

302927A

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
INCORPORADA A LA UNAM

"INHIBICION DE LA DERMATITIS ALERGICA  
POR CONTACTO POR EL FACTOR INHIBIDOR  
DE LA LOCOMOCION DE LOS MONOCITOS Y  
PEPTIDOS SINTETICOS."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADA EN

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

LORENA DIAZ IBARRA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JUAN ANTONIO GIMENEZ SCHERER

MÉXICO. D.F.

2003

TESIS COM  
1-1-2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

B

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: LEONARDO VIEIRA

FECHA: 18 DE NOVIEMBRE DE 2003

FIRMA: [Firma]

**AGRADEZCO A:**

**DIOS:**

Por su gran misericordia y amor hacia sus hijos, por permitirme terminar uno de los grandes retos en mi vida y por poner en mi camino a las personas indicadas para guiarme hacia la meta.

**MI FAMILIA:**

Ustedes han sido la base de mi formación, agradezco a Dios por tenerlos GRACIAS por amarme.

**AMIGOS Y FAMILIARES:**

Por abrirme las puertas cuando más lo necesite, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por que es grato saber que uno cuenta con personas como ustedes:

Mi amiga Erika, Mis primos Edel y Edemir, Mi tio Oscar, y todos aquellos que saben que los quiero.

**AGRADEZCO ESPECIALMENTE:**

A todos los que contribuyeron a la realización de esta tesis:

- A Rebeca Pérez Contreras

Alvaro

Quienes ayudaron a transcribir y dar forma a esta tesis.

- A los Doctores:

Roberto R. Kretschmer y la unidad de Inmunología

Guadalupe Rico Rosillo

Juan Antonio Giménez Scherer

Guillermo del Rey Pineda

Enrique Foyo Niembro

A quienes respeto y admiro, agradeciendo profundamente que me hayan permitido trabajar con ustedes, ya que fueron parte importante en mi formación. GRACIAS por su ejemplo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

D

**DEDICO ESTA TESIS A:**

**DR. JUAN ANTONIO GIMENEZ SCHERER POR TODAS SUS ENSEÑANZAS,  
POR GUIARME PACIENTEMENTE Y POR SU GRAN APOYO Y CARIÑO QUE  
ME BRINDO DURANTE MI CARRERA Y LA REALIZACION DE ESTA TESIS.**

**GRACIAS.**

**TESIS CON  
FALLA DE ENTEN**

E

INDICE.

	Pag.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>CAPITULO 1. GLOSARIO</b>	3
<b>CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN</b>	10
- Amibiasis	11
- Amibas	13
- Ciclo de vida	14
- Respuesta Inmune General	16
- Encuentro de la <i>E. histolytica</i> con el ser humano y su sistema inmunologico	18
- Respuestas inmune humoral y celular en amibiasis	19
- Complemento	21
- Mecanismos de evasión de la <i>E. histolytica</i>	23
- FILM	24
- Hipersensibilidad	26
<b>CAPITULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	27

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

F

<b>CAPITULO 4. HIPOTESIS</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO 5. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO 6. MATERIAL</b>	<b>34</b>
<b>CAPITULO 7. METODO</b>	<b>39</b>
- Lugar	40
- Diseño	40
- Criterios de inclusión / exclusión	41
- Tamaño de la muestra	42
- Preparación de animales y reactivos	42-44
- Sensibilización	46
- Reto	48
- Interpretación	49
- Diagrama	51
<b>CAPITULO 8. RESULTADOS.</b>	<b>53</b>

TESIS CON  
FALLA EN EL EXAMEN

G

<b>CAPITULO 9. DISCUSION.</b>	65
- Dos péptidos sintéticos reproducen el efecto del FILM	67
- Código de secuencia	68
- Mimetismo molécular	70
- Inhibición local	70
- Pruebas de especie animal	71
- Posible relevancia de la investigación	71
<b>CAPITULO 10. CONCLUSIONES.</b>	73
<b>CAPITULO 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	76
- Bibliografía básica	77
- Bibliografía complementaria	80
<b>CAPITULO 12. ANEXOS.</b>	84
A.I. Presentaciones formales de este estudio	85
A.II. Diseño de un método para identificación individualizada de los cobayos	94

TESIS CON  
FALLA DE COPIEN

17

**INHIBICION DE LA DERMATITIS ALEGICA POR CONTACTO  
(DAC) POR EL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCION DE  
MONOCITOS (FILM)Y PEPTIDOS SINTETICOS**

INSTITUCION  
FARMACIA MARGEN

RESUMEN

La *E. histolytica* tiene varios mecanismos capaces de neutralizar las defensas del cuerpo. Uno de ellos es la producción de un factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) identificado en nuestro laboratorio. Esta molécula afecta, entre otras, la locomoción y la explosión oxidativa de los monocitos, células fagocíticas que predominan en la inflamación tardía.

El FILM es un pentapéptido que es capaz de inhibir la dermatitis alérgica por contacto (DAC) al dinitriclorobenceno (DNCB) en los cobayos – modelo representativo de inflamación tardía.

En el presente trabajo evaluamos el efecto inhibitorio de cuatro análogos sintéticos con distintos grados de semejanza al FILM sobre la DAC en los cobayos.

Se hicieron diluciones progresivas 1:10 de cada péptido para obtener las dosis 1000, 100, 10, Y 1  $\mu\text{g/ml}$  que se designaron con un número de código.

TESIS CON  
FALLA EN EL ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

Los cobayos se sensibilizaron con una solución de 10mg/ml de DNCB, quince días después los animales se retaron con una dosis de DNCB 200 veces menor a la dosis vesicante sobre una inyección intradérmica de una muestra codificada, del FILM como control negativo y de solución salina isotónica (SSI) como control positivo. Las reacciones se evaluaron a las 48 horas y se clasificaron como positivas (eritema e induración  $\geq 5$ mm.) o como negativas, también se evaluaron las medidas de los diámetros promedio.

Dos de los cuatro péptidos (identificados como 1 y 4) reproducen el efecto inhibitorio del FILM natural sobre la DAC. La apertura parcial del código muestra que estos son pentapéptidos.

En la apertura del código se observo que el péptido sintético idéntico al FILM con secuencia Met - Gln - Cys - Asn - Ser, identificado como péptido 4 reproduce el efecto inhibitorio del FILM y que el análogo sintético que difiere en un solo aminoácido con secuencia Met - Pro - Cys - Asn - Ser, identificado como péptido 1, también reproduce el efecto inhibitorio del FILM.

Los dos péptido totalmente distintos al FILM (Pro - Gln - Gln - Gln y Val - Gln - Gln - Gln) no tuvieron ninguna acción lo que demuestra que el efecto es específico.

TRIN CON  
AGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 1

## GLOSARIO

TESIS COM

EN

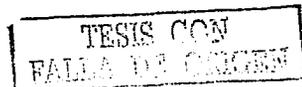
GLOSARIO.

AMIBIASIS.- Actualmente la amibiasis es ocasionada solamente por cepas de *E. histolytica* con poder patógeno. Sólo una parte de los individuos infectados desarrolla síntomas, a esta enfermedad se le conoce con el término de amibiasis invasora. Al grupo de individuos infectados asintomáticos se les considera portadores de *E. histolytica*.

AMINOÁCIDO.- Constituidos por un carbono cuaternario unido a un radical amino (NH) y a un grupo carboxilo (COOH).

AMPc.- (adenosin-mono-fosfato cíclico). Compuesto formado por acción enzimática de la adenilciclasa. La llegada de un estímulo hormonal activa la ciclasa que forma el nucleótido cíclico, que a su vez activa a la enzima fosforilasa y desempeñan importantes funciones como mensajero intracelular.

CULTIVO AXENICO.- Medio de cultivo libre de bacterias, (en oposición a medios monoxénicos que contienen bacterias u organismos vivos como uno de sus componentes).



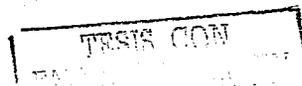
**DERMATITIS ALÉRGICA POR CONTACTO.- (DAC).** Erupción cutánea provocada por la exposición a un irritante primario o a un antígeno sensibilizante, induce memoria inmunológica en ciertos linfocitos tras la primera exposición. Ante una segunda exposición se genera una respuesta consistente en eritema (enrojecimiento) e induración (endurecimiento).

**2,4- DINITROCLOROBENCENO.- (DNCB).** Sustancia sintética, inexistente en la naturaleza, de bajo peso molecular, altamente reactiva, irritante y sensibilizante. Forma enlaces dinitrofenil-proteicos con diversas sustancias de los tejidos, induciendo respuestas tipo hapteno- acarreador.

***Entamoeba histolytica.-*** Protozoario que se encuentra frecuentemente en el intestino del hombre donde puede causar la disentería amibiana. Aunque muchos enfermos son asintomáticos, puede invadir los tejidos y producir especialmente amibiasis hepática.

**FAGOCITOS.-** Tipos de leucocitos (macrófago o monocito y micrófago o polimorfonuclear) con una capacidad de fagocitosis muy desarrollada, forma parte de la respuesta inmunitaria inespecífica o innata.

**FAGOCITOSIS.-** Proceso por el que ciertas células engloban e ingieren partículas, microorganismos y restos celulares.



FILM.- (Factor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos). Pentapéptido producido por *E. histolytica*, cepa patógena HM-1 en cultivo axénico, así como por otras amibas. Es capaz de inhibir quimiotaxis, quimiocinesis y movilidad de los monocitos humanos. (Identificada en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional siglo XXI).

HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA.- Reacción inmunitaria mediada por células con edema, eritema y un infiltrado celular que son máximos 24, 48 y 72 horas después de la provocación con el antígeno.

INFLAMACION.- Reacción protectora y restauradora del cuerpo, puede ser aguda o crónica. Sus signos son enrojecimiento (rubor), tumor (hinchazón) calor y dolor. Puede, o no, tener un componente inmunológico asociado.

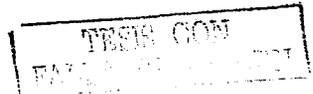
LOCOMOCION CELULAR.- Movilidad de células. La movilidad puede ser espontánea (movimiento aleatorio), movilidad aumentada pero no direccional (quimiocinesis) o movilidad aumentada y direccional (quimiotaxis). Los leucocitos y las amibas se mueven por emisión de uno o más pseudópodos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**MACRÓFAGO.-** Fagocito mononuclear que deriva de los monocitos de la médula ósea y desempeña papeles importantes en la inmunidad celular (fagocitosis, fagocitosis inmune, presentación de antígenos y producción de mensajeros inmunológicos).

**MONOCITO.-** Tipo de leucocito, sin gránulos (bajo microscopía de luz) de función principalmente fagocítica, presente en sangre. Al pasar de la sangre a los tejidos madura a macrófago

**PÉPTIDO.-** Compuesto formado por aminoácidos, cuando son pocos forman un oligopéptido que se denomina con el prefijo griego que indica su número y en consecuencia hay dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, etc. Cuando son muchos aminoácidos, constituyen las proteínas.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

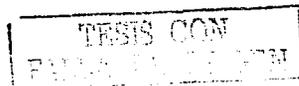
**QUIMIOCINESIS.-** Movilidad celular aumentada en intensidad pero no direccional, causada por una concentración uniforme de una sustancia atractante.

**QUIMIOLUMINISENCIA.-** Liberación de energía luminosa por una reacción química, se emplea como una forma para medir el estallido respiratorio en las células fagocíticas.

**QUIMIOTAXIS.-** Migración orientada a lo largo de un gradiente de concentración de una sustancia química. Proceso mediante el cual los fagocitos son atraídos a la vecindad de los patógenos invasores.

**SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA.- (SSI).** Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4, libre de pirógenos

**ULTRACENTRIFUGACIÓN.-** Centrifugación a alta velocidad que puede ser empleada para identificación analítica de proteínas de diversos coeficientes de sedimentación o como técnica preparatoria para separar proteínas de formas y densidades diferentes.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

**ULTRAFILTRACIÓN.-** Filtración de soluciones o de suspensiones a través de membranas de poros graduados de tamaño extremadamente pequeños ( hasta de  $0.22 \mu\text{m}$ ).

**ZIMODEMOS.-** Patrones de movilidad electroforética de isoenzimas de los parásitos.

TESIS COM  
FALL

# CAPITULO 2

## INTRODUCCION

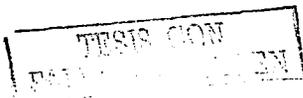


## INTRODUCCION.

### **AMIBIASIS.**

El término amibiasis incluye a todos los casos humanos de infección por *Entamoeba histolytica*. Sólo una parte de los individuos infectados tienen síntomas imputables a la penetración del parásito, a esta enfermedad se le conoce como amibiasis invasora. Al grupo de individuos infectados asintomáticos se les considera portadores de *E. histolytica*.

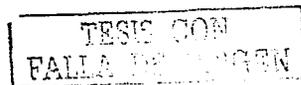
La amibiasis sintomática es una enfermedad intestinal, y cuando se vuelve extraintestinal generalmente afecta al hígado. De acuerdo con su sintomatología, la amibiasis intestinal puede producir una amplia variedad de alteraciones anatómicas. Las correspondientes a cuadros clínicos bien definidos se conocen como colitis ulcerativa amibiana, megacolon tóxico o disentería amibiana, ameboma o glanuloma amibiano, o apendicitis amibiana. La amibiasis hepática se caracteriza por la presencia de una o más áreas grandes de necrosis o "abscesos". Además, la amibiasis extraintestinal puede afectar a casi todos los órganos del cuerpo, las localizaciones distintas al intestino y al hígado son muy raras y generalmente ocurren en sujetos gravemente parasitados (8).



La infección por *E. histolytica* se considera un problema grave en la población mundial, que afecta de manera principal los países en desarrollo, entre ellos México. La mayoría de los casos corresponden a portadores sanos y solo una mínima parte presenta invasión tisular.

Las diferencias epidemiológicas [(500x10<sup>6</sup> infectados, 50x10<sup>6</sup> enfermos y solo 1x10<sup>5</sup> de estos últimos con invasión amibiana extraintestinal (hígado) (GUTIERREZ, 1997)], sugieren que la invasión extraintestinal sea un evento aleatorio bastante infrecuente o altamente selectivo, o que existieran de casos de amibiasis invasora hepática, donde esta se inicia pero no progresa gracias a la capacidad del huésped para oponerse a la invasión.

Estudios serológicos en la Ciudad de México indican que arriba del 9% de la población está infectada por *E. histolytica*. México se considera uno de los países más afectados por amibiasis invasora, especialmente por la gravedad y frecuencia de los abscesos hepáticos amibianos. Seguramente no es accidente que la cepa más virulenta jamás encontrada, la HM1-IMSS (de la que se obtuvo el FILM), haya sido aislada en este país (8).



**AMIBAS.**

Probablemente la primera descripción de las llamadas amibas, correspondió a los microorganismos que cambiaban de forma que refiere Rösel Van Rosenhof en 1755, a los que llamó "El pequeño proteo". En 1839 se crea el género *Amoeba* y diez años después se da a conocer *Entamoeba gingivalis* con el nombre de *Amoeba gingivalis*. Pero es hasta 1875 en que Aleksandriovich Losch publica el estudio "Desarrollo masivo de amibiasis en el intestino grueso", donde describe a *Amoeba coli*, que finalmente después se designa como *Entamoeba histolytica*. (10).

La *E. histolytica*, es un protozooario pequeño (10-60 $\mu$ ) y especialmente anaerobio o más precisamente microaerobio, este protozooario pequeño y frágil, sensible a ligeros cambios de temperatura, es capaz de colonizar el intestino grueso de un porcentaje considerable de la población mundial. Además, en circunstancias aún desconocidas puede invadir la mucosa intestinal y eventualmente destruir prácticamente cualquier tejido del organismo humano, desde epitelios de recubrimiento hasta órganos sólidos y huesos. Al mismo tiempo, el parásito utiliza mecanismos de evasión, uno de ellos es la producción de un factor inhibidor de locomoción de los monocitos (FILM), evadiendo con éxito las respuestas de defensa molecular y celular del huésped humano. A menos que la infección invasora sea detenida por tratamiento adecuado, el protozooario continuará su actividad destructiva hasta que el huésped muera (8).

TESIS CON  
FALLA EN EL ORIGEN

La existencia de dos especies fue sugerida por estudios mediante zimodemos, asociando ciertos zimodemos con enfermedad sintomática invasiva y otros con portadores asintomáticos.

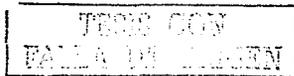
En 1997 se recomendó formalmente agrupar los zimodemos no patógenos en una nueva especie *E. dispar* reservando el término de *E. histolytica* sólo para los zimodemos patógenos.

Actualmente se acepta que existen dos especies de *Entamoeba*, indistinguibles morfológicamente, una patógena: *E. histolytica* y la otra comensal *E. dispar*. (Anexo II).

#### CICLO DE VIDA.

El ciclo vital de *E. histolytica* es sencillo ya que, a diferencia de otros protozoarios patógenos, carece de etapa sexual o de huéspedes intermediarios.

La forma vegetativa, el trofozoíto, mide de 20 $\mu$  o 60 $\mu$ , vive en la luz intestinal y se reproduce en forma binaria. El trofozoíto empieza a cambiar, pierde su forma irregular y se hace esférico al tiempo que aparece una pared quística, el cambio del trofozoíto concluye con la formación de un quiste maduro de 10 a 12 $\mu$  de diámetro con 4 núcleos (10)

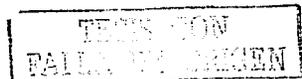


Los quistes pueden sobrevivir fuera del hospedero semanas o meses si el medio es húmedo. La pared de quitina del quiste confiere protección contra la acción destructiva de acidez gástrica.

Una vez que se ingiere el quiste maduro, este desciende al tubo digestivo, hasta el intestino, inicia el proceso de desenquistamiento. El desenquistamiento produce un metaquiste cuadrinucleado, que a través de una serie compleja de divisiones nucleares y citoplásmicas origina la formación de ocho trofozoítos mononucleares (2).

Al alcanzar el intestino grueso, estas formas móviles se nutren de bacterias y partículas alimenticias.

Algunas amibas no enquistadas son eliminadas por las heces, pero su vida exterior es efímera; muere en el ambiente y aún cuando fueran ingeridas vivas no sobrevivirán al viaje ácido por la porción superior del tubo digestivo. Otros trofozoítos sin embargo se enquistan y al salir con heces y posteriormente ser ingeridos, completan este simple pero muy exitoso ciclo vital.

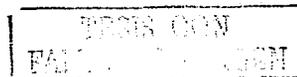


El ciclo vital de la *E. histolytica* (como el de *E. dispar*) no requiere de una etapa de invasión tisular. En la gran mayoría de los casos, las amibas viven como pacíficos comensales en el colon (amibiasis luminal). En algunos casos sin embargo, el parásito invade la mucosa intestinal (amibiasis invasora intestinal) primero adhiriéndose al epitelio a través de un ligando con carácter de lectina.

Penetran en otras capas y eventualmente algunos trofozoítos eventualmente entran al torrente circulatorio y pueden originar las formas invasoras extraintestinales de la amibiasis, en primer término al absceso del hígado, al que llega por la vena porta (2).

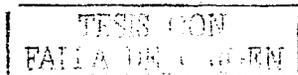
#### RESPUESTA INMUNE GENERAL.

El sistema inmunológico, tal y como se concibe actualmente, es un sistema complejo que incluye la participación de multitud de células y factores solubles, que interaccionan entre ellos para conformar un sentido biológico defensivo. En general, y de manera simple, la respuesta biológica defensiva frente a la agresión reúne tres componentes: **inflamación, inmunidad natural, e inmunidad específica**. Las dos primeras forman parte de lo que es calificado como **Inmunidad innata** (inespecífica); la última forma parte de la **Inmunidad adaptativa** (específica).



La Inmunidad innata se caracteriza por la ausencia de reconocimiento específico de un antígeno dado. En estas respuestas están implicadas las células encargadas de eliminar a los agentes agresores sin necesidad de reconocimiento específico del antígeno agresor. Estas células han nacido con el aprendizaje adecuado para distinguir lo propio de lo extraño sin necesidad de mecanismos complejos de reconocimiento, y con la ausencia de memoria posterior para el mismo antígeno dado. El sistema monocito-macrófago y toda la serie de polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), junto a un tipo especial de linfocitos denominados NK (natural Killer; asesinas naturales) son los elementos estructurales de esta respuesta innata.

En la respuesta adaptativa o específica, se encuentran implicados los **linfocitos T y B**. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B (respuesta inmune humoral) reconocen los antígenos extracelulares, mientras que las células T (respuesta inmune celular) solo puede reconocer fragmentos antigénicos que les sean presentados en asociación con moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad.



## ENCUENTRO DE LA *E. histolytica* CON EL SER HUMANO Y SU SISTEMA INMUNOLÓGICO.

Una vez invadida la mucosa aparecen respuestas inmunes celulares y humorales bien definidas. Estas pueden inicialmente comprender exclusivamente las células inflamatorias que se acumulan en el sitio de la invasión, sobre todo aquellas que se encuentran en los bordes de las úlceras amebianas, donde ocurrirá el primer contacto real entre antígenos amebianos y las células de la red inmunológica.

La ameba que llega al torrente circulatorio se enfrenta con el sistema del complemento, activándolo ya sea a través de inmunoglobulinas específicas preformadas o a través de la vía alterna, en ausencia de anticuerpos (15). El viaje por el torrente sanguíneo seguramente es de corta duración, ya que las amebas pronto quedarán atrapadas de alguna manera en los sinusoides hepáticos. Aquí convergerán las respuestas celulares, humorales, el complemento y la coagulación.

Sigue siendo tema de especulación hasta que punto constituye un requisito esencial la existencia de estado de inmunosupresión para que sobreviva la ameba en el huésped. Algunos autores han llegado a señalar que la invasión del hígado por la ameba debe ser precedida y acompañada de algún grado de inmunosupresión (14).

TESIS CON  
FALLA DE CUBRAN

El resultado de la interacción de las amibas luminales o las invasoras con los elementos efectores de la respuesta inmune (anticuerpos secretores y circulantes, complemento, linfocitos citotóxicos, linfoquinas y leucocitos efectores) dependerá de los poderes destructivos de estos elementos y de la eficiencia de los mecanismos de evasión que logren desarrollar las amibas.

#### RESPUESTAS INMUNE HUMORAL Y CELULAR EN AMIBIASIS.

##### RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

*In vitro* los anticuerpos tienen efectos sobre el parásito, el cual a su vez posee mecanismos para evadirlos y además emerger del proceso, al menos temporalmente, en estado de susceptibilidad disminuida a la ulterior acción de anticuerpos.

Se carece de una idea clara sobre los efectos que ejercen los anticuerpos sistémicos *in vivo*, ya que son escasos los experimentos de inmunización pasiva realizados hasta la fecha. Aunque la reputación protectora de los anticuerpos humorales en otras enfermedades infecciosas, es clara, especialmente virales y bacterianas, no se considera una barrera infalible en la amibiasis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Lo que está más allá de toda duda es el indiscutible valor colateral de los anticuerpos en el serodiagnóstico y la seroepidemiología de la amibiasis.

El primero, desde luego, conlleva algún valor adaptativo en el estudio más amplio de la palabra, ya que un diagnóstico más temprano y preciso conduce a un mejor tratamiento y, por ende, a mejores probabilidades de sobrevida.

No se posee por el momento suficiente información sobre la importancia de la respuesta inmune secretora contra la *E. histolytica* como para aventurar a pronunciamientos definitivos. Parece sin embargo, que los anticuerpos secretores IgA y posiblemente IgE podrían poseer una función protectora, aunque transitoria (24).

#### RESPUESTA INMUNE CELULAR.

El proceso de penetración intestinal de las amibas o de difusión de antígenos amibianos subcelulares, que juegan un papel tan importante en el establecimiento de respuestas humorales locales, podrían tener un papel similar en el establecimiento de las respuestas inmunes celulares locales contra la *E. histolytica*. Las amibas se encuentran en la periferia de las úlceras intestinales donde podrían establecer contacto con células funcionales de la red celular inmunológica (17).

TESIS CON  
FALLA DE CUBRIR

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

La incidencia relativamente alta de hipersensibilidad retardada documentada en sujetos sanos (20%) y en pacientes con colitis amibiana (47.1%) en áreas en las que la amibiasis es endémica (22) sugiere que existe, igualmente, inmunidad celular local.

La evidencia a favor de la existencia de respuestas inmunes celulares sistémicas en la amibiasis, si bien no tan abundante como en el caso de la inmunidad humoral, es suficiente para aceptar su existencia en forma indiscutible (32).

#### COMPLEMENTO.

El sistema del complemento es una serie de enzimas plasmáticas, proteínas reguladoras y proteínas capaces de lisar células, que actúan en cascada y cuyo principal lugar de síntesis es el hígado. El sistema del complemento tiene dos componentes, la activación de la vía clásica, a través de C1, C4 y C2 y la activación de la vía alternativa, a través del factor D, C3 y el factor B, conducen a la escisión y activación de C3 (6).

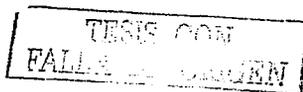
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La *E.histolytica* es capaz de activar el sistema del complemento. Este efecto se debe a la activación de la vía alterna del sistema del complemento. En presencia de anticuerpos también se activa la vía clásica, lo que conduce a la rápida muerte del trofozoito y a la inhibición del crecimiento amibiano *in vitro* (25).

La activación del complemento por cualquiera de la dos vías genera factores solubles que amplifican y modulan el proceso inflamatorio.

Las amibas capaces de evitar la activación del complemento por la vía alterna son también capaces de invadir el intestino, llegar al torrente sanguíneo y asentarse en los sitios extraintestinales, mientras que las cepas amibianas que activan el complemento por la vía alterna se verían frustradas muy temprano en sus intentos invasores (19-23).

El sistema del complemento es crucial en la resistencia del huésped a muchas infecciones, incluyendo algunas por protozoarios, Pero sobre todo en las de diseminación sanguínea (p. ej. Paludismo) y es concebible que el complemento tenga un papel limitante en la diseminación.



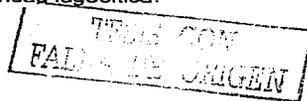
Así, el sistema del complemento podría ser un obstáculo importante para la diseminación de la *E. histolytica* por la vía sanguínea; un obstáculo para el cual, por otra parte, algunas amibas han desarrollado en forma selectiva mecanismos eficaces de evasión. Esta habilidad ventajosa de la amiba se perdería cuando el huésped adquiere anticuerpos específicos que permiten la activación del complemento por la vía clásica.

La resistencia del huésped a las enfermedades parasitarias puede ser no sólo de índole inmunológica.

#### **MECANISMOS DE EVASION DE LA *E. histolytica*.**

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune inflamatoria por parte de la *E. histolytica* deben ser extensos, ya que han conducido a una relación huésped - parásito normalmente balanceada.

La *E. histolytica* podría evadir los elementos tardíos del proceso inflamatorio mediante la producción de sustancias anti-inflamatorias, en particular aquellas capaces de inhibir la locomoción de las células mononucleares (FILM) y así mantener a distancia estos elementos celulares. Esto, en su momento, podría permitirle a la amiba permanecer inalterada en los tejidos. Finalmente, cuando ocurre la confrontación de los fagocitos PMN y las amibas, éstas parecen emerger esencialmente victoriosas, como resultado de su superioridad fagocítica.



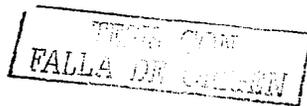
Se ha sugerido que la variación antigénica puede lograr que los anticuerpos ya adquiridos resulten irrelevantes, y que los cambios en el repertorio antigénico de la *E. histolytica* hacia antígenos "bloqueadores" pudieran ser la base del paso de comensalismo a virulencia.

Las amibas pueden, además, inducir un estado de supresión de la inmunidad celular que permitirá la invasión tisular (8).

No se sabe si todos estos mecanismos operan in vivo. Sin embargo las observaciones clínicas y epidemiológicas, sugieren que algunos de estos mecanismos de evasión, podrían estar operando en la amibiasis clínica.

#### EL FILM.

La amibiasis invasora se asocia con una escasa respuesta inflamatoria tardía y, quizás en consecuencia, con un proceso cicatricial particularmente débil, lo que permite una regeneración perfecta del órgano afectado, si el tratamiento es exitoso. Los monocitos constituyen el elemento celular que vincula funcionalmente ambos procesos (inflamación y cicatrización).



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

La *E. histolytica* cultivada en medio axénico produce un factor soluble, termoestable y de bajo peso molecular que inhibe importantes funciones leucocitarias, el factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM): Su efecto es particularmente manifiesto sobre los macrófagos que son los fagocitos, predominantes en la fase tardía de la inflamación. El FILM inhibe en estos fagocitos, pero no en los polimorfonucleares (PMN), la locomoción celular, y aumenta los microtúbulos pericentriolares.

El FILM abate igualmente la explosión respiratoria asociada a la fagocitosis y aumenta selectivamente el AMPc. Estos últimos dos efectos son sin embargo demostrables tanto en fagocitos mononucleares como en PMN.

La importancia y la magnitud de las alteraciones inducidas por el FILM en las funciones de los fagocitos *in vitro*, obligan a estudiar una posible traducción *in vivo* de las mismas.

TRABAJOS CON  
PALMARES DE ORIGEN

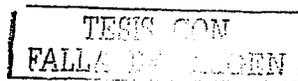
**HIPERSENSIBILIDAD.**

Las reacciones inflamatorias con participación de leucocitos mononucleares y no sólo por anticuerpos se han denominado *reacciones de hipersensibilidad retardada*.

El término *retardada* se ha utilizado para distinguir la respuesta celular secundaria que aparece 48 a 72 horas después de la exposición al antígeno de la respuesta de *inmediata* que se observa generalmente en las 12 horas siguientes a la provocación con el antígeno y que se inicia por la liberación de mediadores de los basófilos o los anticuerpos preformados.

Los acontecimientos celulares que dan lugar a la clásica respuesta de hipersensibilidad retardada se centra alrededor de las células T (predominantemente células T colaboradoras del tipo TH1 que secretan IFN $\gamma$ , IL-2 y TNFB) y los macrófagos.

En primer lugar, las respuestas inmunitarias e inflamatorias locales en el lugar del antígeno extraño aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, promoviendo la acumulación de linfocitos en el tejido.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 3

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La amibiasis por *E.histolytica* es un problema mundial grave. El parasito infecta a 500 millones de personas por año, provocando entre 50 mil a 100 mil muertes (36).

*E.histolytica* utiliza mecanismos de evasión, uno de ellos es la producción de un factor soluble, termoestable y de bajo peso molecular que inhibe importantes funciones leucocitarias al que se denominó factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM)

El FILM produce importantes efectos sobre los monocitos humanos *in vitro* la inhibición de la quimiotaxis el abatimiento de la explosión respiratoria, la modificación de los nucleótidos cíclicos y del citoesqueleto (20-25). Esto permite suponer efectos relevantes al FILM sobre la respuesta inflamatoria *in vivo*. La inhibición de todas estas funciones de los macrofagos deberían reflejarse en la reducción de la inflamación tardía que está dominada por estas células.

Para determinar la posible relevancia del FILM en la patogenia de la amibiasis y en la evolución de la respuesta inflamatoria a la misma, es necesario el estudio *in vivo*. Conviene por ello disponer de un modelo animal, en el que se pueda inducir



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

focos inflamatorios con un componente tardío claramente identificable. La hipersensibilidad por contacto a antígenos sintéticos como el dinitroclorobenceno (DNCEB) en cobayos (16), es un modelo sencillo y poco traumático para evaluar la inflamación tardía. (33).

Por otra parte el FILM a sido purificado y secuenciado lo que ha permitido su síntesis. Si el proceso ha sido correcto puede postularse que el análogo sintético idéntico al FILM reproducirá sus efectos, mientras que péptidos distintos no lo harán.

Disponer del FILM sintético aporta grandes ventajas (control preciso de dosis, exclusión de otros factores en el medio axénico de cultivo, etc.) Pero primero es necesario verificar su capacidad de sustituir al FILM natural.

TESIS CON  
FALLA EN ORIGEN

# CAPITULO 4

# HIPOTESIS

TESIS CON  
FALLA EN LA  
CUBIERTA

**HIPOTESIS GENERAL.**

- Los efectos del FILM natural serán reproducidos por su análogo sintético idéntico. Péptidos no relacionados no reproducirán los efectos del FILM.

**HIPOTESIS PARTICULAR.**

- Un péptido sintético idéntico al FILM reproducirá los efectos de este sobre la DAC al DNCB en los cobayos.

**HIPOTESIS NULAS.**

- Los efectos del FILM natural no serán reproducidos por su análogo sintético.
- Los efectos del FILM natural serán reproducidos aún por péptidos sintéticos no relacionados.

TESIS CON  
FALLA EN EL EXAMEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 5

# OBJETIVOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

**OBJETIVOS GENERALES DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN.**

- Estudiar los mecanismos anti-inflamatorios de *E.histolytica*
- Estudiar los efectos anti-inflamatorios del FILM.

**OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS.**

- Reproducir el efecto del FILM por medio de péptidos sintéticos

**OBJETIVO ESPECIFICO.**

- Reproducir los efectos del FILM sobre la DAC por medio de cuatro péptidos sintéticos con secuencia de aminoácidos idénticas, similares o distintas al FILM. (en un estudio en ciego).

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 6

# MATERIAL

TESIS COM  
PALMIRI  
FIN

**MATERIAL****REACTIVOS.**

- DNCB ( 1- cloro- 2, 4 – Dinitrobenzene ) (Sigma Chemical Co. USA)
- Péptidos (American Peptide comp.)
- FILM natural (Donados por la Dra. Inge Becker Hospital General de México .SSA )
- SSI. (Solución salina isotónica amortiguada de fosfatos, libre de pirógenos).
- Crema depiladora- (Preparada en Farmacia los Angeles )

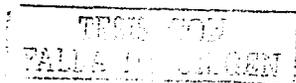
TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

**MATERIAL DE TRABAJO.**

- Filtros (Whatman # 2 W & R Balston Limited Inglaterra)
- Centriprep 3 y 10 (Tubos concentradores Amicon Inc. USA )
- Micropore
- Jeringas (1ml)
- Agujas
- Gasas
- Criotubos (Corning 1.8ml)



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

**APARATOS.**

- Balanza analítica
- Inmovilizadores (diseñados por ingeniería biomédica IMSS)
- Rasuradora eléctrica
- Pipeta semiautomática (10  $\mu$ l).
- Ultracongelador

TRABAJOS COM  
PARRA DE INGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

### **ANIMALES**

- Cobayos machos cepa Harley - 300 gr. peso --(Bioterio Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS).

### **SEGURIDAD PERSONAL**

- Bata
- Cubre boca
- Guantes (el DNCB provoca también sensibilización en la piel humana).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 7

## METODO

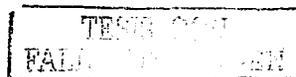
TESIS CON  
FALLA DE CALDEN

**METODO.****LUGAR.**

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, del Hospital de Pediatría, y en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social en México, D. F.

**DISEÑO.**

Estudio experimental abierto, prospectivo, longitudinal comparativo y con registro en forma estandarizada de sus efectos. Realizado en ciego hasta el final del proyecto.



**CRITERIOS DE INCLUSION/EXCLUSION.**

Se consideraron como criterios de eliminación; la falta de sensibilización al DNCB o presencia de enfermedad concurrente que pudiera anergizar al cobayo. (Fig. 1).



Fig.1 Cobayo desnutrido con deficiencia en crecimiento corporal y reducción de movilidad e inmunidad debido principalmente a la falta de vitamina comparado con un cobayo bien nutrido de la misma camada. Ambos fueron rasurados 15 días antes

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Se utilizaron 120 animales, que incluían testigos negativos, positivos, FILM y péptidos, cada concentración de cada péptido fue aplicada en tres lotes de cuatro animales (12 animales por grupo experimental). Cuando el tamaño del animal lo permitió se aplicaron dosis de dos péptidos junto con los testigos negativos y positivos. (Fig. 7) simultáneamente.

### **PREPARACION DE ANIMALES.**

Se utilizaron cobayos macho, albinos de tipo Harley (cavia aperea) de pelo corto de más de 300 gr. de peso. (Figura 2). Los animales se identificaron mediante circulación auricular (Anexo II). El dorso del animal se rasuró con rasuradora eléctrica y se depiló con crema depiladora durante 15 minutos, retirada totalmente mediante lavado suave con gasa húmeda para evitar cortes epidérmicos que cambiaría la vía de epicutánea a intradérmica. No se observaron reacciones al depilador (Fig. 3).

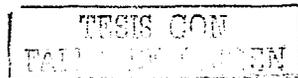




Fig. 2 Cobayo macho albino tipo Harley (*Cavia aperea*) pelo corto de más de 300gr. de peso

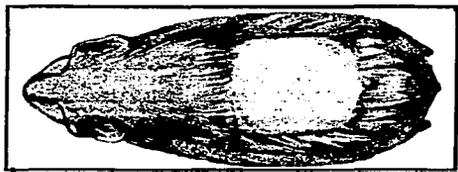


Fig. 3 Dorso del cobayo rasurado y depilado

**PREPARACION DE REACTIVOS.****DINITROCLOROBENZENO (DNCB).**

- Dosis vesicante: 10mg/ml de DNCB en acetona/aceite de oliva 4:1
- Dosis reto: 0.05 mg/ml de DNCB en acetona/aceite de oliva 4:1 ( 200 veces menor a la dosis vesicante).

**PÉPTIDOS.**

Se hicieron diluciones progresivas 1:10 de cada péptido en SSI libre de pirógenos para obtener las dosis de 1000, 100, 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$  que se designaron con un número de código. Para el péptido 4 se hicieron diluciones adicionales de 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu\text{g/ml}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

### FILM.

El FILM se obtiene de cultivos axénicos de *E. histolytica* cepa patógena HM-1 de 72 horas ( en fase de crecimiento logarítmico) conteniendo  $1 \times 10^5$  amibas/ml. El sobrenadante se obtiene por centrifugación, decantación y filtración, para este estudio se semipurificó por ultracentrifugación (centrirep 10 000 y 3000 da) el FILM se encuentra en la fracción menor de 3000 da.

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DEL FILM.

La determinación de la concentración del FILM en la muestra aplicada se hizo mediante el método de Lowry se hicieron determinaciones por duplicado de dos alícuotas de dos lotes del FILM. Se encontró una concentración de 7.75  $\mu\text{g/ml}$  ( $\pm 2.03$ ) de proteína.

TRABO CON  
FALLA DE ORIGEN

## SENSIBILIZACION

24 horas después de la preparación de los animales se sensibilizaron al DNCB, mediante la aplicación de 0.05ml de la dosis vesicante (10 mg/ml de DNCB en acetona/aceite de oliva 4:1) impregnado a un disco de papel filtro tipo Whatman del número 2 con un diámetro de 5mm adherido a un parche epicutáneo ( curita transparente) fijado al dorso del animal y afianzado con bandas circulares de Micropore. (Fig. 4). Posteriormente los animales se colocaron en inmovilizadores 24 horas para evitar el desprendimiento del parche (Fig. 5).

La sensibilización exitosa se manifestó cuando los animales presentaron vesiculación además de eritema e induración a las 48 horas (fig. 6).



Fig. 4 Cobayo con parche epicutáneo  
Afianzado con bandas micropore

TRABAJOS  
FALLA DE CALIDAD



Fig. 5 Inmovilizador, diseño para limitar la movilidad del cobayo.  
Cuenta con adaptadores para suministro de agua.



Fig. 6 Cobayo sensibilizado, presencia de eritema e induración a las 48 hrs. Se observa pigmentación amarilla debido a la concentración de DNCB. (El estímulo irritativo induce el crecimiento acelerado del pelo).

**RETO.**

Quince días después de la sensibilización, los animales se retaron con 0.05 ml de la dosis reto de DNCB (0.05 mg/ml) aplicadas con el mismo esquema, en zonas en las que simultáneamente se aplicó en ciego intradérmicamente 0.05ml de una de las cuatro concentraciones (1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) de cada uno de los péptidos. En otras zonas del dorso se aplicó solución amortiguadora de fosfatos pH. 7.4 (SSI) como testigo positivo, cuando el tamaño del animal lo permitió se utilizó FILM natural como testigo inhibido. (Fig. 7).

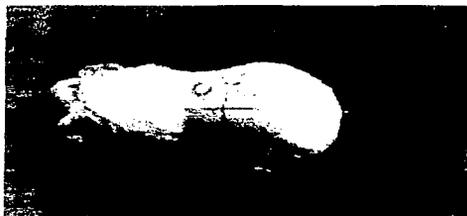
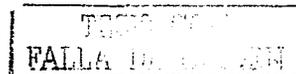


Fig.7. Cobayo con cuatro zonas experimentales

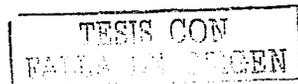


**INTERPRETACION.**

Las observaciones se realizaron en ciego primero por dos observadores independientes y luego en común para evitar la introducción de posibles sesgos de observador. Los resultados se expresaron como porcentajes de respuestas positivas y como diámetro promedio. Se consideró una respuesta positiva a la presencia de eritema e induración mayores a 5mm de diámetro (límite más frecuente utilizado para definir la positividad), el diámetro promedio se calculó como media entre el diámetro mayor y el diámetro perpendicular a este expresado en milímetros. se realizaron lecturas de 24, 48 y ocasionalmente a las 72 horas.

La lectura principal fue a las 48 horas cuando las respuestas alcanzan su máximo y es a ese tiempo que corresponden los resultados que se presentan.

Aunque el criterio para decidir positividad fue la extensión de la respuesta también se califico por su intensidad según la escala anexa.



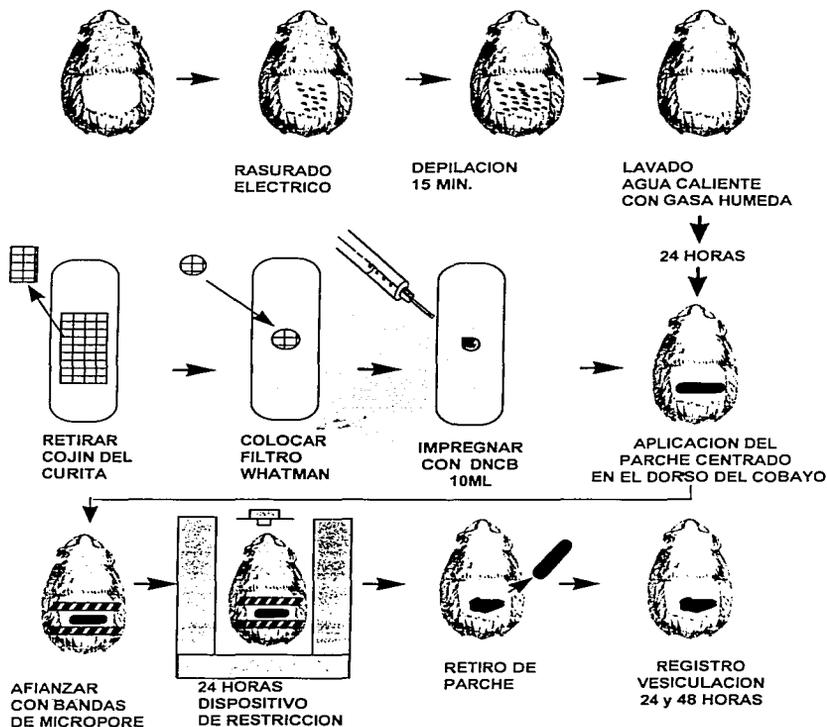
LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

REACCION	INTERPRETACION	COMENTARIOS
Ausente	Negativa	Piel normal
Muy Leve	Negativa	Cambio muy ligero, no detectado en forma consistente por los observadores.
Leve	Positiva	Cambio ligero pero detectado en forma consistente por los observadores.
Moderado	Positiva	Enrojecimiento visible a un metro de distancia.
Intenso	Positiva	Enrojecimiento intenso microvesiculación visible.

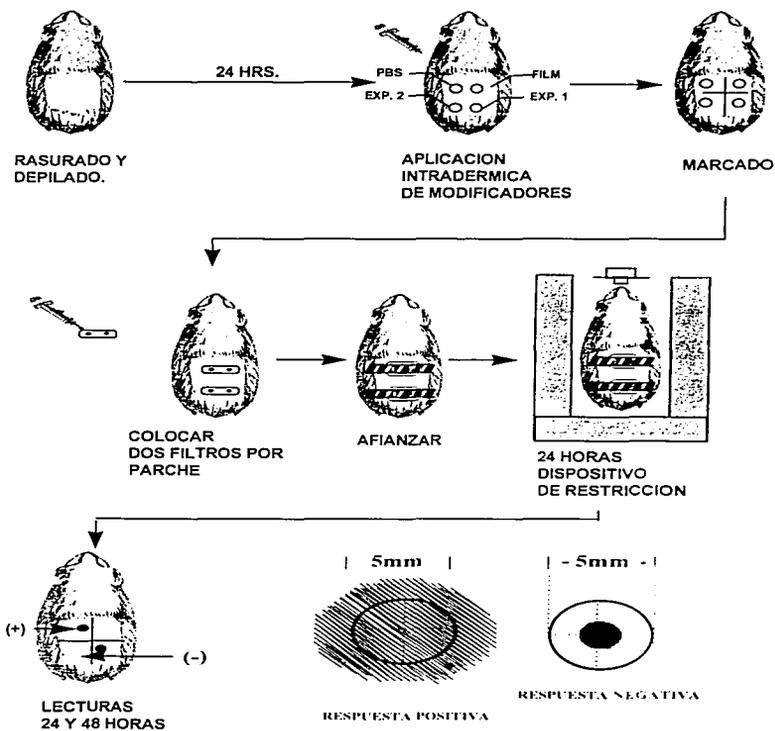
TESTS CON  
VALOR POSITIVO

## SENSIBILIZACION



TEMA CON  
 FALTA DE ORIGEN

# RETO



TESIS CON  
FALLA EN EL PROCESO

# CAPITULO 8

## RESULTADOS

TESIS CON  
FACULTAD DE CIENCIAS

## RESULTADOS

En las figuras 8 y 9 se observan reacciones epidérmicas al DNCB en presencia de modificadores (péptidos sintéticos, FILM, SSI.).

Las lecturas tomadas de cada péptido sintético en sus cuatro dosis (1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) y microdosis del péptido 4, fueron recopiladas en un formato especial que permitió la individualización e identificación de cada medición experimental.

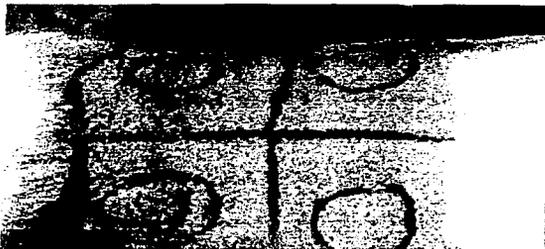


Fig. 8

Reacciones epidermicas. 48 horas después de la aplicación de DNCB (reto) en zona con modificadores  
 Zona izquierda inferior : eritema intenso  
 Zona izquierda superior : eritema moderado  
 Zona derecha inferior : ausencia de eritema  
 Zona derechosuperior : eritema leve



Fig. 9

Respuesta positiva, presencia de eritema e induración a las 48 hrs.  
 (zona derecha)

Respuesta negativa, ausencia de eritema e induración a las 48 hrs.  
 (zona izquierda)

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### RESULTADOS POR GRUPO EXPERIMENTAL.

La aplicación de la dosis de reto de DNCB sobre SSI produjo una respuesta positiva en 100% de los casos son un diámetro promedio de 11.6 mm ( $\pm 0.530$ ), muy por encima del umbral de los 5 mm. (Fig. 10 y 11).

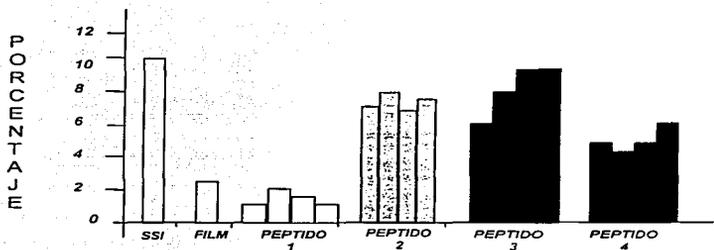


Fig. 10. Efectos del FILM de la amiba y de las cuatro dosis de los cuatro péptidos sintéticos en la DAC al DNCB en los cobayos. Porcentaje de respuestas positivas observados a las 48 horas. La primera columna corresponde al testigo positivo (DNCB/SSI). La segunda columna representa la inhibición condicionada por el FILM natural (control negativo DNCB/FILM) y las siguientes representan los resultados con las dosis 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  de los péptidos sintéticos 1 a 4 respectivamente.

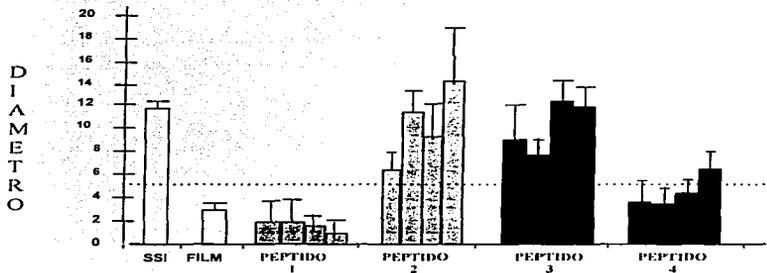


Fig. 11 Efectos del FILM de la amiba y de las cuatro dosis de los cuatro péptidos sintéticos en la DAC al DNCB en los cobayos. Diámetro promedio a las 48 horas. La primera columna corresponde al testigo positivo (DNCB/SSI). La segunda columna representa la inhibición condicionada por el FILM natural (control negativo DNCB/FILM) y las siguientes representan los resultados con las dosis 1, 10, 100 y 1000 $\mu$ g/ml de los péptidos sintéticos 1 a 4 respectivamente.

En presencia del FILM intradérmico las respuestas positivas se redujeron al 20% y el diámetro promedio a 3 ( $\pm$  0.775) mm, con una significancia de  $p > 0.000\ 0001$  (Xi cuadrada) y  $p < 0.000\ 05$  (t de student) respectivamente, comparando con el testigo positivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS POR PEPTIDOS SINTETICOS

El análisis de los valores de los péptidos sintéticos en sus cuatro dosis y en relación con los testigos positivo y negativo mostró que:

Las cuatro dosis del **péptido sintético 1** inhiben significativamente respecto al testigo positivo en ambas formas de evaluación. La positividad de la respuesta se inhibe dependiendo de la dosis en 80-91% (actividad residual del 9-20%) ( $p < 0.0000001$ ). El diámetro promedio se reduce a entre 2.1 y 1.36 mm (dependiendo de la dosis) y  $p < 0.00005$ . Al comparar con el FILM, ninguna de las cuatro dosis (en ambas formas de evaluación), se separó significativamente del FILM. (Fig. 10 y 11).

Los **péptidos sintéticos 2 y 3** no impiden las respuestas positivas al DNCB y resultaron comparables al testigo positivo ( $p > 0.05$ , en ambas evaluaciones), demostrando la carencia de actividad inhibitoria de estos péptidos. Se observó a alguna respuesta negativa sólo en forma ocasional.

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

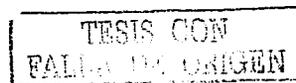
El Péptido sintético 4 presenta una inhibición hasta de un 55% (o una actividad residual del 45%), y reduce el diámetro promedio a 3.7 ( $\pm$  1.22) mm (Fig. 10 y 11).

En la dosis óptima (10  $\mu$ g/ml) difiere del testigo positivo  $p < 0.000\ 000\ 1$  y  $p < 0.000\ 05$  respectivamente y no difirió significativamente del FILM.

Las dosis de 1 y 100  $\mu$ g/ml difirieron del testigo positivo ( $p < 0.02$ ) y no del FILM. La dosis de 1000 fue intermedia y difiere tanto del testigo positivo como del FILM.

Por esto se decidió ampliar el rango de dosis estudiado del péptido 4. No se aplicaron concentraciones de 10 000  $\mu$ g/ml o mayores por limitantes técnicas, particularmente por cambios en la densidad, características de la solución a inyectar y por significar un consumo de material demasiado alto respecto a la cantidad disponible (limitada por los costos).

En cambio se evaluaron dosis menores (0.001, 0.01 y 0.1  $\mu$ g/ml). En este rango al diluir el péptido se perdía el efecto inhibitorio. Para el péptido 4 se obtuvo una curva dosis respuesta aparentemente en "U" (que será analizada en la discusión) (Fig. 12).



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

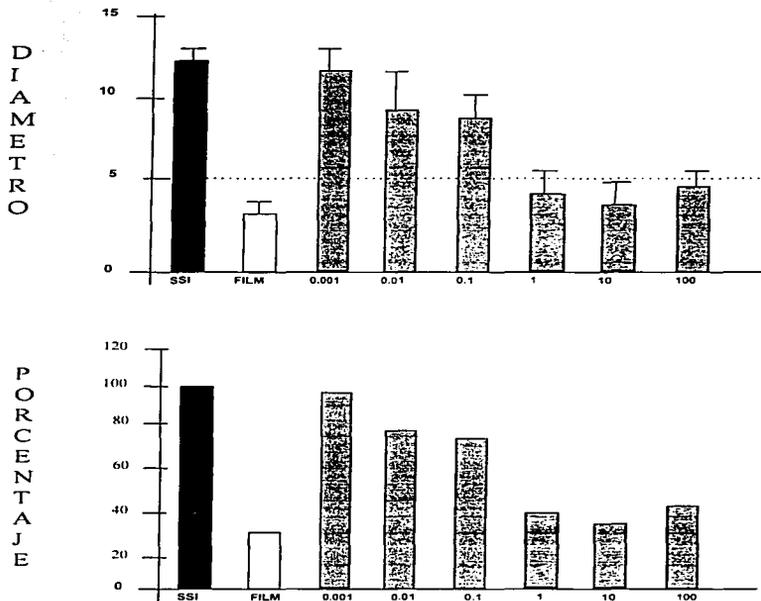


Figura 12. Inhibición de la DAC al DNCB por el péptido 4. Porcentaje de respuestas positivas y diámetro promedio en la curva dosis respuesta ampliada. Las primeras dos columnas representan el DNCB/SSI (testigo positivo) y la inhibición con el FILM natural DNCB/FILM (testigo negativo).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

## RESULTADOS ESTADÍSTICO.

		PEPTIDO 1					
		PBS	FILM	1	10	100	1000
PBS FILM			P< 0.00005				
	←			N.SIG	N.SIG	P<0.00005	N.SIG

		PEPTIDO 2					
		PBS	FILM	1	10	100	1000
PBS FILM			P<0.00005	P<0.02	N.SIG	N.SIG	N.SIG
	←			N.SIG	P<0.0002	P<0.005	P> 0.00005

Tabla. 1. Valores de probabilidad ("P") para los péptidos 1 y 2 en diámetro promedio ("t" Student)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

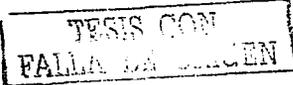
**PEPTIDO 3**

	PBS	FILM	1	10	100	1000
PBS		P < 0.00005	N.SIG	N.SIG	N.SIG	N.SIG
FILM	←		P < 0.00005	P < 0,02	P < 0.00005	P > 0.00005

**PEPTIDO 4**

	PBS	FILM	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000
PBS		P < 0.00005	N.SIG	N.SIG	N.SIG	P < 0.0002	P < 0.00005	P < 0.001	N.SIG
FILM	←		N.SIG	P < 0.005	P < 0.001	N.SIG	N.SIG	N.SIG	N.SIG

Tabla 2. Valores de "P" para los péptidos 3 y 4 en diámetro promedio ("t" student ).



		PEPTIDO 1					
		PBS	FILM	1	10	100	1000
PBS FILM	PBS		P<0.000 0001				
	FILM	←		N.SIG	N.SIG	N.SIG	N.SIG

		PEPTIDO 2					
		PBS	FILM	1	10	100	1000
PBS FILM	PBS		P<0.000 0001	P=0.000335	P=0.006459	P=0,000335	P=0.00053
	FILM	←		P=0.002690	P=0.000130	P=0.00269	P=0.00037

Tabla 3. Valores de "P" para los péptidos 1 y 2 en porcentaje de respuestas positivas ("F" Fischer, "Xi").

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

**PEPTIDO 3**

	PBS	FILM	1	10	100	1000	
PBS			P=0.000 000 1	P=0.000028	P=0.006459	P=0.0769	P=0.0769
FILM	←		P<0.005628	P=0.000135	P=0.000032	P=0.00032	

**PEPTIDO 4**

	PBS	FILM	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000
PBS		P<0.000 0001	N.SIG	N.SIG	N.SIG	N.SIG	P<0.000 001	P<0.000 001	P<0 000 001
FILM	←		N.SIG	P<0.00013	P<0.0001	P=0,0056	N.SIG	N.SIG	N.SIG

Tabla 4. Valores de "P" para los péptidos 3 y 4 en porcentaje de respuestas positivas ("F" Fischer, "Xi").

TESIS CON  
FALLAS DE CALIFICACIÓN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM.

---

# CAPITULO 9

# DISCUSION

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### DISCUSION.

Los resultados, expresados en la forma más general, indican que dos péptidos sintéticos, los identificados como 1 y 4 son capaces de inhibir la DAC a un nivel comparable al del FILM, y que otros dos péptidos sintéticos, los identificados como 2 y 3 carecen de ese efecto.

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias al comparar, los péptidos 1 y 4 entre sí y con el FILM. Las ligeras diferencias en la actividad inhibitoria, distan bastante de ser significativas, por lo que, las muestras del FILM natural y de estos péptidos deben ser consideradas equivalentes o "no diferentes" (aunque no necesariamente idénticas). De acuerdo al principio estadístico de que "fallar en demostrar diferencia" no implica necesariamente "demostrar igualdad".

Sin olvidar lo anterior puede señalarse que el péptido 1 inhibe claramente en todas sus dosis, a niveles comparables sin diferir significativamente entre si. La curva dosis respuesta, no es típica pues en el rango de dosis estudiado, el efecto inhibitorio, esta presente y es ya intenso desde la dosis menor.

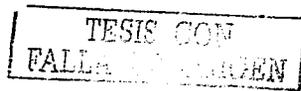
El péptido 4 mostró mayor variación entre sus distintas dosis, estas diferencias no fueron significativas, excepto para la dosis de 1000 µg/ml que tuvo sorprendentemente un efecto significativamente menor al de las dosis más pequeñas y al FILM.

TESIS CON  
FALLA EN EL ENLACE

Por esto se realizó un análisis mas extenso, se probaron diluciones de 0.1 a 0.001  $\mu\text{g/ml}$  de lo cual, resultó que al diluir el péptido se pierde su efecto inhibitor obteniendo una curva dosis respuesta, lo que permite situar la dosis inhibitoria 50, entre 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , donde el efecto inhibitorio máximo ocurría con la dosis de 10  $\mu\text{g/ml}$ , - notablemente cercana a la concentración de 7.75  $\mu\text{g/ml}$ , determinada para el FILM en las preparaciones usadas en este estudio - . No hay aun una explicación definitiva sobre la perdida del efecto inhibitorio con la dosis mayor. Podría deberse a la aparición de un segundo efecto de sentido contrario (pro-inflamatorio), quizá por el volumen, o a un efecto de saturación, sin excluir una variación aleatoria debida al número necesariamente reducido de animales experimentales.

#### DOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS REPRODUCEN EL EFECTO DEL FILM.

La deducción experimental de cual de los péptidos sintéticos correspondía al FILM hubiera sido casi automática si un péptido hubiera inhibido y los otros tres no, caso en el cual, el primero sería el FILM y los otros tres serían péptidos testigo distintos. Sin embargo los resultados experimentales, a pesar de diferencias pequeñas no significativas, indican que, no sólo uno, sino dos péptidos reprodujeron el efecto del FILM.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

Esto abre varias posibilidades:

- a) Son muy distintos pero el efecto inhibitorio es "inespecífico"
- b) Los dos lotes de muestra, corresponden a una duplicación del mismo péptido sintético
- c) Los dos son distintos pero con suficiente semejanza al FILM
- d) Uno es el FILM sintético y el otro un péptido muy parecido

#### **CODIGO DE SECUENCIA.**

#### **APERTURA PARCIAL DEL CODIGO**

Sin abrir el código sólo es posible concluir que ciertos péptidos sintéticos son capaces de inhibir la DAC en forma comparable al FILM de *E.h.*

Por recomendación del jefe de la unidad (Dr. Roberto Kretschmer) se decidió mantener confidencial la secuencia exacta y realizar sólo una apertura parcial, durante el proceso de este estudio.

Esta apertura permitió saber que los péptidos inhibidores 1 y 4 no son idénticos, ya que difieren entre sí en un sólo aminoácido. Al igual que el FILM, son pentapéptidos y uno de ellos, sin especificar cual, es idéntico al FILM.

TIENE ORIGIN  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

Por otro lado los péptidos 2 y 3, carentes de efecto resultaron ser tetrapéptidos y completamente distintos al FILM.

Los experimentos realizados *in vivo* confirman la capacidad del FILM natural de inhibir la DAC en cobayos. El que dos de los pentapéptidos sintéticos, reproduzcan el efecto del FILM natural, proporciona confirmación adicional del efecto.

#### APERTURA DEL CODIGO

Al abrir el código es posible concluir que el péptido sintético idéntico al FILM (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) identificado como péptido 4 reproduce el efecto inhibitorio del FILM y que el pentapéptido que difiere en un solo aminoácido (Met-Pro-Cys-Asn-Ser) identificado como péptido 1 también reproducen el efecto inhibitorio del FILM.

Por otro lado los tetrapéptidos (Pro-Gln-Gln-Gln y Val-Gln-Gln-Gln) no tiene efecto inhibitorio.

TRABAJO COMPLETADO  
FALLA DE ORIGEN

**MIMETISMO MOLECULAR.**

Los péptidos 1 y 4 tienen el mismo número de aminoácidos (cinco) y comparten entre sí cuatro de cinco aminoácidos en las mismas posiciones.

La igualdad en el número de aminoácidos y su gran homología (80%), puede explicar el que dos de los pentapéptidos sintéticos reproduzcan el efecto del FILM.

El cambio de uno de los aminoácidos en los pentapéptidos, puede explicar las pequeñas diferencias, que tienen estos, en actividad, lo que sugiere un mimetismo molecular.

**INHIBICION LOCAL.**

La inhibición del FILM y los pentapéptidos es local, ya que sólo se presenta en zonas en las cuales se aplicó alguno de estos, bajo el reto con DNCB, pudiendo observar simultáneamente respuestas positivas en alguna zona del dorso del mismo animal, expuesto al DNCB sin modificador y elimina finalmente la posibilidad de que el efecto se debiese a otros factores presentes en el medio de cultivo axénico.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

**PRUEBAS EN ESPECIE ANIMAL.**

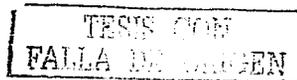
Estas son las primeras pruebas realizadas, que documentan el efecto del FILM sobre las células fagocíticas e inflamación en una especie distinta a la humana.

Lo que apoya la posibilidad de que los efectos del FILM demostrados in vitro se traduzcan en una afección significativa de la respuesta inflamatoria inmune tardía.

**POSIBLE RELEVANCIA DE LA INVESTIGACION.**

La *E. histolytica* tiene muchos mecanismos para evadir las defensas del organismo, la producción del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos es sólo una de ellas.

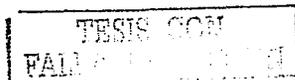
Una de las funciones de este factor, parece ser la de paralizar a las células de la respuesta inflamatoria tardía ( monocitos ).



*LORENA DÍAZ IBARRA.**INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM*

La DAC es una prueba de esta inflamación tardía, como proceso total, la medida de la intensidad de la inhibición demostrada en este estudio, hace del FILM uno de los mecanismos potenciales importantes para explicar la escasa inflamación crónica en la amibiasis.

La demostración de la actividad anti-inflamatoria del FILM, y especialmente de la actividad de los péptidos sintéticos, lleva a la consideración de su potencial como eventuales medicamentos anti-inflamatorios de características peculiares como su efecto diferencial sobre monocitos , PMN y eosinófilos.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 10

## CONCLUSIONES

TRABAJO CON  
FALLA DE CALIBRE

**CONCLUSIONES.****ANTES DE ABRIR EL CODIGO.**

- Sólo dos de los 4 péptidos sintéticos reproducen el efecto inhibitorio del FILM sobre la DAC y lo hacen en forma dosis – dependiente.

**APERTURA PARCIAL DEL CODIGO**

(los péptidos 1 y 4 son pentapéptidos – los péptidos 2y 3 son tetrapéptidos)

- Los péptidos inhibidores resultaron ser pentapéptidos y por lo menos uno de ellos idéntico al FILM.
- Los péptidos no inhibidores resultaron ser tetrapéptidos totalmente distintos al FILM.

**APERTURA DEL CODIGO.**

(el péptido idéntico es el 4)

- El péptido sintético idéntico al FILM (Met – Gln – Cys – Asn - Ser) identificado como péptido 4 reproduce el efecto inhibitorio del FILM en este modelo
- Inhibe en forma dosis dependiente. La inhibición es significativa desde la dosis 1µg/ml y alcanza su máximo con la dosis de 10µg/ml.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

- Y El análogo sintético que difiere en un solo aminoácido (Met – Pro – Cys – Asn – Ser) también reproduce el efecto inhibitorio del FILM. Este efecto es significativo en las cuatro dosis probadas ( 1- 1000mg/ml ).
- Y No hubo diferencias estadísticas significativas entre el FILM natural, el FILM sintético y el péptido casi idéntico, a pesar de que el último parece tener un efecto ligeramente mayor.
- Y Los dos péptidos totalmente distintos (Pro – Gln – Gln - Gln y Val –Gln – Gln – Gln) no tienen efecto inhibitorio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

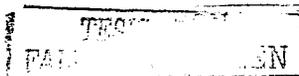
# CAPITULO 11

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

TESIS CON  
FALLA EN EL ENLACE

**BIBLIOGRAFIA BASICA**

1. BLEIBERG de Teran, Elena.  
DICCIONARIO MOSBY  
Edt. Mosby-Doyma Libros, S.A., Colombia, 1995
  
2. BROWN, Harold William.  
PARASITOLOGÍA CLÍNICA  
Edt. Interamerican, 5 edc., México 1985, 360pp.
  
3. COK, F. E. G.  
MODERN PARASITOLOGY  
Edt. Blackwell, 2ª edc, London Edinburgh Boston, 1993, 276 pp
  
4. FUNDENBERG, H. Hugh.  
INMUNOLOGÍA CLÍNICA  
Edt. Manual Moderno, 3 edc., México 1982, 824pp.
  
5. GUILLESPIE, S.H. HAWKEY, P.M.  
MEDICAL PARASITOLOGY  
Edt. IRL Press, New York Tokyo, 1994, 295 pp.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

6. HARRISON

PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA

Edt. Mc. Graw-Hill, Interamericana, 1998, 1341pp.

7. JAWELZ, Ernest.

MICROBIOLOGÍA.

Edt. El Manual Moderno, México D.F., 1990, 517 pp.

8. MARTINEZ Palomo, Adolfo.

AMIBIASIS

Edt. Panamericana, México D.F., 1989, 206 pp.

9. M. D., Stewart Sell

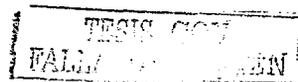
IMMUNOLOGY AND IMMUNITY

Edt. Harper of Row, 3ª edc, San Diego 1980 521 pp.

10. ROMERO Raúl.

PRIMERA REUNION DE EXPERTOS AMIBIASIS

Edt. Searle de México, 1992,9-11pp.



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

11. ROSE R., Noel. FRIEDMAN, Herman

MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY

Edt. American Society for microbiology, 2ª edic, Washington 1980, 1105 pp.

12. PEREZ Tamayo, Ruy; BRANT, Herman

AMIBIASIS

Edt. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México D.F., 1970, 104 pp

13. VIRELLA, Gabriel.

MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Edt. Williams & Wilkins Baltimore EUA, 1997, 575 pp.

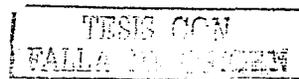
ESTA TESIS NO SALE

DE LA BIBLIOTECA

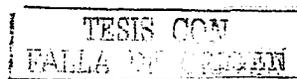
CALL. DE BIEN

**BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA**

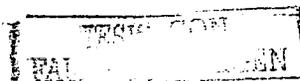
14. BRAY R.S., and Harrison W.G. 1977. Cellular immune responses to amebic liver abscess in the guinea pig. Clin. Exp. Immunol. 29:147-151
  
15. CAPÍN N. R., Capín R., Zamacoma G., and Ortíz-Ortíz, L. 1978. Activación de la vía del complemento por varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch Inves Méd. 11 sup. 1:291-296
  
16. CAPTER P. L., 1982. Dermatitis por contacto en Inmunología y Serología. 2ª edc. Prensa Médica Mexicana. p.p. 435
  
17. COX F. E. G. 1968. Immunity to tissue protozoa. In: A. E. R. Tayler ed. Immunity to Parasites, Blackwell, Oxford. p.p. 5-23
  
18. CRONSTEN Bruce N., and Weissmann Gerald. 1993. The adhesion molecules of inflammation. Vol. 36:2



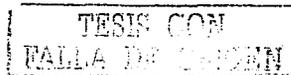
19. EDWARDS M. S., Nicholson, W. A., Baker C. J., and Kasper D. L. 1980. The role of specific antibody in alternative complement pathway mediated opsonophagocytosis of type III group B streptococcus. *J Exp Méd.* 151:1275-1287
20. GIMÉNEZ Scherer J.A., Pacheco Cano Ma.G., De Lavin, Cruz E., Hernández Jáuregui M.T., And kretschmer R.R. 1987. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenical Grown *E. histolytica*. *Lab invest.* Vol 57 : 45 pp
21. GORDON B. Bailey. 1982. Preliminary Studies of chemotaxis by *Entamoeba*, *Arch Invest. Med.* Vol 13: 265 pp
22. KRETSCHMER R.R., Sépulveda B., Almazán A. and Gamboa F. 1972. Intradermal reactions to an antigen (histolyticin) obtained from axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Trop. Geogr. Méd.* 24:275-281
23. KRETSCHMER R. R. 1982. Group streptococcal infections. *Rec Adv Infect. Dis.* 2:127-139



24. KRETSCHMER R.R., 1984. Immune Phenomena in amebiasis. *Surv-Immunol. Res.* 3:1-10.
25. KRETSCHMER R.R., Collado M.L., Pacheco M.G., Salinas M.C., López Ozuna M., Lecuona Castro E.M., Arellano J.. 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by product of axenically grown *E. Histolytica*. Vol. 7: 527 – 543 pp.
26. KRETSCHMER R. R., Castro E.M., Rico G., Pacheco G., Noriega R., and Arellano J. 1989. Further characterization of a human monocyte locomotion inhibitory factor produce by axenically grown *E. histolytica*. Vol. 75: 245-246 pp
27. ORTÍZ-Ortiz L., Zamacoma-Ravelo G., and Capín N. R. 1974. Nuevos estudios acerca de la acción de sueros humanos normales e unmmunes sobre trofozoitos de *E. histolytica*. *Arch Inves Méd. Méx.* 5. Suppl. 2:337-342
28. RICO Rosillo Guadalupe, Díaz Guerra Octavio, Kretschmer R.R. 1990. El factor Inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) producido por *E. Histolytica* induce aumento del AMPc en los monocitos humanos. Vol 21: 245 pp
29. RICO G., Díaz-Guerra O., Giménez-Scherer J.A., y Kretschmer R. R. 1992. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leucocytes. *Archives of Medical Research.* 23:157



30. RICO G., Díaz Guerra O., Kretschmer R. R. 1995. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* than inhibits human monocyte locomotion. Vol : 158 – J62 pp.
31. SALATA Robert A., D. Person Richard, and I. Ravdin Jonathan. 1985. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Vol. 76: 491-499 pp
32. SEPULVEDA B. 1982. Amebiasis: host-pathogen biology. Rev Inf. Dis. 4: 836-842
33. SNYDERMAN Ralph, and Goetel J. Edward. 1981. Molecular and Cellular Mechanisms of leukocyte Chemotaxis. Vol 213: 830-837 pp
34. SPICE W. M., and Acker P. 1992. Parasitology today. Vol. 8: 402-406 pp
35. WALSH J.A. 1986. Amebiasis in the world. Arch Invest Méd. Sup 17:385



LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

---

# CAPITULO 12

## ANEXOS

TECIS CON  
FALLA DE ORIGEN

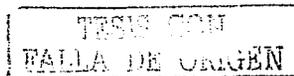
ANEXO No. I

## PRESENTACIONES FORMALES DE ESTE ESTUDIO

Díaz Ibarra L., Giménez Scherer J. A., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kreschmer R. R. Efecto *in vivo* de péptidos similares al FILM (factor inhibidor de la locomoción de los monocitos). Jornadas de Investigación Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, México D. F. Marzo 1998.

Díaz Ibarra L., Giménez Scherer J. A., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kreschmer R. R. Reproducción de los efectos *in vivo* del FILM de *Entamoeba histolytica* mediante péptidos sintéticos. XII Congreso Nacional de Inmunología, Xalapa Veracruz, Marzo 1998.

Díaz Ibarra L., Giménez Scherer J. A., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kreschmer R. R. El FILM de *Entamoeba histolytica*, su construido sintético idéntico y un construido sintético análogo, inhibe la dermatitis alérgica por contacto al dinitro clorobenceno. Jornadas de Investigación, Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, México D: F., Marzo 1999.



Giménez Scherer J. A., Díaz Ibarra L., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kretschmer R. R. La inhibición de la dermatitis alérgica por contacto por el FILM de *E. histolytica* es reproducida por su análogo sintético. XIV Congreso Nacional de Inmunología, Guanajuato, Marzo 2000.

Giménez Scherer J. A., Díaz Ibarra L., Arenas E., Villa J., Rico Rosillo G., Fernández Díez J., y Kretschmer R. R. Acción del FILM de Entamoeba histolytica en la expresión de las adhesinas de la inflamación tardía (VCAM-1 y VLA 4). 1er. Congreso de Responsables de Proyecto de Investigación en Ciencias de la Salud. Veracruz, Veracruz, Agosto 2000.

Giménez Scherer J. A., Díaz Ibarra L., Arenas García E., Villa J., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kretschmer R. R. Acción del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) de *E. histolytica* en la expresión de las adhesinas involucradas en la inflamación tardía (VCAM-1 Y VLA-4). IX Foro Nacional de Investigación en la Salud, Oaxtepec-Cocoyoc, Septiembre 2000.

Giménez Scherer J. A., Díaz Ibarra L., Arenas García E., Villa J., Rico Rosillo G., Fernández Díez J. y Kretschmer R. R., Acción del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) de *E. histolytica* en la expresión de las adhesinas de la inflamación tardía (VCAM-1 y VLA-4). Revista Latino Americana de Microbiología, Octubre 2000.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

LORENA DÍAZ IBARRA.

INHIBICIÓN DE LA DAC POR FILM

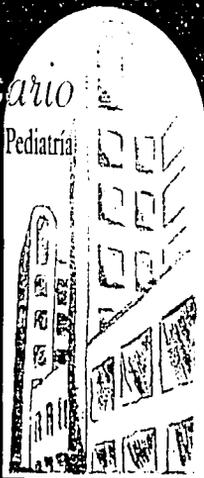
---

Juan Antonio Giménez Scherer, Erika Arenas, Lorena Díaz, Guadalupe Rico, Jorge Fernández and Roberto Kretschmer. Effect of Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produce by *Entamoeba histolytica* on the Expression of Cell Adhesion Molecules (CAMs) in the Skin of Guinea Pigs. Archives of Medical Research 31 (2000) S92-S93.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# 35 Aniversario

Pediatría



Jornadas de Investigación

Reunión Académica

Reunión de Enfermería

16 al 20 de Marzo de 1998



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI



ELECCIÓN DE PEPTIDOS SINTÉTICOS SIMILARES AL FILM (FACTOR INHIBIDOR DE LA  
LOCOMOCIÓN DE LOS MOSQUITOS)

HAZ IBARRA L., GIMÉNEZ SCHIERER J. A., RICO ROSILLO C., FERNÁNDEZ DÍEZ J. Y  
KRETSCHMER R. R.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, HOSPITAL DE PEDIATRÍA,  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN MÉDICA, CIN SIGLO XXI IMSS Y UNIVERSIDAD DEL  
VALLE DE MEXICO

INTRODUCCIÓN: El factor inhibidor de la locomoción de los mosquitos (FILM) producido por *Eusmilia*  
*luteolytica*, es un péptido de estructura aún no totalmente elucidada, que induce la dermatitis alérgica por  
contacto (DAC) al dantrololenceno (DNCE) en los cobayos

OBJETIVO: Evaluar el efecto inhibidor de cuatro posibles análogos sintéticos del FILM sobre la DAC en los  
cobayos

MATERIAL Y MÉTODO: a) Sensibilización: Se sensibilizaron animales, cobayos machos de tipo Harley y más de  
100 g de peso, mediante la aplicación (30 hr.) de un puente específico de papel Whatman #1 impregnado  
con una solución de 10 mg/ml de DNCE, sobre la piel depilada del dorso. Sólo se consideraron sensibilizados, los  
animales que presentaron vesiculización. b) Pero: Quince días después de la sensibilización los animales se reanest  
mediante una dosis de DNCE 200 veces menor a la dosis sensibilizante, aplicada con el mismo método, en zonas en  
las que simultáneamente se aplicó incoherentemente 0.05 ml, de una de cuatro concentraciones (1, 10, 100 y 1000  
µg/ml) de cada uno de los cuatro péptidos (identificados por un código). Consecuentemente se aplicó un testigo  
positivo (DNCE) + solución salina isotónica amortiguada, pH 7.4 (SSIF). En algunos casos se indujo la DAC  
mediante FILM sintetizado (1000 Daltons) c) Interpretación: Se consideró positiva una respuesta de eritema y  
edematización mayores de 5 x 5 mm a las 48 horas. Los resultados, preventivos, se analizaron mediante la prueba de  
χ<sup>2</sup>

RESULTADOS: Los péptidos identificados con los números 2 y 3 no revelaron efecto inhibitorio alguno. El  
péptido 4 indujo casi el 100% de las pruebas de DAC en todo el espectro de concentraciones utilizadas, mientras  
que el péptido 5 indujo entre 25% y 50% de las pruebas, a partir de la concentración de 10 µg/ml. La DAC  
moderada con SSIF siempre fue positiva, en tanto que la DAC con FILM sintetizado siempre fue negativa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Uno de los péptidos utilizados (1) reproduce el mecanismo de efecto inhibitorio del  
FILM sobre la DAC, con la excepción de que no (4) genera quez un efecto inhibitorio moderado. Para fines de una presentación se  
abrió preventivamente el código. Los péptidos 1 y 4 son per se péptidos, los otros dos son mezclas. Los péptidos 1 y 4  
difieren sólo en el residuo número dos, siendo éste prolinea en el péptido 1 y glicina en el péptido 4. Estos resultados  
preliminares son de interés pues confirman el poder inhibidor de DAC por parte del FILM natural, y ahora también el de  
sus análogos sintéticos (1 apoyado por el fondo Conacyt 3336P-M901)

PALM 4

200

# XII CONGRESO NACIONAL DE INMUNOLOGIA



Sociedad  
Mexicana de Inmunología  
Universidad Veracruzana



Xalapa, Veracruz  
22 al 25 de Marzo, 1998

M  
S  
E LIGO  
AGENCIAS  
VERACRUZANA

TESIS COM  
FALTA DE PAGAR EN

L-02

REGIONALIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE  
INTESTINAL ANTE HELICOBACTERIA EN RATÓN (BALB/C)  
A. Rosende Albar, A.M. Martínez Hurtado, M. Chavez-Maldonado,  
R. Lopez Revilla y J. Moreno Ferras UNAM-ENEP-IZTACALA Edo de  
México 114 y CINVESTAV-IPN Ap. 14-7000 Mexico D.F. El propósito del  
presente trabajo fue determinar si existían diferencias en la respuesta de  
anticuerpos inducida en intestinos delgado (ID) y grueso (IG) en ratones  
inmunitizados local y sistémicamente con vacunas de *E. histolytica* fijadas  
con glutaraldehído (GFT). Los ratones recibieron 4 inmunizaciones  
semanales con GFT (1x10<sup>10</sup> cels) por las vías oral, nasal, intraperitoneal e  
intramuscular y se sacrificaron 7 días después de la última dosis. Se  
obtuvieron muestras de suero, y de contenidos de intestino delgado y  
grueso. Se analizó el isotipo de la respuesta de anticuerpos anti armba por  
ELISA y por Immunoblot el patrón de proteínas amebas reconocidas  
predominantemente por anticuerpos de diferentes isotipos. Encontramos que  
existen diferencias en la respuesta de anticuerpos entre ID y IG, ya que en  
el ID predominó la respuesta de IgA mientras que en el IG no predominó la  
respuesta de ninguno de los tres isotipos analizados (IgA, IgG e IgM). El  
análisis por inmunoblot mostró que existen diferencias entre suero, intestino  
delgado y grueso en el patrón de proteínas que son reconocidas  
predominantemente por anticuerpos de diferentes isotipos. Estos datos en  
conjunto indican la regionalización de la respuesta inmune intestinal.

Apojado por CONACYT 2453-PR

L-04

INMUNOGENICIDAD DE UNA CEPA ATENUADA  
DE *Salmonella typhi* QUE EXPRESA EL EPIPTOPO  
INMUNODOMINANTE DEL ESPOROZOIDO DE *Plasmodium  
falciparum* EN SU SUPERFICIE.  
Ruiz-Torres, F., Huerta-Viquez, S., Vega-Parada, M., Carrera, M.,  
Santos-Angulo, L., Inbaun, A., González-Bonilla, C. UNAM, Hospital  
de Infectología, Centro Médico "La Raza", IMSS, UNAM, CMA, Septe XXI, IMSS  
Tlaxo de Eol. Cd. CINVESTAV, IPN

La vacuna que codifica para el epítopo inmunodominante de Infección B de  
la proteína conampoproteína (CSP) de *Plasmodium falciparum* (PvCSP) fue utilizada  
en el plásmido pST11 en el ingenio que codifica para el antígeno de la proteína  
de membrana externa (MSP) de *S. typhi* y transformado en *E. coli* CH192 (una  
cepa deficiente en la proteína *ompC*), en *S. typhi* CVD408 (una cepa atenuada  
*ΔaroC*) y en *S. typhi* CVD203CSP (que contiene integrado en su  
cromosoma el gene que codifica para la CSP). Se comprobó que las cepas son  
capaces de expresar la proteína en su superficie mediante ensayos de  
citofluorometría e inmunoelectrotransferencia. Los ratones inmunizados con  
*E. coli* (CH192-pST11)-CSP presentaron anticuerpos capaces de reconocer al  
paratipo en ensayos de inmunofluorescencia. Los ratones inmunizados con *S.*  
*typhi* CVD203-pST11-CSP presentaron títulos más altos de anticuerpos que  
los que fueron inmunizados con la cepa que expresa el antígeno en el cromosoma  
se demuestra que la localización del antígeno es crítica en la generación de la  
respuesta a antígenos recombinantes expresados en bacterias bacterianas.

31

69



Hospital de Pediatría  
15 al 19 de marzo de 1989

TESIS COM  
PILIA DE SANGRE

Reunión  
Académica

Jornadas de  
Investigación

Reunión de  
Enfermería

VIII

XIX

VI

EL FILM DE *Entomobea histolytica*, SU CONSTRUJIDO SINTETICO IDENTICO Y UN CONTRUIJ SINTETICO ANALOGO, INHIBEN LA DERMATITIS ALERGICA POR CONTACTO AL DINITO CLORO BENCENO

ELIZABETH L. GIMÉNEZ SCHERER J. A., RICO BOLLIG G., FERNÁNDEZ DÍAZ F. y KRISTEKNER R. R. Unidad de Investigación Médica en Inmunología, II. de Pediatría, Coordinación de Investigación Médica, Servicio Patológico, II. de Oncología, CMN SigloXXI IMSS y Universidad del Valle de México.

**INTRODUCCION:** El factor inhibidor de la bioconexión de los monocitos humanos (FILM) producido por *Entomobea histolytica* es un pentapéptido (secuencia confirmada por patente Mexico - EUA) que inhibe dermatitis alérgica por contacto (DAC) al dinitroclorobenceno (DNCB) en los cobayos. Se postula que construido sintético con esta secuencia debería reproducir el efecto del FILM, mientras que construido diferente debería carecer de tal efecto.

**OBJETIVO:** Estudiar el efecto inhibitorio sobre la DAC, de cuatro construidos sintéticos con distinto grado de similitud con el FILM.

**MATERIAL Y METODOS:** Los cobayos se sensibilizaron mediante la aplicación por 24 h. de un pan epitelizado de papel Whatman #2 impregnado con una solución de 10 mg/ml de DNCB en acetona-secoite oliva (4/1). Quince días después los animales se retaron mediante la aplicación de otro parche epitelizado conteniendo una dosis de DNCB 200 veces menor a la dosis vesicante, sobre una inyección intradérmica (de a) muestra (confeccionada de una de cuatro dosis (1, 10, 100 o 1000 µg/ml) de alguno de los cuatro construidos; FILM; o) de solución salina isotónica (SSI). Las reacciones se evaluaron a las 48 horas, y se clasificaron como positivas (eritema e induración  $\geq 5$  mm) o como negativas. También se evaluaron las medidas de los diámetros promedio de dichas respuestas. Los resultados se analizaron estadísticamente por  $\chi^2$ , Fisher, U de Mann-Whitney t de Student según estratificación indicada.

#### RESULTADOS:

Efecto de la dosis de 10 µg/ml de los construidos sintéticos sobre la DAC

Modificador	% Resp. positivas (≥5 mm)	Tamaño de la respuesta, mm (±d.e.)
SSI	100%	11.6 (±0.5)
FILM	20%*	3.0 (±0.8)*
Construido 1	20%*	2.1 (±1.6)*
Construido 2	81%	11.5 (±2.5)
Construido 3	81%	8.2 (±1.8)
Construido 4	45%*	3.7 (±3.9)*

\*  $p < 0.00003$  vs SSI pero no significativas entre sí

**DISCUSION:** Los resultados (con la dosis mostrada pero tambien con las demás dosis) indican que dos de cuatro construidos son capaces de inhibir la DAC, aunque el construido 1 parece ser más inhibitorio que construido 4, las diferencias entre ellos y con el FILM no alcanzan a ser significativas. La secuencia exacta del FIL y de los construidos se desconocen por recomendación legal. Una apertura limitada del código de identificación indica sin embargo que los construidos inhibitorios que difieren entre sí en su solo aminoácido (19) son, como FILM, pentapéptidos y uno de ellos es idéntico al FILM. Los construidos 2 y 3, carecen de efecto, son tetrapéptidos completamente distintos al FILM, lo que excluye que el efecto inhibitorio sea un efecto inespecífico.

**CONCLUSIONES:** Dos construidos (identificados como 1 y 4) reproducen el efecto inhibitorio del FILM ante sobre la DAC. La apertura parcial del código indica que estos son pentapéptidos (uno es idéntico y el otro difiere FILM en un solo aminoácido), y ambos son activos.



# 1er. Congreso de Responsables de Proyecto de Investigación en Ciencias de la Salud

10 al 13 de agosto del 2000

Veracruz, Veracruz



**S8P + CONACYT**  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

ACCIÓN DEL FILM DE Entamoeba histolytica EN LA EXPRESIÓN DE LAS  
ADHESINAS DE LA INFLAMACIÓN TARDÍA (VCAM-1 Y VLA-4).  
Gómez J., Díaz L., Arenas E., Villa J., Rico G., Fernández J., y Kretschnmer R  
Proyecto 3356P-M

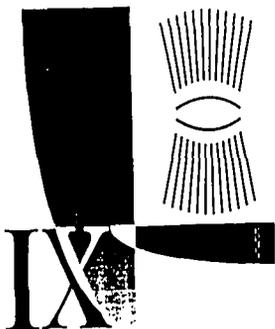
Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Coordinación de Investigación  
Médica. H. de Pediatría y <sup>2</sup>Servicio de Patología, H. Oncología, CMN Siglo XXI,  
IMSS México D. F., México

**INTRODUCCIÓN** El éxito de la respuesta inflamatoria inmunológica depende de que los leucocitos puedan migrar al foco de infección. El proceso es guiado por la secuencia de interacciones moleculares de la cascada de las adhesinas. Para que los monocitos migren al tejido inflamado y realicen la fase tardía de la inflamación es fundamental la interacción receptor-contrareceptor entre VCAM-1 y VLA-4. La VCAM-1 (CD 106) es una adhesina de la superfamilia de las inmunoglobulinas, se expresa en las células endoteliales inducida por la inflamación. VLA-4 es una integralina constituida en los monocitos y es un heterodímero con una cadena  $\alpha$  (CD 45d) y una  $\beta$  (CD 29). En la ambas involucra la respuesta inflamatoria tardía es especialmente exigua. Entamoeba histolytica produce un factor que inhibe la locomoción celular en los monocitos. Además inhibe las vías del estado respiratorio y del oxido nítrico y altera el AMPc y los microtúbulos *in vitro*. Designado como factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM) (Kretschnmer R. et al. 1982), inhibe también la inflamación tardía *in vivo* (Gómez J. et al. 1997). Su purificación y secuenciación indicaron que es un pentapéptido, lo que permitió sintetizar péptidos idénticos y diferentes. El objetivo del trabajo es evaluar el efecto del FILM sobre expresión de las adhesinas de la inflamación tardía, específicamente la pareja VCAM-1 y VLA-4 bajo la hipótesis de que el FILM alteraría su expresión.

**MATERIAL Y MÉTODOS** Se combinó la inhibición de la dermatitis alérgica por contacto al dinitroclorobenceno (DNCB) con inmunohistoquímica. Los cobayos se sensibilizaron con un parche epicutáneo con 10 mg/ml de DNCB por 24 horas. 15 días después se reitaron con un parche epicutáneo con una dosis de DNCB 200 veces menor, sobre una inyección intradérmica de FILM, de un constructo sintético idéntico o diferente. PBS o nada. A las 48 horas se evaluó macroscópicamente y se tomó biopsia de la piel. Estas se procesaron para H&E y para inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra las adhesinas, y un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (DAKO). Las biopsias fueron evaluadas en forma ciega y semicuantitativa.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN** Macroscópicamente, las inyecciones del FILM natural o sintético inhibieron 80% las respuestas positivas a DNCB, y redujeron el diámetro promedio de respuesta de 11.6 mm a 3 y 3.7 mm ( $p < 0.00005$ ). Microscópicamente disminuyeron el infiltrado inflamatorio tardío (monocitos y linfocitos) y los cambios cutáneos secundarios a la inflamación. Con inmunohistoquímica se encontró que VCAM-1, ausente en reposo, apareció en las células endoteliales en la inflamación (++++) y se apagó en presencia de FILM, natural o sintético. (-) Las dos cadenas de VLA-4 (CD29 y CD49d) presentes en los monocitos en reposo (+ y ++) se volvieron intensamente positivas en la inflamación (+++ y +++) y se apagaron en presencia de FILM (- y -). Adicionalmente se encontró que CD29 se expresó también en células endoteliales en inflamación y se apagó en presencia del FILM y que en las células epiteliales la expresión de

92



# FORO nacional DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

MEMORIAS

Coahuila-Coahuila, Mor.; 26 al 29 de septiembre de 2000.

## EFECTOS DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE LOS MONOCITOS (FILM) DE *Entamoeba histolytica* EN LA EXPRESIÓN DE LAS ADHESINAS DE ADHESINAS INVOLUCRADAS EN LA INFLAMACIÓN TARDÍA (VCAM-1 Y VLA-4).

**Coahuila:** Sánchez Jb, Díaz Barro L, Arreola García E, Villa J, Ríos Restrepo C, Fernández-Díez J, Kretschmer R. *Unidad de Inmunología y Parasitología. Hospital de Pediatría y Servicio de Parasitología. CEMSA Siglo XXI, Unidad de Investigación Médica AMES. México DF.*

**OBJETIVOS:** Evaluar el efecto del FILM de *E. histolytica* sobre la expresión de las adhesinas involucradas en la inflamación tardía (VCAM-1 y VLA-4).

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Inhibición de la quimiotaxis alérgica por contacto al *Entamoeba histolytica* (DHCO) e *E. histolytica* natural. Los eritrocitos son injectados (recubiertos) con un parche específico con 10 mg/ml de DHCO, e inyectados 3 días después con una dosis de DHCO 200 veces menor aplicada sobre la piel con una aplicación intradérmica de FILM, un controlado sintético idéntico, construido no relacionado, o PBS a las 48 horas se evalúa inmunoprecipitación y se hacen la piel. Las biopsias se procesan para H & E y para inmunoprecipitados con doble cuerpo contra VCAM-1 (CD136) y las cadenas  $\alpha$ 1 (CD136) y  $\beta$ 1 (CD137) de su contraparte VLA-4.

**RESULTADOS:** El FILM natural y el controlado sintético inhibieron macroscópicamente 80% de las respuestas al DHCO, reduciendo el diámetro de las respuestas de 11.6 a 3.0 y 3.7 mm ( $p < 0.0003$  respectivamente). Microscópicamente el controlado sintético inflama por igual y los cambios celulares secundarios. Inmunoprecipitación se observó que restringió la expresión (vinculada por su afinidad) de VCAM-1 en las células endoteliales (1 + 1) y de las dos cadenas de VLA-4 constituyentes en los monocitos (1 + 0 y 4) Ni los controlados no relacionados, ni el PBS afectaron la respuesta al DHCO.

**CONCLUSIONES:** El FILM natural y sintético inhiben la expresión de VCAM-1 y de VLA-4. Esto podría contribuir a explicar la ausencia de las adhesinas y la inflamación tardía, tal es que en la inflamación crónica.

## IMUNIZACIÓN DE INMUNIDAD PROTECTORA CONTRA EL ARBESCO HEPÁTICO AMBIANTE (EXPERIMENTAL AHAE) MEDIANTE EL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE MONOCITOS (FILM) PRODUCIDO POR *Entamoeba histolytica*.

**Coahuila:** Méndez J, Arreola J, Fernández-Díez J, López-Ojeda M, Kretschmer R, Unidad de Investigación Médica en Parasitología, Hospital de Pediatría, Departamento de Parasitología, Hospital de Investigación Médica en Parasitología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, México DF.

**OBJETIVO:** El FILM es un glicopéptido de alto peso molecular producido por el *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) en células huésped que tiene otros efectos sobre la locomoción de monocitos humanos de serpiente (pírrica) así como sobre fagocitosis y adhesión de la locomoción de monocitos (FILM). Este factor podría contribuir a la misma reacción inflamatoria tanto que se presenta en la amebiasis humana lo que a su vez permite una migración de los leucocitos afectados (pírrica, pólido) observado después de un transcurso de tiempo. No obstante, el FILM se produce o está en su defecto. El hecho de que el FILM puede ser un factor de protección de la amebiasis frente a la respuesta inflamatoria del huésped. Por ello, nos interesa evaluar inmunidad protectora contra el AHAE usando un conjugado FILM-KLH como inmunógeno.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se inocularon intraperitonealmente grupos de ratones machos entre 60 y 80 g con 0.2 ml de una mezcla 1:1 de 10 y 100  $\mu$ g de conjugado FILM-KLH y adyuvante completa de Freund, seguida de dos inyecciones sucesivas del mismo conjugado FILM-KLH con adyuvante incompleta de Freund. Seis días después, se realizó el AHAE por inoculación intraperitoneal de  $1 \times 10^6$  células de *E. histolytica* (PMI AMES) de virulencia confirmada. También se inocularon con similares grupos los ratones de animales inyectados con amoníaco grado por 45 días (BFS) y con adyuvante de Freund (completo e incompleto) sólo. Los animales se observaron diariamente por 45 días y los sobrevivientes se sacrificaron en sus fechas.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Seis de los nueve (75%) grupos control desarrollaron AHAE durante los 45 días posteriores a la inoculación de pírrica. Cuatro de diez (40%) de los grupos inyectados con 100  $\mu$ g de FILM-KLH murieron de AHAE, mientras que en los grupos (PMI) de alta virulencia inoculados con 100  $\mu$ g de FILM-KLH desarrollaron AHAE. Sin embargo, los nueve (100%) grupos inoculados con adyuvante de Freund sólo, no presentaron AHAE. Con estos resultados no podemos identificar definitivamente un papel protector del FILM-KLH en el AHAE en ratones, ya que el tratamiento con adyuvante sólo produce el mismo efecto. Nos hacemos una hipótesis diferente de inmunización con FILM, por lo que se están realizando grupos piloto donde se usará como adyuvante e inoculando a los ratones con FILM inmunizado inhibitorio de un sustrato (MATS) múltiple según el método de [Suzuki] (CONACYT 313/98).



XIV Congreso Nacional de  
Parasitología



ASOCIACIÓN  
LATINOAMERICANA  
DE MICROBIOLOGÍA

Rev. Lat-Am. Microbiol. Vol. 42, Suplemento II  
MX ISSN - 0034 - 9771



En los experimentos Se usó como estándar de comparación la muestra igual a 0.30 (media más 1 desviación estándar de las poblaciones obtenidas en el grupo normal). La media de las absorbancias de los grupos analizados (LMO, LMV, SCLM) cuando se compararon a los experimentos I fue de 0.34 (0.50) 0.21 (0.24) 0.10; y 0.09 respectivamente. Las valores de absorbancia de los grupos de LMO, LMV y SCLM, fueron estadísticamente más altas que las obtenidas por el grupo de células solamente cuando 0.036 a 0.051; muestra que las células obtenidas de los otros grupos, no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La evaluación serológica de la prueba midió una sensibilidad de 70.31% y una especificidad de 1.04%; muestra que el valor predictivo para un resultado positivo o negativo fue superior al 90% (91.73% y 96.53% respectivamente). Como resultado superior que el ELISA estándar realizado con un suero de ES de líneas L2 y 7 como prueba una adecuada herramienta serológica para el diagnóstico clínico de la LMV y LMO es ELISA.

## VIERNES MESA I

## Enzima Molecular de los Palmitomeres (PLA) y TNF en Leishmaniasis Cutánea

C. AME

Bélgica VC, Antónia J. \*\*Becker ID y Kerschner R. Unidad de Investigaciones Médicas en Immunología, Hospital de Pediatría, Coordinación de Investigaciones Médicas S33, O455 y \*\*Departamento de Medicina Experimental del Hospital General, Facultad de Medicina, UNAM.

Introducción: Las infecciones raras y el síndrome familiar sepean un control preciso de las defensas por los mastocitos.

Materiales y Métodos: Se usó DNA de 102 pacientes con (LC) y 103 Terciarios. Las polimerasas se catalizaron por PCR. Frecuencias serológicas se evaluaron estadísticamente con la prueba de  $\chi^2$ , tablas de contingencia de 2x2 y prueba exacta de Fisher.

Resultados: Se observó una alta frecuencia del DNB (21% vs 8% en 11  $p < 0.001$ ) DNB (15% vs 1% en 40  $p < 0.001$ ) en América con inclusión al compararse con tercias normales. Con respecto al DNB se observó una disminución de la frecuencia en pacientes al compararse con tercias normales (1% vs 24% en 11  $p < 0.001$ ). En el DNB (15012) se observó 15% vs 6% en 47  $p < 0.001$ ) del DQB (10402) (1% vs 8% en 1  $p < 0.001$ )

Conclusiones: El suero de pacientes del DNB (21%) mostrando un porcentaje más incluído en (8%) en tercias y el (30) (15011) y (1062) mostró suero factores de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis en este grupo clínico. Con respecto a la alta frecuencia encontrada en el DNB con (4%) en pacientes vs (21%) en Terciarios, nos podría estar sugiriendo un tipo de gen presente para esta población.

ACCIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA LOCOMOCIÓN DE LOS MONOCITOS (FILM) DE Estreptococcus faecalis EN LA EXPRESIÓN DE LAS ADRESINAS DE LA INFLAMACIÓN TARDÍA (VCAM-1 Y VLA-4)

Carmona Sotelo Juan Antonio, Diaz Barral Lucrecia, Arreola García Erika, Véliz Becerra Rosa Paz, Guillotier Sandoval Oscar Jorge y Kerschner Roberto

Unidad de Inmunología y Laboratorio de Patología Clínica, S33 coordinador de Investigaciones Médicas, UNAM, México D.F. (Apoyo CONACYT 3362-A9941)

Objetivo: Evaluar el efecto del FILM de E. faecalis sobre la expresión de las adresinas de la inflamación tardía (VCAM-1 y VLA-4).

Materiales y Métodos: Inhibición de la demanda séptica por contacto al dimetilnitrobenzeno (DNMB) e inmunohistoquímica. Los cultivos sensibilizados con un parche opacizado con 10<sup>7</sup> µg/ml de DNMB se retiraron 14 días.

Resultados: Con una dosis de DNMB 200 veces menor sobre la piel con una inyección intradérmica de FILM, un controlado más de adherencia (aproximadamente 80%) a las 48 horas se realizó inmunohistoquímica e inmunoprecipitación por PCR. Los resultados se compararon para E. faecalis monoclonalizada con doble inyección contra VCAM-1 (CD54) y VLA-4 (CD144) (ICD24) e (ICD24) de la co-inoculación VLA-4.

93A



**ANEXO No. II****IDENTIFICACION DE COBAYOS POR SU CIRCULACION AURICULAR.**

La identificación en animales de laboratorio es necesaria para evitar los riesgos de confusión durante el proceso de estudio.

Para evitar y superar los problemas encontrados en los métodos tradicionales empleados al inicio del estudio se desarrollo un método para la identificación rapida, sencilla, económica y no agresiva ó mutilante para el animal.

Este método consiste en el registro de los patrones circulatorios de la oreja; La red venosa de la oreja del cobayo, vista desde el lado superior de esta, tiene el patrón general en forma de "M" con la base cercana a la inserción de la oreja. Hay innumerables variaciones sobre este patrón general, por esta compleja variación resulta la combinación de varios patrones simples, lo que permite la identificación individual y permanente de cada animal.

La descripción detallada del método esta en proceso para su publicación.

El método de identificación por circulación auricular posiblemente alcanza su funcionamiento óptimo cuando se aplica a grupos medianos (5-50 animales albinos circulación claramente visible), que serán mantenidos por periodos mayores de una semana.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN