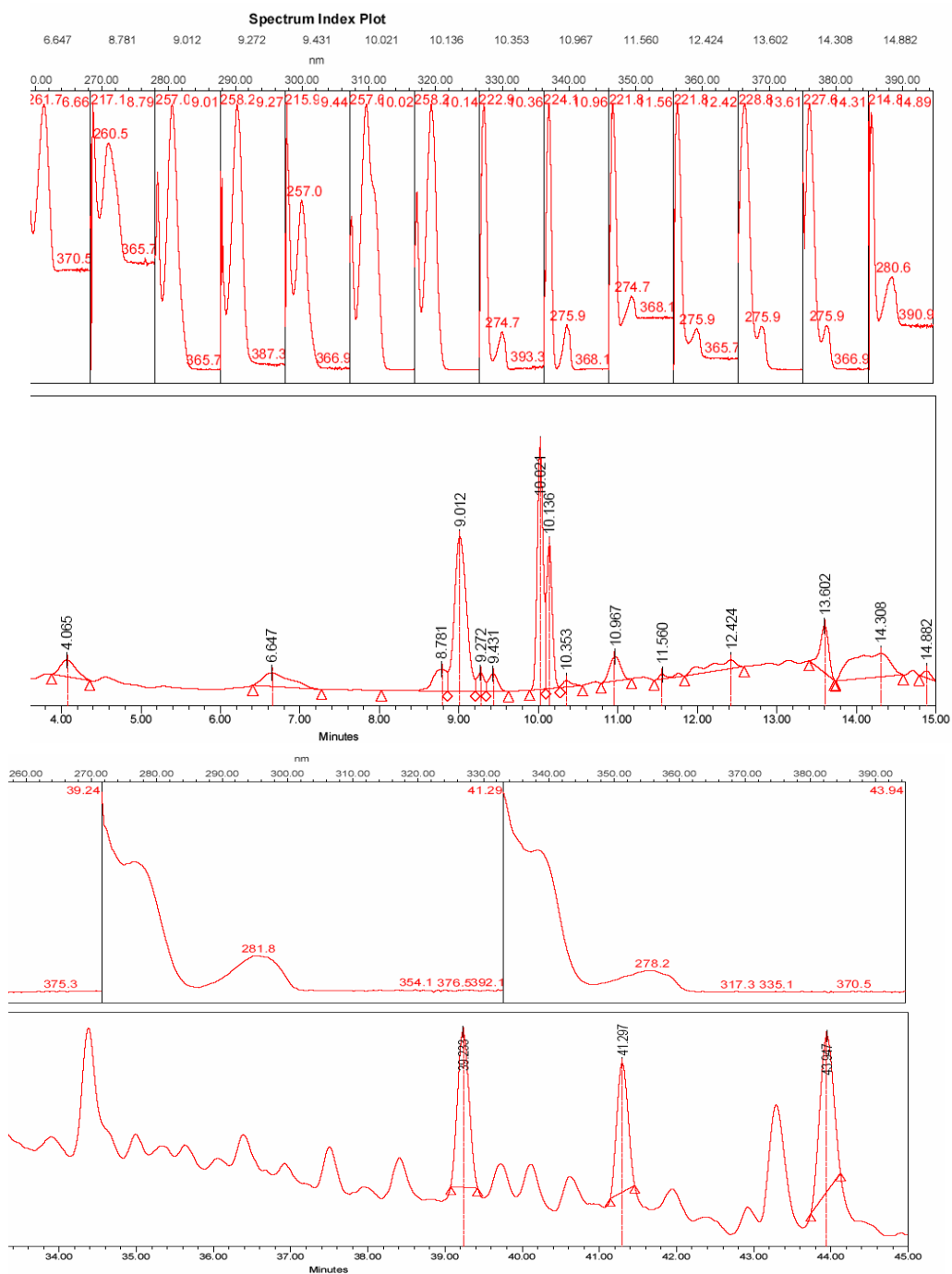


Figura 24. Espectro de picos mayoritarios. El estudio a nivel analítico de los espectros de los picos muestra un comportamiento característico de péptidos con máximos de absorbancia a 280 nm aproximadamente.

Bajo las mismas condiciones experimentales, se inyectó un blanco, consistente en TRIS, carbonato de amonio y tripsina (sin muestra) para corroborar que las fracciones obtenidas no correspondieran a la tripsina empleada en la digestión del ATA. En la figura 25, se observa que los niveles basales de detección se encuentran por debajo de los obtenidos por las fracciones ambientales y que no hay interferencias por la tripsina utilizada.

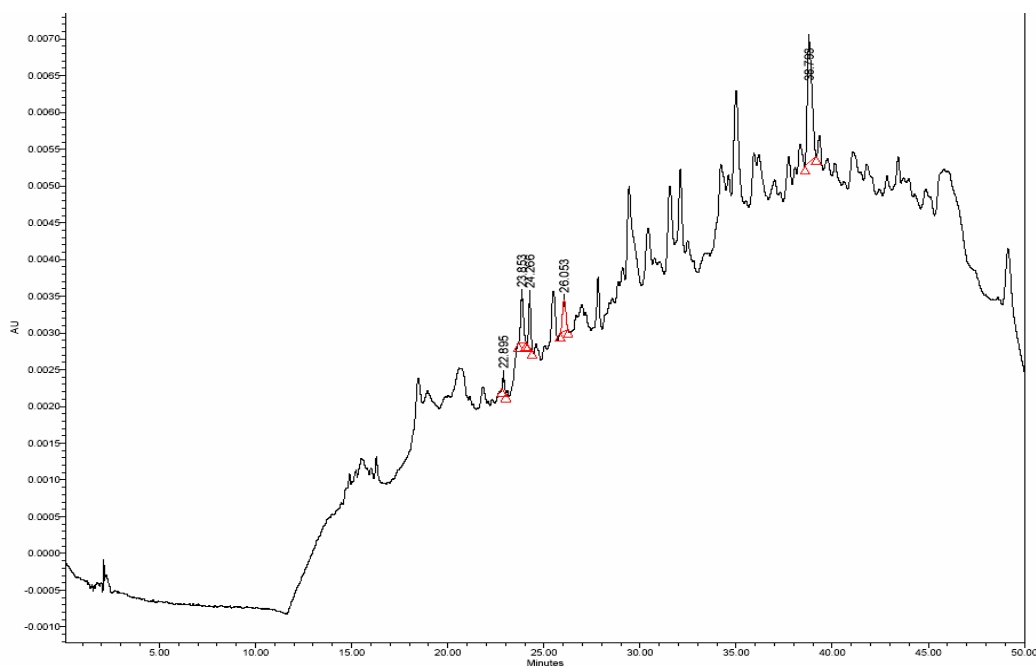


Figura 25. Cromatograma de tripsina. Para corroborar que las fracciones obtenidas no correspondieran a la tripsina empleada para la digestión, se corrió un blanco de tripsina bajo las mismas condiciones.

7.4 Identificación de fracciones con mayor habilidad para inducir la producción de NO en FgH

En la figura 26, se observan los resultados de la estimulación de los fagocitos humanos con a) 100 ng/mL b) 500 ng/mL de las fracciones obtenidas por HPLC. Todas las fracciones amibianas estimularon la producción de NO ($P < 0.05$) y el efecto es dosis-dependiente. Sin embargo, con 500 ng de la fracción F6 y F7, se obtuvo una producción de NO 5.9 y 5.5 veces mayor que la obtenida en cultivos no tratados, respectivamente. La adición de L-NMMA en presencia de LPS resultó, como se esperaba, en una inhibición de la producción de NO (57%).

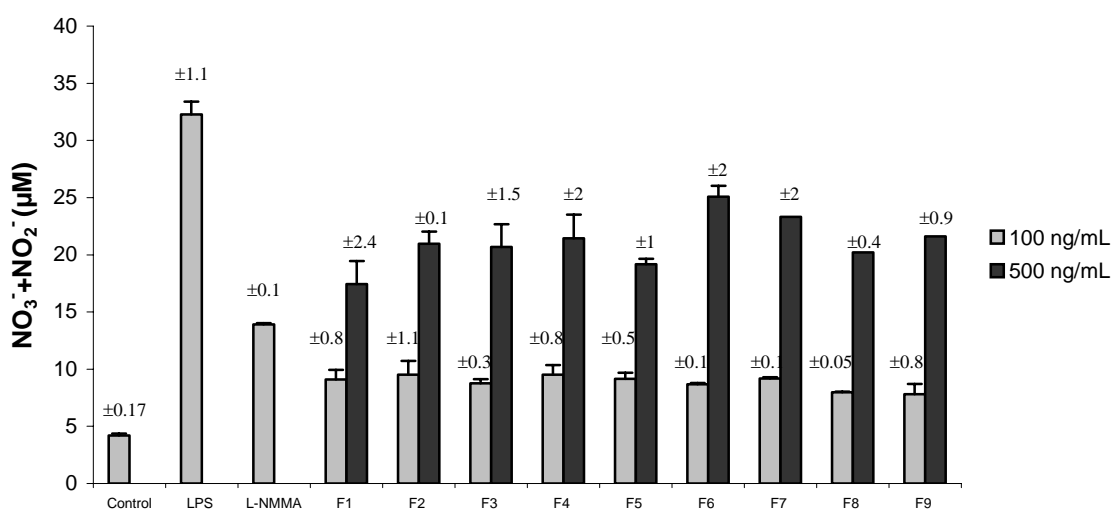


Figura 26. Producción total de NO en FgH estimulados con fracciones amibianas. El grupo control consistió en cultivos de células sin tratar. Los testigos positivos se estimularon con 100 ng/mL de LPS. Además, se incluyeron cultivos de FgH estimulados con una combinación de L-NMMA y LPS (barras marcadas como L-NMMA). Los cultivos experimentales se estimularon con 100 o con 500 ng/mL de las fracciones obtenidas por HPLC (F1 a F9). Las preparaciones se colocaron en un rotor y se incubaron a temperatura ambiente por 5 h. El plasma de cada cultivo se colectó por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la producción total de NO mediante la conversión de NO_3^- a NO_2^- y la adición de los reactivos de Griess. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y los resultados obtenidos con los cultivos tratados con las fracciones ($P < 0.05$).

7.5 Determinación de TNF- α en plasma

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de sangre total estimulada con LPS, ATA y las fracciones amibianas F6 y F7. Se realizó la determinación de TNF- α mediante la técnica de ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay).

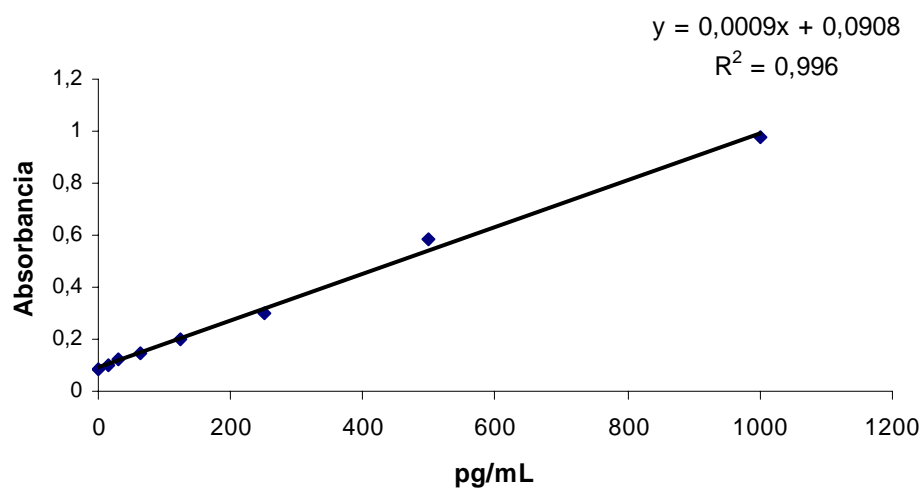


Figura 27. Curva estándar para la determinación de TNF- α . Se prepararon diluciones seriadas 1:2 para generar la curva estándar a partir de TNF- α humano. Los puntos fueron 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 0 pg/mL. Se realizó la determinación de TNF- α mediante la técnica de ELISA y se determinó la $A_{450\text{ nm}}$.

En la figura 28, se observa que la fracción F6 fue incapaz de estimular la producción de TNF- α en fagocitos humanos. Sin embargo, el tratamiento de las células con la fracción F7 y ATA indujo un incremento significativo en la producción de TNF- α ($P < 0.05$). Siendo considerablemente mayor el efecto inducido en cultivos estimulados con LPS.

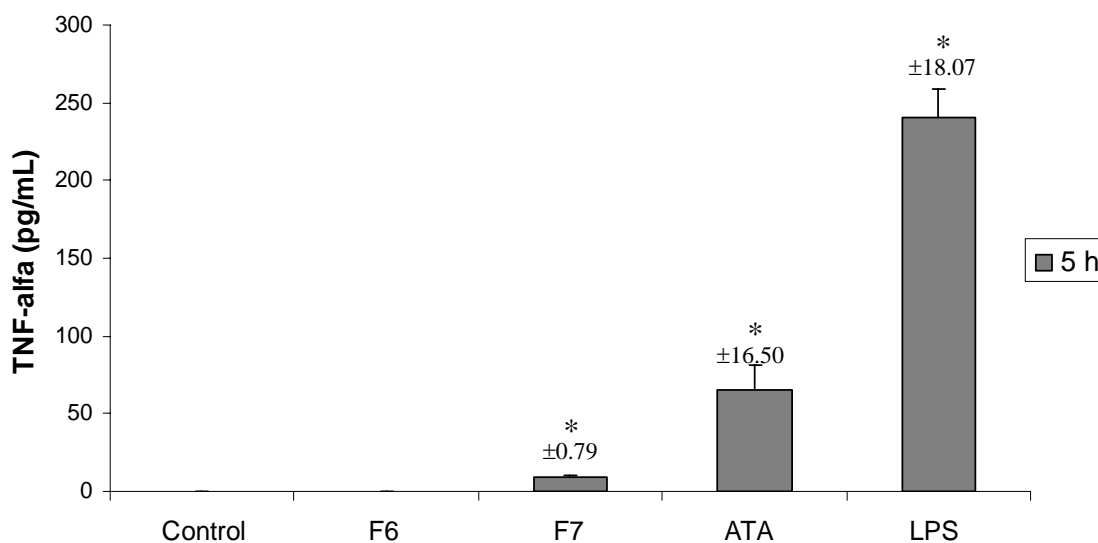


Figura 25. Producción de TNF- α en FgH estimulados con ATA y fracciones amibianas. El grupo control fueron células sin tratar. El testigo positivo recibió 100 ng/mL de LPS. Los grupos experimentales recibieron 500 ng/mL de ATA, o de las fracciones F6 ó F7, respectivamente. Se calculó por regresión lineal la concentración de TNF- α en cada pozo. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y los cultivos tratados ($P < 0.05$).

7.6 Secuenciación los péptidos de interés mediante espectrometría de masas

Se obtuvo la secuencia de los péptidos contenidos en las fracciones F6 y F7 y la identificación de las proteínas a las que estos pertenecen, con mayor probabilidad. Sin embargo no es posible publicar estos resultados por haber sido solicitada la patente correspondiente a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

8. DISCUSIÓN

Los fagocitos profesionales, tales como neutrófilos, monocitos y macrófagos tienen la capacidad de reconocer patógenos, fagocitar y responder con la producción de péptidos anti-microbianos, mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, contribuyendo con la defensa del hospedero frente a las infecciones (O'Mahoney *et al.*, 2008; Kubica *et al.*, 2008; Medzhitov and Janeway, 2000).

La función más sofisticada de los fagocitos es el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T para contribuir con la inmunidad adaptativa (Stuart and Ezekowitz, 2008, Jutras and Desjardins, 2005).

Se ha demostrado que el NO es el responsable de la citotoxicidad de macrófagos activados contra células tumorales (Higushi *et al.*, 1990; Stuehr and Nathan, 1989; Hibbs *et al.*, 1987;), virus como *Ectromelia*, *Vaccinia* y *Herpes simplex-1* (Karupiah *et al.*, 1993), patógenos fúngicos como *Cryptococcus neoformans* (Goldman *et al.*, 1996; Granger *et al.*, 1989), patógenos bacterianos como *Mycobacterium tuberculosis* (Pedrosa *et al.*, 2000; Denis, 1991), parásitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990), *Plasmodium berghei* (Mellouk *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1990), *Leishmania* (Green *et al.*, 1991; Liew *et al.*, 1990) y parásitos extracelulares como *Trypanosoma musculi* (Vincendeau and Daulouede, 1991), *Trypanosoma cruzi*, *T. vaginalis*, *Naegleria fowleri* (Gradoni and Ascenzi, 2004) y *Schistosoma mansoni* (James and Glaven, 1989).

Particularmente, el NO es la principal molécula citotóxica liberada por macrófagos murinos activados contra *E. histolytica*. Este mecanismo efector, dependiente de L-arginina, inhibe selectivamente enzimas claves en el metabolismo de este parásito (Lin and Chadee, 1992). Particularmente, las proteasas de cisteína son blanco de modificaciones químicas dependientes de NO, las cuales conllevan a la pérdida de la actividad enzimática (Gradoni and Ascenzi, 2004).

Sin embargo, algunos investigadores no han podido demostrar la producción *in vitro* de NO en monocitos y macrófagos humanos (Murray and Teitelbaum, 1992; Schneemann *et al.*, 1993; Padgett and Pruett, 1992; Harwix *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1990; Weinberg *et al.*, 1993; Sakai and Milstien, 1993; Denis, 1994). Otros investigadores han demostrado únicamente una baja producción de NO (Zembala *et al.*, 1994; Martín and Edwards, 1993; Sherman *et al.*, 1991; Pietraforte *et al.*, 1994; Hunt and Goldin, 1992; Muñoz *et al.*, 1992; Mautino *et al.*, 1994; Mossalayi *et al.*, 1994; Dugas *et al.*, 1995, Snell *et al.*, 1997). Por lo tanto, este hecho resulta controversial (Venketaraman *et al.*, 2003; Panaro *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2002; Bertholet *et al.*, 1999; Schluger and Rom, 1998; Arias *et al.*, 1997; Wileman *et al.*, 1995; Albina, 1995; Denis, 1994).

Tomando esto en consideración, fue necesario estandarizar un modelo para la producción de NO en fagocitos humanos.

En este proyecto, mostramos que los co-cultivos de monocitos y linfocitos humanos provenientes de sangre periférica, y macrófagos humanos provenientes de las líneas monocíticas humanas THP-1 y U937, cultivados bajo diferentes condiciones experimentales (diferentes concentraciones de células y de LPS, tiempo

en que se realizó el estímulo, tiempo en que se realizaron las lecturas) no presentan diferencias significativas en la producción de nitritos con respecto a las células no estimuladas.

Es bien conocido que los ésteres de forbol promueven la expresión de iNOS, inducen adherencia y diferenciación de líneas monocíticas promoviendo la expresión de un fenotipo similar a los macrófagos, expresión de CD14 y un incremento en la capacidad de fagocitosis. Sin embargo, a pesar de haber inducido la diferenciación de las líneas THP-1 y U937 con PMA, no se demostró la producción de NO.

Nuestros hallazgos concuerdan con publicaciones previas en las cuales, la línea U937, al igual que los monocitos y macrófagos humanos de sangre periférica, al ser estimulada con diferentes citocinas (IL-1, IFN- γ , TNF- α , vitamina D3, ácido retinoico o LPS) no presenta diferencias significativas en la producción de NO con respecto a las células no estimuladas (Bertholet *et al.*, 1999).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la línea celular de macrófagos murinos, J774, generó grandes cantidades de NO según los resultados de la medición de uno de los productos de oxidación: los nitritos.

En macrófagos murinos, la toma de arginina, el único sustrato para la síntesis de NO, se lleva a cabo por 2 permeasas, MCAT-1 y MCAT-2B, las cuales se activan con IFN y LPS. Estos estímulos actúan de forma sinérgica en el nivel transcripcional (Xie *et al.*, 1992) y son suficientes para inducir una alta síntesis de NO. Por esta razón, los macrófagos murinos son considerados como el modelo ideal para la expresión de iNOS y la producción de NO.

En humanos, se desconocen los agentes o citocinas que activan HCAT para el incremento intracelular de L-arginina. Y es bien conocido que los bajos niveles de NO o la ausencia de este, están asociados con un transporte disminuído de L-arginina.

Aunado a esto, los monocitos y macrófagos humanos no sintetizan tetrahydrobiopterina (BH₄) *in vitro* (Weinberg *et al.*, 1995; Schneemann *et al.*, 1993; Schoedon *et al.*, 1987; Werner *et al.*, 1990), el cual es uno de los factores limitantes e importantes para el mantenimiento de la enzima iNOS en su forma activa (Tzeng *et al.*, 1995). Esto es debido a que estas células carecen de la enzima 6-piruviltetrahydrobiopterina sintasa que permite la síntesis de BH₄ a partir de dihidroneopterin-3-fosfato. En condiciones *in vivo*, los monocitos y macrófagos humanos toman el factor de otras células que si lo producen, p.j. linfocitos (Cameron *et al.*, 1990) y células endoteliales (Schoedon *et al.*, 1995).

Las discrepancias observadas entre los modelos humanos y murinos, sugieren mecanismos diferentes de regulación de iNOS y nuestros resultados en conjunto con investigaciones previas nos permiten concluir que las limitaciones en los modelos humanos son múltiples y pueden incluir estimulación inadecuada, inhibición transcripcional, iNOS no funcional, falta de sustrato y cofactores indispensables.

A pesar de los intentos fallidos por demostrar producción de NO, en los sistemas celulares antes mencionados, Franco *et al.*, demostraron que la estimulación *in vitro* de células totales de sangre periférica con LPS induce la producción de NO.

Tomando como referencia este antecedente, decidimos estimular células totales de sangre periférica y realizar la determinación de la producción de NO en plasma, mediante la conversión de nitratos a nitritos.

Los resultados demostraron que la estimulación de células totales de sangre periférica con LPS, durante un periodo de 5 h, es suficiente para inducir la producción de NO en fagocitos humanos. Estos resultados difieren con publicaciones previas que apoyan la idea de que los mediadores inflamatorios, tales como citocinas

o LPS, no inducen niveles detectables de NO en fagocitos humanos a pesar de la detección del RNAm y la proteína de iNOS (Weinberg *et al.*, 1995; Zembala *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1997; Albina, 1995).

Al realizar la estimulación en sangre total, las células mantienen diferentes interacciones celulares, lo cual asemeja las condiciones *in vivo*, teniendo los monocitos y macrófagos, la oportunidad de tomar la tetrahidrobiopterina de los linfocitos presentes en nuestro sistema.

Por otro lado, los neutrófilos humanos también expresan iNOS y producen NO pero en menor cantidad que los macrófagos (Evans *et al.*, 1996). Estas células podrían sumarse a la acción de los monocitos y macrófagos incrementando los niveles de nitritos y participando en la eliminación del parásito.

Los nitritos presentes en la sangre tienen una vida media muy corta (Dejam *et al.*, 2005). Por tal motivo, al realizar las determinaciones a las 24, 48 y 72 h, los niveles de nitritos regresaban a su estado basal (datos no mostrados).

La actividad de iNOS en células de mamíferos puede inhibirse por análogos de L-arginina tales como L-NA, L-NAME, L-NMMA y por isotioureas (Venketaraman *et al.*, 2003). Publicaciones previas han demostrado que el L-NMMA inhibe la actividad amebicida de macrófagos murinos (Lin and Chadee, 1992).

En este estudio, el tratamiento de las células totales de sangre periférica con L-NMMA, inhibió parcial y competitivamente, la liberación de óxido nítrico de manera dosis-dependiente lo cual concuerda con estudios previos (Venketaraman *et al.*, 2003; Marletta *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que la lectina de unión a galactosa de *E. histolytica* induce la producción de NO por macrófagos murinos (Seguin *et al.*, 1997). Sin embargo no se ha demostrado que este antígeno induzca una respuesta inmune protectora en seres humanos porque eso depende de la unión de péptidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.

En este proyecto se muestran evidencias de la producción de NO en fagocitos humanos (macrófagos, monocitos y neutrófilos) estimulados *in vitro* con antígenos provenientes de trofozoítos de *E. histolytica*.

Considerando que no existe un modelo animal que mimetice el ciclo completo de la amibiasis humana (Tsutsumi and Shibayama, 2006), este modelo en células totales de sangre periférica, podría asemejar más las interacciones celulares que ocurren *in vivo* y que participan en la defensa contra *E. histolytica*.

El TNF- α , una molécula efectora no-oxidativa producida por fagocitos mononucleares activados, actúa estimulando la atracción de neutrófilos y monocitos hacia los focos de infección. Por esto, es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda contra microorganismos infecciosos, siendo el LPS, el estímulo más potente para desencadenar su síntesis.

El TNF- α también ha demostrado ser un potente mediador de la respuesta inmune contra infecciones parasitarias (James, 1991) originadas por *Plasmodium yoelii* (Taverne *et al.*, 1987), *Leishmania major* (Liew *et al.*, 1990 a,b,c; Titus *et al.*, 1989), *Toxoplasma gondii* (Chang *et al.*, 1990), *Trypanosoma cruzi* (Wirth and Kierszenbaum, 1988) y *Schistosoma mansoni* (James *et al.*, 1990).

Macrófagos murinos tratados con DNA de *E. histolytica* han demostrado incrementos en el RNAm de TNF- α y en la producción de la proteína (Ivory *et al.*, 2008). Por otro lado, la interacción de células presentadoras de antígeno con el lipopeptidofosfoglicano (LPPG), expuesto en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica*, resulta en la activación de NF-kappa B y en la liberación de TNF- α y otras citocinas pro-inflamatorias por monocitos (Maldonado *et al.*, 2005) y

macrófagos humanos (Vivanco *et al.*, 2007). La lectina de unión a galactosa de *E. histolytica* presenta una región estimulante de TNF- α , la cual, induce la activación y la producción de NO en macrófagos murinos incrementando la actividad amebicida (Seguin *et al.*, 1997, 1995).

La fracción 6 a pesar de inducir la mayor producción de NO fue incapaz de estimular la producción de TNF- α por los fagocitos. En cambio, el tratamiento de la sangre total periférica con ATA y la fracción 7 (F7) induce no solamente la producción de NO, sino también la producción de TNF- α . Es probable que estos antígenos (ATA y F7) estimulen la liberación de TNF- α en los fagocitos y que esta molécula actué como segunda señal para estimular la producción de NO por estas células.

Por otro lado, el hecho de que las células estimuladas con ATA, tengan la mayor producción de TNF, no es de sorprendernos debido a que los antígenos particulados (como el ATA) son más susceptibles de ser fagocitados y de ser presentados a los linfocitos TCD4⁺ en comparación con los antígenos solubles (F6 y F7).

Considerando que el TNF- α aumenta la citotoxicidad dependiente de NO de los macrófagos contra *E. histolytica* (Blázquez *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 1994), al incrementar los niveles de expresión del RNAm de iNOS, nosotros proponemos que los antígenos aislados en el presente proyecto son excelentes inmunógenos y por tanto, candidatos para una futura vacuna, al contribuir con el desarrollo de los mecanismos efectores celulares más efectivos en la defensa del hospedero contra este parásito. Aunado a esto, las secuencias de estos antígenos, obtenidas mediante espectrometría de masas, demuestran que no se parecen a ninguno de los antígenos que ya han sido descritos por otros autores.

La modulación de las funciones ejercidas por los macrófagos en respuesta a moléculas propias del parásito puede afectar drásticamente el curso de la infección. Por tanto, se requieren estudios adicionales para identificar los agentes que regulan selectivamente las moléculas efectoras de los macrófagos en la defensa del hospedero frente a la amibiasis.

Finalmente, la posibilidad de inducir la liberación de NO en humanos está relacionada con el balance entre el beneficio y los efectos perjudiciales en el curso de la infección. Entre los beneficios, aparte de la eliminación de microorganismos patógenos, se encuentra la protección contra enfermedades autoinmunitarias a través de la apoptosis de linfocitos T inducida por NO (Tarrant *et al.*, 1999). Entre las desventajas se encuentran, la inmunosupresión (MacFarlane *et al.*, 1998, 1999), en parte debida a la inhibición de IL-12 (Huang *et al.*, 1998), y la probable formación de peroxinitritos o radicales hidroxilo (Giorgio *et al.*, 1998; Nappi and Vass, 1998).

Indudablemente, se requieren estudios adicionales enfocados en los mecanismos moleculares involucrados en la producción de NO por células humanas, el entendimiento de las moléculas o células diana y su papel en diversos estados patológicos, especialmente en infección y en enfermedades inmunológicas.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El antígeno total amibiano es capaz de inducir producción de óxido nítrico y TNF- α en fagocitos humanos de sangre periférica.
2. Algunos péptidos provenientes de trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de inducir producción de óxido nítrico en fagocitos humanos de sangre periférica.
3. El tratamiento de las células totales de sangre periférica con L-NMMA, inhibió parcial y competitivamente, la liberación de óxido nítrico de manera dosis-dependiente.
4. Los antígenos proteicos aislados en el presente proyecto son candidatos para una futura vacuna ya que contribuyen con el desarrollo de los mecanismos efectores celulares más efectivos en la defensa del hospedero contra *E. histolytica*.

Mientras que la habilidad de obtener cultivos axénicos de trofozoítos de *E. histolytica* hace teóricamente posible la utilización de antígenos parasitarios nativos en vacunas, el costo en gran escala del cultivo de amibas, y la dificultad de purificar proteínas nativas, representan una barrera significativa.

Considerando lo expuesto anteriormente, una estrategia para el desarrollo de vacunas contra amibiasis podría orientarse hacia la identificación y aislamiento de los genes que codifican antígenos inmunogénicos de *E. histolytica* y la expresión de éstos en diferentes sistemas procarióticos.

Otra estrategia que está siguiendo nuestro grupo de investigación, consiste en obtener péptidos sintéticos tomando como molde las secuencias aminoácidicas de los antígenos bioactivos para posteriormente evaluar el efecto que estos tienen en individuos que expresen moléculas HLA-DR y DQ representativas de la población mestiza mexicana.

Ambas estrategias tendrían como ventajas el uso de antígenos definidos estructuralmente, el establecimiento de los métodos de producción a gran escala y el potencial de utilizar sistemas de liberación procarióticos específicos.

10. LITERATURA CITADA

Abbas A, Litchman A. 2004. *Inmunología Celular y Molecular*. ELSEVIER: Madrid, pp. 6 y 26.

Abd-Alla MD, Jackson TF, Rogers T, Reddy S, Ravdin JI. 2006. Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infect Immun* 74(7): 3897-3903.

Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, Ravdin JI. 2000. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol* 38(6):2344-2347.

Abd-Alla MD, Jackson TF, Gathiram V, *et al.* 1993. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from non-pathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol* 31:2845-2850.

Abd-Alla MD, Jackson TF, Soong GC, Mazanec M, Ravdin JI. 2004. Identification of the *Entamoeba histolytica* galactose inhibitable lectin epitopes recognized by human immunoglobulin A antibodies following cure of amebic liver abscess. *Infec Immunol* 72(7): 3974-3980.

Abd-Alla MD, Jackson TF, Tannich E. 2003. Identification of humans IgG and IgA lectin epitopes associated with immunity to intestinal infection by *Entamoeba* species. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: from Genomics to Disease, Paris, France, May 19-21.

Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric Oxide synthases reveal a role for clamodulin in controlling electron transfer. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:19769-10772.

Adams LB, Hibss JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 144:2725.

Albina JE. 1995. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leukoc Biol* 58:643-649.

Altschul SF., Madden TL, Shcäffer AA, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Miller W, and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3398-3402.

Arias M, Zabaleta J, Rodríguez JI, Rojas M, Paris SC, García LF. 1997. Failure to induce nitric oxide production by human monocyte-derived macrophages. Manipulation of biochemical pathways. *Allergol Immunopathol (Madr)* 25:280-288.

Baek KJ, Thiel BA, Lucas S. 1993. Macrophage nitric oxide synthase subunits: purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem* 268:21120-21129.

Baydoun AR, Bogle RG, Pearson Jd, Mann GE. 1993. Selective inhibition by dexamethasone of induction of NO synthase, but not of induction of L-arginine uptake, in activated murine macrophage J774 cells. *Br J Pharmacol* 110: 1401-1406.

Beeving De, Soong CJ, Ravdin JI. 1996. Oral immunization with a recombinant cysteine rich section of *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has *in vitro* adherence inhibition activity. *Infect Immun* 64:1473-1476

Blazquez S, Zimmer C, Guigon G, Olivo-Marin JC, Guillén N, Labruyère E. 2006. Human Tumor Necrosis Factor is a Chemoattractant for the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 74(2):1407-1411.

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, *et al.* 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J clin Invest* 90:1131-1137.

Bruchhaus I, Nowak N, Loftus BJ, *et al.* 2003. The intestinal protozoan *Entamoeba histolytica* contains a multitude of twenty cysteine protease genes of which only a small subset is expressed during *in-vitro* cultivation. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: from Genomics to Disease, Paris, France, May 19-21.

Burchard GD, Bilke R. 1992. Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. *Parasitology Research* 78:146-153.

Cameron ML, Granger DL, Weinberg JB, Kozumbo WJ, Koren HS. 1990. Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. *Ann Rev Respir Dis* 142:1313

Campos Rodríguez R, Shibayama Salas R, Pacheco Yépez J, Martínez Palomo A, Tsutsumi V. 1995. Passive immunization during experimental amoebic liver-abscess development. *Parasitology Research* 81:86-88.

Canales-Treviño M, Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A. 1986. Amibiasis hepática experimental en el cobayo: un modelo de resistencia. *Archivos de Investigación Médica* 17(1):223-228.

Chadee K, Petri WA, Innes DJ, Ravdin JJ. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80: 1245-1254.

Chadee K, Moreau F, Meerovich E. 1987. *Entamoeba histolytica*: chemoattractant activity for gerbil neutrophils *in vivo* and *in vitro*. *Experimental Parasitology* 64:12-23.

Chang HR, Grau GE, Pechere JC. 1990. Role of TNF- α and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 69:33-37.

Chertov O, Yang D, Howard ZOM, Oppenheim JJ. 2000. Leuckocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptative immune responses. *Immunological Reviews* 177:68-78.

Choi H, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED. 2002. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J respir Crit Med* 166:178-186.

Cieslak RP, Virgin WH, Stanley LS. 1992. A severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Medicine* 176:1605-1609.

Cruz-Vega DE, Campos-Gongora E, Said-Fernández S, González-Garza Mt. 1997. Determination of the antiamebic effect of a metronidazole/gossypol blend. *Arch Med Res.* 28: 300-301.

Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ. 1990. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212:462-471.

Dejam A, Hunter CJ, Mildred MP, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GF, Kelm N, Gladwin MT, Schechter AN. 2005. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 106(2):734-739.

Denis M. 1994. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 55:682.

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

Denis M, Chadee K. 1988. Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections. *Parasitology today* 4:247.

Denis M. 1991. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leuk Biol* 49:380-387.

Denis M. 1991. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol* 132:150.

Diamond LS, Clark CG. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Shaudinn, 1903 (amended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40(3): 340-344.

Ding M, St Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE. 1997. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia. *J Biol Chem* 272:11327-11335.

Eichinger D. 2001. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* 48:17-21.

Espinosa CM, Martínez PA. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13(2):318-331.

Evans TJ, Butery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. 1996. Cytokine treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 93: 9553-9558.

Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. 1993. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* 71:26-39.

García EA, Rojas A, Esquivel M, Ostoa P. 2007. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunology* 29(12): 679-684.

Gaston B, Reilly J, Drazen JM. 1993. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10957-10961.

Gaucher D, Chadee K. 2002. Construction and immunogenicity of a codon-optimized *Entamoeba histolytica* Gal-lectin based DNA vaccine. *Vaccine* 20:3244-3253.

Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M. 1993. Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:522-526.

Ghadirian E, Denis M. 1992. *In vivo* activation of macrophages by IFN-gamma to kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. *Parasite Immunology* 14:387-404.

Ghadirian E, Salimi A. 1993. *In vivo* effect of recombinant interferon-gamma in combination with LPS on amebicidal activity of murine Kupffer cells. *Immunobiology* 188:203-219.

Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, VonZuben FJ, Yamada A, Augusto O. 1998. *Infect Immun* 66:807.

Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2004. *Inmunología*. McGraw-Hill: México, pp. 42-43.

Gradoni L, Ascenzi P. 2004. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parasitología* 46:101-103.

Granger DL, Hibbs JB , Perfect JR. 1988. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 81: 1129-1136.

Granger DL, , Hibbs JB , Perfect JR, Durack DT. 1989. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capacity of macrophages. *J Clin Invest* 85:264.

Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA. 1990. Cellular mechanism of nonspecific immunity to intracellular infectious pathogens:cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol* 25:15.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144:278-283.

Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. 1991. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J Leukocyte Biol* 50:93.

Gross A, Bertholet S, Muel J, Dornand J. 2004. Impairment of *Brucella* growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. *Microbial Pathogenesis* 36:75-82.

Gross SS, Levi R. 1992. Tetrahydrobiopterin synthesis: an absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 267:25722-25729.

Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, *et al.* 1981. The interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of the Infectious Diseases* 143: 83-93.

Hall N. 2003. *Entamoeba* Sequencing at the Sanger Institute. EMBO Workshop on Pathogenesis Amoebiasis: from Genomics to Disease, Paris, France, May 19-21.

Haque R, Huston CD, Hughes M, *et al.* 2003. Current concepts: Amebiasis. *N Engl J Med* 348:1565-1573.

Harwix S, Andreesen R, Ferber E, Schwamberger G. 1992. Human macrophages secrete a tumoricidal activity distinct from tumour necrosis factor- α and reactive nitrogen intermediates. *Res Immunol* 143:89.

Hibbs JB Jr. 1991. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: A recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol* 142:565.

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235:473.

Higushi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages: tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144:1425.

Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu DM, Feng GJ, Robinson JH, Lam C, Liew FY. 1998. *Eur J Immunol* 28:4062.

Hunt NC, Goldin RD. 1992. Nitric oxide production by monocyte in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 14:146.

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, *et al.* 2000. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2: 617-625.

Huston CD, Boettner DR, Miller-Sim V, *et al.* 2003. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 71:964-972.

Ivory CP, Prystajeky M, Jobin C, Chadee K. 2008. Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA. *Infect Immun* 76(1):289-297.

Jain P, Sawhney S, Vinayak VK. 1980. Experimental amoebic infection in guinea pigs immunized with low grade amoebic infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74:347-355.

James SL. 1991. The effector function of nitrogen oxides in host defense against parasites. *Exp Parasitol* 73:223-226.

James SL, Glaven J. 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 143:4208.

James SL, Glaven J, Goldenberg S, Meltzer MS, Pearce E. 1990. Tumor necrosis factor (TNF) as a mediator of macrophage helminthotoxic activity. *Parasite Immunol* 12:1-13.

Jarrillo LR, Campos R, Tsutsumi V. 2002. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Pathology* 101:40-56.

Jiménez-Cardoso JM, Jiménez E, Kumate J. 1989. Inducción de inmunidad protectora antiamebiana en hámsters con antígenos heterologos. *Rev Invest Clin* 41:133-140.

Jones AM, Töttemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA. 2003. Induction of Proinflammatory Responses in the Human Monocytic Cell Line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 71(5):2626-2633.

Jutras I, Desjardins M. 2005. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptative immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:511-527.

Karupiah G, Xie QW, Buller RML. 1993. Inhibition of viral replication by interferon- γ induced nitric oxide synthase. *Science* 261:1445-1448.

Keaney JF Jr, Simon DI, Stamler JS. 1993. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest* 91:1582-1589.

Krupp IM. 1974. Protective immunity to amebic infection demonstrated in guinea pigs. *Am J Trop Med Hyg* 23:355-362.

Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Ritcher W, Gajkowska B, Golda A, Gudowska AM, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. 2008. A potential New Pathway for *Staphylococcus aureus* Dissemination: The Silent Survival of *S. aureus* Phagocytosed by Human Monocyte-Derived Macrophages. *Plos One* 1:1-16.

Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, *et al.* 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7659-7663.

Liew FY, Li Y, Millott S. 1990. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 71:556-559.

Liew FY, Li Y, Millott S. 1990. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145:4306-4310.

Liew FY, Millot S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144:4794.

Liew FY, Parkinson C, Millot S, Severn A, Carrier M. 1990. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. I. TNF- α mediated host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 69:570-573.

Lin JY, Chadee K. 1992. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology* 148:3999-4005.

Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. 1994. Tumor Necrosis Factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infection and Immunity* 62(5):1534-1541.

Loftus BJ. 2003. Sequencing and initial analysis of the *Entamoeba histolytica* genome and comparative genomics of related *Entamoeba* species. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: from Genomics to Disease, Paris, France, May 19-21.

Loftus *et al.* 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865-868.

López-Revilla R, Rodríguez-Báez J. 1981. Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Consejo Nacional de ciencia y tecnología, México pp 36 y 56.

Lotter H, Russmann H, Tannich E. 2003. Oral vaccination with recombinant *Yersinia* expressing hybrid type III proteins protects gerbils from amebic liver abscess. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: form Genomics to Disease, Paris, France, May 19-21.

MacFarlane AS, Huang D, Schwacha MG, Meissler JJ, Gaughan JP, Eisenstein TK. 1998. *Microb Pathog* 25:267.

MacFarlane AS, Schwacha MG, Eisenstein TK. 1999. *Infect Immun* 67:891.

Malawista SE, Montgomery RR, Van Blaricom G. 1992. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. *J Clin Invest* 90:631-636.

Maldonado BC, Kirschning CJ, Rosentein Y, Rocha LM, Rios SN, Espinosa CM, Becker I, Estrada I, Salazar GRM, López MC, Wagner H, Sánchez J, Isibasi A. 2005. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol* 27(4):127-137.

Mann BJ. 2002. *Entamoeba histolytica* genome project: an update. *Trends Parasitol* 18: 147-148.

Mann BJ, Burkholder BV, Lockhart LA. 1997. Protection in a gerbil model of amoebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 15:659-663.

Marletta MA, Yoon, Iyengar, Leaf, Wicknok JS. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27:8706.

Martin JH, Alalami O, Yagoob F. 2000. Differential effects of retinoids on nitric oxide production by promonocytic U937 cells and ZR-75 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 7(2):219-23.

Martin JH, Edwards SW. 1993. Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol* 150:3478.

Martínez P. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today* 3(4):111-118.

Mautino G, Paul Eugene N, Chanez P, Vignola AM, Kolb JP, Bousquet J, Dugas B. 1994. Heterogeneous spontaneous and interleukin-4-induced nitric oxide production by human monocytes. *J Leukoc Biol* 56:15.

- Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000. Innate Immunity. *N Engl J Med* 343(5):338-344.
- Meerovitch E, Chadee K. 1988. *In vivo* models of immunity in amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. 425-437.
- Mellouk S, Green SJ, Nacy CA, Hoffman SL. 1991. IFN inhibits development of exoerythrocytic stages of *Plasmodium berghei* in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism, *J Immunol* 146:3971.
- Molina *et al.*, 2006 Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Fluorensia cernua* DC against strains of *Micobacterium tuberculosis*.
- Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 329:2002.
- Muñoz FMA, Fernández MA, Fresno M. 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol Lett* 33:35.
- Murray HW, Teitelbaum RF. 1992. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 165:513.
- Nappi AJ, Vass E. 1998. *Biochem Biophys Acta* 1380:55.
- Nathan CF. 1992. Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* 16:3051.
- Nussler A, Drapier JC, Renia L. 1991. L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur J immunol* 21:227.230.
- O'Mahoney S, Pham U, Lyer R, Hawn TR, Liles WC. 2008. Differential Constitutive and Cytokine-Modulated Expression of Human Toll-like Receptors in Primary Neutrophils, Monocytes and Macrophages. *International Journal of Medical Sciences* 5(1):1-8.

Padgett EL, Pruett SB. 1992. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 286:775.

Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. 1988. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153:1251.

Pan American Health Organization (PAHO). 1997. *Epidemiol Bull* 18:13-14.

Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. 2003. Evidences for iNOS Expression and Nitric Oxide Production in the Human Macrophages. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders* 3:210-221.

Pérez-Pérez G, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ. 1995. Activation of Human THP-1 Cells and Rat Bone Marrow-Derived Macrophages by *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 63(4):1183-1187.

Pertuz S, Ostoa P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A, García E. 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunology* 26(5): 237-241.

Peteroy KMA, Venketaraman V, Connell ND. 2001. Effects of *Mycobacterium bovis* BCG infection on regulation of L-arginine uptake and synthesis of reactive nitrogen intermediates in J774.1 murine macrophages. *Infect Immun* 69:5823-5831.

Petri WA, Haque R, Mann BJ. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: Lectin carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56: 39-64.

Petri WA, Smith RD, Schlesinger PH, Ravdin JI. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin which mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80: 1238-1244.

Pietraforte D, Tritarelli E, Testa U, Minetti M. 1994. gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 55:175

Que X, Reed SL. 1997. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today* 13: 190-194.

Radi R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. PNAS 101 (12): 4003-4008.

Ralph P, Prichard J, Cohn M. 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. J Immunol 114: 898-905.

Ramírez EJ, Flores VL, Segovia J, Arias NS. 2007. Nitric Oxide participation during amoebic liver abscess development. Medicina (B Aires) 67(2):167-176.

Ramírez EJ, González HA, Arias NS. 2005. Expresión of inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the development of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*. Curr Microbiol 50(6):299-308.

Ravdin JI, Abd-Alla MD, Welles SL, Reddy S, Jackson TF. 2003. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. Infect Immun 71(12):6899-6905.

Ravdin JI, Guerrant RL. 1981. The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J Clin Invest 68:1305-1313.

Ravdin JI, Stanley P, Murphy CF, Petri WA Jr. 1989. Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. Infect Immun 57: 2179-2186.

Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, et al. The relationship of free intracellular calcium ions to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 56: 1505-1512.

Ravdin JI. 1989. Immunobiology of human infection. Pathol Immunopathol Res 8:179-205.

Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, et al. 1994. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. Exp Parasitol 79: 460-467.

Ramírez E, Flores V, Segovia J, Arias N. 2007. Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. Medicina (B Aires) 67(2): 167-176.

Reed SL, Ember JA, Herdman DS, Scipio RG, Hugli TE, Gigli I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a y C5a. *Journal of Immunology* 155:266-274.

Reed SL, Gigli I. 1990. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *Journal of Clinical Investigation* 86:1815-1822.

Reed SL, Keene WE, McKerrow JH, Gigli I. 1989. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Immunology* 143:189-195.

Rico G, Arellano J, Kretschemer R. 1998. The human monocyte locomotion-inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. *Parasitology Research* 84: 522-523.

Roitt I, Brostoff J, Male D. 2001. *Immunology*. Mosby: London, pp. 18.

Ross DG. 2000. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3 α / β 2-integrin glycoprotein. *Critical Reviews in Immunology* 20:197-222.

Said-Fernández S, Va, Vargas-Villarreal J, Castro J, Mata-Cárdenas B, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS médium: alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:249-25.

Sakai N, Milstein S. 1993. Availability of tetrahydrobiopterin is not a factor in the inability to detect nitric oxide production by human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 193:378.

Salata RA, Ahmed P, Ravdin JI. 1989. Chemo-attractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Parasitology* 75:644-646.

Salata RA, Pearson RD, Ravdin JI. 1985. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J Clin Invest* 76: 491-499.

Salata RA, Martínez-Palomo A, Murphy CF, et al. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop a cell mediated immune response effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. J Immunol 136: 2633-2639.

Salata RA, Murria HW, Rubin BY, Ravdin JI. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxicity for *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med 37:72.

Sánchez-Guillen MC, Perez-Fuentes R, Salgado Rosas H. 2002. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. Am J Trop Med Hyg 66:731-737.

Schluger NW, Rom WN. 1998. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 157:679-691.

Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J Infect Dis 167:1358.

Schoedon G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S, Schaffner A. 1995. Nitric oxide and infection: another view. Clin Infect Dis 21:S152-S157.

Schoedon G, Troppmair J, Fontana A, Huber C, Curtius HC, Niederwiesser A. 1987. Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. J Biochem 166:303-310.

Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. 1995. Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor-alpha production by macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92:12175-12179.

Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. 1997. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. Infection and Immunity 65:2522-2527.

Sepúlveda B. 1980. Inducción de inmunidad protectora antiamebiasica en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. Comentarios y Conclusiones. Arch Invest Méd (México) 11:275-286.

Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. 1982. Immunology of Amoebiasis by *Entamoeba histolytica*. *Parasitic Infections* 8:170-191.

Seydel BK, Smith SJ, Stanley SL. 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and Immunity* 68:400-402.

Seydel BK, Zhang T, Stanley Jr.SL,. 1997. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity* 65:3951-3953.

Sharma A, Haq A, Ahmad S, Lederer E. 1985. Vaccination of rabbits against *Entamoeba histolytica* with aqueous suspensions of trehalose dimycolate as the adjuvant. *Infect Immun* 41:133-140.

Sharma M, Vohra H, Bhasin D. 2005. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology* 131(6): 783-796.

Sherman MP, Loro ML, Wong VZ, Tashkin DP. 1991. Cytokine and *Pneumocystis carini*-induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J Protozool* 38:234S.

Shibayama-Salas M, Tsutsumi V, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A, 1992. Morphological characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. *Archives of Medical Research* 23:203-207.

Snell JC, Chernyshev O, Gilbert DL, Colton CA. 1997. Polyribonucleotides induce nitric oxide production by human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 62:369-373.

Spinella S, Levavasseur E, Petek F, Rigotherier MC. 1999. Purification and biochemical characterization of a novel cysteine protease of *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* 266(1): 170-180.

Stanley SL Jr. 2005. The *Entamoeba histolytica* genome: something old, something new, something borrowed and sex too. *Trends Parasitol* 21(10): 451-453.

Stanley SL Jr. 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361:1025-1034

Stanley SL Jr, 1996. Progress Towards an Amebiasis Vaccine. *Parasitology Today* 12(1):7-14.

Stanley SL Jr, Becker A, Kunz-Jenkins C, Foster L, Li E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci* 87:4976-4980.

Stanley SL Jr, Becker A, Kunz-Jenkins C, Gathiram V, Li E. 1991. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA* 266:1984-1986.

Stanley SL Jr, Blanchard JL, Johnson N, Foster L, Kunz-Jenkins C, Zhang T, Tian K, Logswell FB. 1995. Immunogenicity of the recombinant serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in African Green Monkeys. *Vaccine* 13:947-951.

Stauffer W, Ravdin J. 2003. *Entamoeba histolytica*: an update. *Current Opinion in Infectious Disease* 16: 479-485.

Stern JJ, Graybill RJ, Drutz JD. 1984. Murine amebiasis: the role of macrophage in host defense. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:372-380.

Stuart LM, Ezekowitz RA. 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 8(2):131-141.

Stuehr DJ, Marletta MA. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7738-7742.

Stuehr DJ, Nathan CF. 1989. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543.

Tarrant TK, Silver PB, Wahlsten JL, Rizzo LV, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. 1999. *J Exp Med* 189:219.

Tatusova TA, Madden TL. 1999. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250.

Taverne J, Ravernier J, Fiers W, Playfair JH. 1987. Recombinant tumor necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*. Clin Exp Immunol 67:1-4.

Timotti RB. 1995. Nitric Oxide. Novel Biology with Clinical Relevance. Annals of Surgery 221 (4):339-349.

Trissl D. 1982. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. Reviews of Infectious Diseases 4: 1154-1184.

Titus RG, Sherry B, Cerami A. 1989. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental cutaneous leishmaniasis. J. Exp Med 170:2097-2104.

Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. The American Journal of Pathology 130:112-119.

Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez VF, Martínez-Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. The American Journal of Pathology 117: 81-91.

Tsutsumi V, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A. 1990. Amibiasis hepática experimental: inflamación aguda en la rata. Archivos de Investigación Médica (Mex) 21: 233-237.

Tsutsumi V, Shibayama M. 2006. Experimental amoebiasis: a selected review of some *in vivo* models. Arch Med Res 37(2):210-220.

Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Loftus M, Stuehr DJ. 1995. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line:H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. Proc Natl Acad Sci 92:11771-11775.

Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S. 1995. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and Lysophospholipase L1 activities. Parasitol.Res. 81:320-323.

Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodríguez A, Mata-Cárdenas BD, Martínez-Rodríguez HG, Said-Fernández S, Alagón-Cano A. Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A₂. Parasitol. Res. 84:310-314,1998.

Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J. 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunology* 20:225-262.

Velásquez JR, Llaguno P, Fernández-Díez J, Rodríguez M, Arellano J, López-Osuna M, Kretschmer RR. 1995. Antigen induced eosinophilia protects gerbil (*Meriones unguiculatus*) against experimental amebic abscess of the liver. *Archives of Medical Research* 26: S93-S98.

Venketaraman V, Talaue MT, Dayaram YK, Peteroy KMA, Bu W, Conell ND. 2003. Nitric oxide regulation of L-arginine uptake in murine and human macrophages. *Tuberculosis* 83:311-318.

Ventura JJ, Jarrillo LE, Fuentes A, Pineda VA, Muñoz FL, Madrid R, Campos RR. 2003. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol* 25: 503-511.

Vincendeau P, Daulouede S. 1991. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculli* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J Immunol* 144:2725.

Vivanco CH, Alpuche AC, Wong BI, Rocha RLM, Rios SN, Estrada GI, Villasis KMA, López MC, Isisbasi A. 2007. Lipopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunol* 467-474.

Vohra H, Kaur U, Sharma AK, Bhalla V, Bhasin D. 2003. Effective human defense against *E. histolytica*: high amebicidal activity of lymphocytes and monocytes in amoebic liver abscess patients until 3 months follow-up. *Parasitology international* 52: 193-202.

Weinberg JB. 2000. Nitric Oxide Synthase 2 and Cyclooxygenase 2 Interactions in inflammation. *Immunologic Research* 22:319-341.

Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GJ, McDonald B, Bachus KE, Haney AF, Granger DL. 1995. Human Mononuclear Phagocyte Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, Biopterin and Nitric Oxide Production by Blood Monocytes and Peritoneal Macrophages. *Blood* 86(3):1184-1195.

Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ, Pfeiderer W, Watcher H. 1990. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1 and T24 cells. *J Biol Chem* 265:3189-3192.

Wileman SM, Mann GE, Baydoun AR. 1995. Induction of L-arginine uptake and nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells: synergistic actions of pro-inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 116:3243-3250.

Wijesundera SM. 1980. Hepatic amoebiasis in immunodepressed mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 47:216-220.

Wirth JJ, Kierszenbaum F. 1988. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J Immunol* 141:286-288.

World Health Organization (WHO). 1997. *Weekly Epidemiol Rec* 72: 97-99.

World Health Organization (WHO). 1997. *Bull WHO* 75:291-292

Xie Q, Cho H, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Trosso T, Nathan C. 1992. *Science*, 256:225.

Yan L, Stanley SL Jr. 2001. Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun* 69:7911-7914.

Zembala M, Siedlar M, Marcinkiewkez J, Pryjma J. 1994. Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by some tumor cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 24:435.

Zhang T, Stanley SL. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant protein derived from the 170 kilodalton surface adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 62:2605-2608.

Zhang T, Cieslak PR, Foster L, Kuz-Jenkins C, Stanley SL. 1994a. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID)mice. *Parasite Immunology* 16:225-230.

Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL Jr. 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen Infect Immun 62:1166-1170.

Zhang XJ, Pegolir Jr W, Clemens GM, 1994b. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. American Journal of Physiology 266: 624-632.

Zhang Y, Li E, Jackson TF, Zhang T, Gathiram V, Stanley SL. 1992. Use of recombinant 170-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domains of the native molecule. Journal of Clinical Microbiology 30: 2788-2792.

11. APENDICE

TABLAS DE MÉTODOS

TABLA II

Preparación de la curva estándar de nitrato de sodio

Pozo	Estándar (μL)	Buffer de Ensayo (μL)	Concentración Final (μM)
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35

TABLA III

Curva Estándar para la determinación de proteínas por el método de Lowry

SAB (μL)	Agua Desionizada (μL)
0	200
5	195
10	190
20	180
40	160
60	140
80	120

TABLA IV

Programa para generar el gradiente de ácido trifluoroacético y acetonitrilo.

TIEMPO	FLUJO
0-5 min	100% B
5-40 min	Incremento lineal 0-60% A
40-45 min	60% A
45-50 min	Disminución gradual del 60 al 0% de A

TABLA V

Programa para generar el gradiente de Acetonitrilo.

Tiempo	A%	B%
0 min	95	5
90 min	20	80
100 min	95	5
115 min	95	5

RESUMEN CURRICULAR

Ruth Corral Symes

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *E.histolytica* INDUCTORES DE PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN FAGOCITOS HUMANOS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Minatitán, Veracruz , el 2 de Octubre de 1981, hija del Dr. Alberto Alfonso Corral Cantú y la Dra. Isabel Symes Gracia.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo con especialidad en Área de Diagnóstico Clínico en 2004.

Experiencia Profesional: Becario Auxiliar del Dpto. de Microbiología Médica, Laboratorio de Análisis Químico-Clínicos Iris Guajardo FCQ, UANL (2002-2003). Participación en el Programa de Diagnóstico Clínico y Apoyo a Centros de Desarrollo Infantil. Practica Clínica en el H.R. No. 06 IMSS, H.R.E. No. 23 IMSS, H.R.E. No. 25 IMSS, H.R.E. No. 34 IMSS y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS. Becario de Investigación II, CIBIN, IMSS. Maestra de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, FCQ, UANL desde Enero del 2007 a la fecha.