

ESTE TRABAJO DE TESIS FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE. IMSS. EN EL LABORATORIO DE INMUNOPATOLOGIA BAJO LA DIRECCION DEL M en C RODOLFO RAMOS ZEPEDA.

MI AGRADECIMIENTO SINCERO A LA M en C. PIEDAD DEL CARMEN
GOMEZ CONTRERAS POR SU AYUDA Y AMISTAD SINCERA QUE ME
BRINDO DURANTE LA ELABORACION DE MI TRABAJO.

GRACIAS POR SU AMISTAD Y COOPERACION: Q.F.B. MARTHA BARBA
BARAJAS, TERESA GONZALEZ, BIOL. VERONICA LOPEZ y BIOL.
PATRICIA CALDERON.

ESTE TRABAJO DE TESIS LO DEDICO A MI MADRE Y HERMANA
POR SU COMPRESION Y PACIENCIA.

MI ADMIRACION Y AGRADECIMIENTO AL M en C. RODOLFO RAMOS
ZEPEDA POR EL APOYO ACADEMICO Y MORAL QUE SIEMPRE ME BRINDO
EN LA ELABORACION DE MI TRABAJO DE TESIS.
GRACIAS.

EN ESTE MOMENTO TAN ESPECIAL EN MI VIDA, RECUERDO CON
NOSTALGIA LOS MOMENTOS DE TRISTEZA Y ALEGRIA QUE COMPARTI
CON MIS COMPANEROS DE LICENCIATURA. POR SU AYUDA SIEMPRE
INCONDICIONAL GRACIAS.

ADRIANA AGUILAR.
ANGELICA SANDOVAL.
JOSE ANTONIO CAMACHO.
KARLA REBECA MANZANO.
MARICELA CASAS.
NANCY DEL C. HDEZ.
SILVIA CORTES.

ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS PMN Y MACROFAGOS
PERITONEALES DE RATONES TRATADOS CON GOSIPOL.

INDICE.

| | |
|---------------------|----|
| ANTECEDENTES. | 1 |
| JUSTIFICACION. | 10 |
| HIPOTESIS. | 13 |
| OBJETIVOS. | 14 |
| MATERIAL Y METODOS. | 15 |
| RESULTADOS. | 21 |
| DISCUSION. | 23 |
| CONCLUSION. | 26 |
| BIBLIOGRAFIA. | 27 |

ANTECEDENTES

Los mecanismos de protección de los mamíferos contra agentes patógenos que se encuentran en su ambiente son específicos e inespecíficos. Los primeros incluyen las respuestas inmunes: humoral que está mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B y celular a través de linfocitos T (supresores/citotóxicos, cooperadores/inductores) su mecanismo de acción implica la liberación de interleucinas y contactos celulares directos ^{25,26}. Los segundos integrados por la piel, anexos (uñas, pelo), mucosas, fagocitosis, sistema del complemento e interferones. Estos elementos ejercen su acción contra bacterias, virus, parásitos, toxinas, células cancerosas y detritus celulares propios ^{30,43}.

La piel y las mucosas representan la primera barrera de protección contra la penetración de los agentes patógenos. Asimismo la importancia de la fagocitosis como mecanismo de protección frente a las infecciones fue reconocida por el ruso Elie Metchnikoff en 1883 que estudiando varias especies

principalmente invertebrados marinos. notó la presencia de ciertas células con movimiento ameboide con la capacidad de ingerir y destruir partículas u organismos lo cual constituía la defensa fundamental contra ellos

Los tipos de células especializadas que participan en el proceso fagocítico son los granulocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los macrófagos. Los PMN constituyen la primera línea de defensa interna del huésped se producen en médula ósea y pasan a la circulación sanguínea, su vida media es aproximadamente de 12 hs . Miden 8-12 μ m de diámetro. su núcleo presenta de 2 a 5 segmentos. Son las células fagocíticas más abundantes y altamente diferenciadas

Los PMN contienen numerosas enzimas en sus lisosomas. como la lisozima y la mieloperoxidasa (MPO) que tienen capacidad bactericida y fungicida ; La lisozima hidrolisa la unión de ácido murámico N-acetil-glucosa-amino. que se encuentra en los mucopéptidos de las bacterias. Por su parte la MPO es capaz de formar complejos con peróxido de hidrógeno y halógenos para constituir el complejo MPO-

peróxido-halógeno con un efecto oxidativo elevado capaz de lisar a los microorganismos fagocitados. La concentración aproximada de MPO es el 5% de peso seco de la célula 20,37,40

Por su parte los macrófagos tienen como precursores a los monocitos sanguíneos que se producen en médula ósea^{2,52}, son células mononucleares, miden de 15-30 μ m de diámetro su núcleo es en forma de riñón; pasan a la circulación sanguínea donde permanecen por espacio de 12 hs^{8,26,37}. Migran a los tejidos y colonizan diversos órganos de los que reciben determinadas influencias que les confieren características específicas y su denominación depende del órgano en que se localizan^{8,21,22}. A diferencia de los PMN, los macrófagos tienen una vida media prolongada, pueden permanecer en los tejidos durante semanas o meses⁴².

Los macrófagos en el tejido conectivo se denominan histiocitos, en hígado células de Kupffer, en los pulmones macrófagos alveolares, en bazo células dendríticas, en cerebro células microgliales. En el peritoneo macrófagos peritoneales (MP)^{36,42,57}.

Con la maduración de los macrófagos se expresan también ciertas capacidades funcionales ^{32.51.60}. Se manifiestan receptores de superficie para inmunoglobulinas (IgG1, IgG2b, IgG2a e IgE), componentes del complemento (C5a, C3a y C4a) y receptores para linfocinas, las cuales intervienen en la ^{5.14.34} activación del propio macrófago. Cuando los macrófagos son activados aumentan su volumen, su citoplasma se hace difuso, mayor número de mitocondrias y lisosomas, por consiguiente; el aumento de la concentración de enzimas hidrolíticas. La actividad de su membrana aumenta y su metabolismo es más activo para ingerir, matar y digerir ^{36.40.43.49} elementos agresores o partículas de desecho.

Los macrófagos tienen diversas funciones: colectan los desechos del organismo, se ven involucrados en la limpieza y cicatrización de heridas, en la remodelación de tejidos, destrucción de células envejecidas y en el control de neoplasias ^{7.8.31.47}. Participan en la defensa del huésped en contra de microorganismos patógenos y se les considera la ^{17.49.57} segunda línea de defensa.

Los macrófagos son similares a los PMN en su comportamiento fagocítico. poseen mecanismos bactericidas dependientes e independientes de oxígeno. Por ejemplo: la ingestión de partículas es un fenómeno energético dependiente, estimula numerosos procesos intracelulares, entre los que se incluyen aumento en el consumo de oxígeno, peróxido de hidrógeno, producción de anión superóxido. iones oxhidrilo y estimula la actividad metabólica de la vía hexosa monofosfato 41.48.58 .

El contenido enzimático de los PMN y macrófagos es diferente. los PMN poseen mayor cantidad de MPO que actúa en forma permanente. en cambio los macrófagos requieren de activación previa para elevar su contenido de MPO 54.57 .

Los mecanismos independientes de oxígeno comprenden algunas sustancias microbidas entre las que se encuentran: Las proteínas catiónicas, así se denomina a un conjunto de nueve proteínas de bajo peso molecular, con grupos ácidos, ricas en arginina: interfieren el metabolismo de muchas bacterias con lo que impide su crecimiento y pueden romper su membrana. Además estos mecanismos incluyen algunos factores como: Lactoferrina que es bactericida, lisozima que ataca las

paredes bacterianas y el pH que altera la permeabilidad de
8,49,57
la membrana .

En general el proceso fagocítico consta de varias etapas:
Quimiotaxis, opsonización, adherencia, ingestión, muerte
celular y digestión.

QUIMIOTAXIS.

La quimiotaxis es la capacidad de los fagocitos para moverse
hacia un estímulo . migran al sitio de lesión en respuesta a
un gradiente creciente de atracción o estímulo quimitáctico.
como: Productos bacterianos, sustancias del sistema de
kininas, anticuerpos, fracciones del sistema del complemento
5.37.62
(C5a) . Los linfocitos B y T también liberan
sustancias quimiotácticas específicas para macrófagos. como
el factor activador de macrófago (MAF) y otras generadas
durante el proceso inflamatorio que tienen la capacidad de
incrementar la velocidad de la migración de los PMN y
5
macrófagos .

OPSONIZACION.

La mayor parte de los microorganismos no se fijan hasta que son revestidos por factores séricos naturales llamados opsoninas. Las opsoninas son anticuerpos (inmunoglobulinas de la clase IgG, en particular las subclases IgG1, IgG3) y el tercer componente del complemento (C3). Recubren a la partícula por fagocitar y modifican la pared microbiana lo que permite una ingestión más eficiente por parte del fagocito ^{13,53,57}.

ADHERENCIA

Esta etapa consiste en la interacción de la partícula con el fagocito que puede o no estar mediada por la opsoninas ^{33,49,71}.

INGESTION

El fagocito emite prolongaciones del citoplasma (pseudópodos) con los que origina el englobamiento de las partículas por fagocitar después de adherirse a él. Durante

la etapa de ingestión en el proceso. cerca del cincuenta por ciento de la membrana de los PMN se consume porque es invaginada al recubrir la partícula ingerida y forma de esta manera el fagosoma

13,37,58,64

MUERTE CELULAR Y DIGESTION

Una vez ingerida la partícula. Los mecanismos bioquímicos dentro del citoplasma se activan y como consecuencia de ello, los lisosomas se aproximan a la membrana del fagosoma. Los gránulos se rompen y descargan su contenido enzimático en la vacuola y entran en contacto con los microorganismos ingeridos ocurriendo la muerte de ellos ; La mayoría muere en el fagosoma en pocos minutos, aunque la degradación total requiere en ocasiones algunas horas. Para ello desde la formación del fagosoma. se observa incremento en el consumo de oxígeno y la activación de una oxidasa asociada a la membrana que depende del fosfato de nicotin-adenin-dinucleótido reducido (NADH). Esta oxidasa reduce el oxígeno molecular hasta anión superóxido que a su vez se transforma en peróxido de hidrógeno. El superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden interactuar para dar origen a radicales

hidroxilo y al oxígeno atómico. Gran parte de la actividad
óxido reductora de estos radicales es dirigida hacia los
gérmenes fagocitados, sobre los que ejerce su acción
10-13,41,57,69
bactericida

Los metabolitos activos de oxígeno que son generados en o
cerca de la superficie celular y dentro de la vacuola
fagocítica, ejercen efectos antimicrobianos y antitumorales.
Los efectos antimicrobianos del peróxido de hidrógeno
aumentan por los haluros en presencia de la mieloperoxidasa
13,26,27,45

Para el estudio de los mecanismos bioquímicos que se activan
en los PMN y macrófagos durante el proceso fagocítico
existen técnicas específicas. La presencia de MPO en los
fagocitos se determina entre otros procedimientos por el
metodo de Kaplow ³⁰ que consiste en una reacción de oxidación
del diclorhidrato de bencidina, por la MPO en presencia de
26,27
peróxido de hidrógeno

JUSTIFICACION

Por otra parte se tiene conocimiento de la existencia de diversas sustancias que tienen efecto sobre los mecanismos de defensa y se les conoce como inmunomoduladores. El efecto de estas sustancias puede ser supresor o potenciador de la respuesta inmune. entre ellos se encuentran inmurán, ciclofosfamida y antraciclinas, interleucinas, factor de transferencia, levamisol y gosipol ²³ 3, 37.

El gosipol [1,1' 6,6',7,7',- Hexahidroxil-5.5',-disopropil 3,3',-dimetil (2,2',-binaftaleno)-8,8',-dicarboxaldehido] su peso molecular es de 518. Es un alcohol polifenólico extraído de la planta y semilla de algodón; el aceite de algodón se utilizaba en la preparación de alimentos en la cocina china y posteriormente se le atribuyeron propiedades como anticonceptivo masculino. Empíricamente se utilizó con

este fin. Esta propiedad fue estudiada formalmente y se confirmaron sus efectos inhibitorios de la espermatogenesis 6,38,39,44,58

En la actualidad el estudio de los efectos del gopipol sobre múltiples actividades celulares se ha dirigido desde diferentes puntos de vista, entre los que se incluyen los siguientes: Se ha encontrado que el gopipol se une covalentemente a las proteínas microsomales^{1,44}, es inhibidor de la síntesis de DNA de células epiteliales y de la 5 α -reductasa en microsomas y mitocondrias de células de próstata de caninos⁴⁴. Tiene efecto supresor de la producción de estrógenos en células luteinizantes de bovinos y sobre la secreción de corticosterona en células adrenocorticales de rata⁴⁹. Además el gopipol inhibe el transporte electrónico en la cadena respiratoria y tiene efectos sobre la actividad de enzimas como la lactato-deshidrogenasa X, NAD-isocitrato-deshidrogenasa, succinil-CoA-sintetasa, adenil-ciclasa y ATPasa^{68,72}.

El gopipol se ha utilizado en el tratamiento contra diversos parásitos (Trypanosoma brucei, cruzi, Plasmodium falciparum, Taenia taeniaeformis y Entamoeba histolytica) y como agente antiviral contra Herpes simplex, Influenza etc.
 1,21,53
 En ambos actúa como inhibidor de las oxidoreductasas
 58,72

Asimismo el gopipol se ha empleado como agente antitumoral en carcinoma adrenocortical e hiperplasia en próstata por su actividad como inhibidor enzimático . Por último el gopipol en concentraciones elevadas ha mostrado efecto supresor de la respuesta inmune humoral de ratones y en relación con la fagocitosis se tienen el antecedente de una disminución en la actividad enzimática de los leucocitos polimorfonucleares .

HIPOTESIS

La administración de gosipol modifica la actividad fagocítica de los polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos peritoneales.

OBJETIVOS.

Valorar la influencia del gosipol sobre la capacidad fagocítica de los PMN y MP murinos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar en los PMN y MP de los ratones tratados con gosipol:

- a) Índice fagocítico.
- b) Índice digestivo.
- c) Actividad de la enzima MPO.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon ratones machos Balb/c de 9-12 semanas de edad con una peso de 23-25 gramos, alojados en jaulas de policarbonato con cama de aserrín, en ambiente con temperatura y humedad controladas; ciclos de luz de 12 hs. Alimentados con purina para roedores y agua para consumo voluntario.

DOSIS.

La dosis para cada ratón consistió en 0.1 mg de gosipol disuelto en 1 ml de Na_2CO_3 a 0.01 M. A los testigos se les inyectó 1 ml de solución salina fisiológica al 0.87% estéril (SS). La administración fue por vía intraperitoneal (ip).

TRATAMINETO.

Se emplearon 100 ratones para formar 10 grupos con 10 ratones cada uno. A 5 grupos se les administró gosipol. Dependiendo del grupo de que se trató fue el número de dosis

de 1 a 5: se aplicaron cada 48 hs. Los 5 grupos restantes fueron utilizados como testigos.

OBTENCION DE LEVADURAS DE Cándida albicans.

C.albicans fue aislada de un paciente con candidiasis mucocutánea. Se sembró en medio de cultivo Sabouraud y se incubó a 37 C durante 72 hs. Posteriormente se resembró en caldo cerebro-corazón a 37 C por 24 hs. El cultivo fue centrifugado a 2500 rpm durante 15 minutos. El paquete celular se lavó 3 veces con SS. Las levaduras se contaron en cámara de Neubauer y se llevaron a una concentración de 10⁶ levaduras de C.albicans suspendidas en 1 ml de SS.

OBTENCION DE FAGOCITOS.

Después de 48 hs de aplicada la última dosis de gosispol o SS. los ratones se inyectaron ip con 300 UI de heparina. A los 15 minutos se sacrificaron por dislocamiento de las vértebras cervicales. se extrajo la sangre por punción cardíaca. Los PMN se obtuvieron a partir de la sangre completa por su capacidad de adherencia al vidrio ^{17,24}. Los

MP se obtuvieron por lavado de la cavidad peritoneal. Para ello se inyectaron ip 5 ml de solución balanceada de Hank (Sigma Cat-h 1387) (SBH). Se dio un ligero masaje en el abdomen y se extrajo la suspensión celular rica en macrófagos⁶¹.

PRUEBA DE FAGOCITOSIS.

Para la valoración de la actividad fagocítica se empleó el método de adherencia al vidrio de Cunningham^{9.18} modificado¹⁹

. Básicamente consistió en lo siguiente: Para cada ratón se emplearon cuatro cubreobjetos de 6x6 mm los cuales previamente fueron desengrasados con alcohol y fijados con resina sobre un tapón de hule. En dos cubreobjetos se colocaron 0.15 ml de sangre y en los otros dos 0.15 ml de la suspensión de MP. Se incubaron en cámara húmeda a 37 C por 30 minutos; posteriormente fueron lavados cuidadosamente con SBH a 37 C para eliminar las células no adheridas. Sin dejar secar los cubreobjetos se agregaron inmediatamente a cada uno 0.15 ml de plasma diluido al 20% en SBH del ratón correspondiente, que contendrá 10⁶ de levaduras de C.albicans por ml. Se incubaron nuevamente a 37 C por 15 minutos.

A continuación se lavaron con SBH. se dejaron secar al aire y se tifieron con colorante de Wright.

Una vez teñidos los cubreobjetos se despegaron del tapón. Se montaron en portaobjetos de modo que las células quedaron entre cubre y portaobjetos. Para su fijación se utilizó resina. Se observaron al microscopio de luz con el objetivo de 100 X.

VALORACION DE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA.

Se contaron 300 PMN o MP. Se contaron el número de levaduras ingeridas por cada fagocito y se diferenciaron las levaduras íntegras dentro de las células. que se observaron cubiertas por el fagosoma teñidas de azul intenso. Asimismo se consideraron las levaduras digeridas que se observaron dentro de los fagosomas como vacuolas ópticamente vacías, las cuales fueron descritas por Cunningham como fantasmas ⁴⁸. En ocasiones podrán tener residuos de levaduras. Los resultados se reportaron como : a) El porcentaje de células que fagocitan . b) Índice de fagocitosis (IF), el promedio de levaduras ingeridas. dividido entre el número de células

contadas. c) Índice de digestión (ID), el promedio de levaduras digeridas entre el número de células contadas.

DETERMINACION DE MIELOPEROXIDASA.

Para valorar la enzima mieloperoxidas se utilizó la técnica descrita por Kaplow ^{30.56}. Se preparó un frotis sanguíneo, se fijó por 1 minuto con una mezcla al 10% de formaldehído-alcohol. El frotis se lavó con agua destilada y se agregó la mezcla de reactivos para revelar el conteido de MPO (0.30 grs de diclorhidrato de bencidina, 100 ml de alcohol etílico al 30%, 1.5 ml de hidróxido de Na 1N, 0.7 ml de peróxido de hidrógeno al 3%, 1 gr de acetato de sodio, 0.20 g de safranina y 1 ml de sulfato de Zinc al 1%). Se dejó reaccionar la mezcla sobre el frotis por tres minutos. A continuación se enjuagaron con agua destilada y se secaron al aire.

El producto de la reacción de oxidación de la bencidina por la MPO se presentó en forma de gránulos de color azul intenso-negro. Se contaron 300 PMN y la reacción se valoró en cada célula por medio de cruces según la intensidad del

producto de la reacción de MPO (granulos). Abundantes granulos (3+) cantidades intermedias (2+) escasos gránulos (1+) y células sin actividad de MPO (0+) los que no presentan gránulos. Los resultados se transformaron y se expresaron como porcentaje de actividad; este valor se obtuvo de la suma de las intensidades de reacción de cada célula y se relaciona con el cien por ciento de actividad (900) que resulta de 300 células con una intensidad de tres cruces.

RESULTADOS.

En la Tabla 1 se observa que los PMN de los ratones que recibieron de 2 a 4 dosis de gopipol presentan disminución significativa ($p < 0.05$) de su capacidad para fagocitar (IF) levaduras de C.albicans en relación con el grupo testigo. En cuanto al ID no se observó diferencia estadísticamente significativa.

En la Tabla 2 se muestra que los MP de los ratones que recibieron de 1 a 3 dosis presentan disminución significativa ($p < 0.05$) de su capacidad para fagocitar (IF) levaduras de C.albicans, al compararse con los ratones del grupo testigo. En el ID de los MP no se observó diferencia significativa.

TABLA 1.

IF E ID DE PMN DE RATONES QUE RECIBIERON
DE UNA A CINCO DOSIS DE GOSIPOL.

| GRUPO/DOSIS | INDICE FAGOCITICO | | INDICE DE DIGESTION | |
|-------------|-------------------|--------------|---------------------|------------|
| | \bar{X} | D.E | \bar{X} | D.E |
| 1 | 3.26 | ± 0.85 | 0.42 | ± 0.16 |
| 2 | 2.74 | $\pm 0.67^*$ | 0.43 | ± 0.27 |
| 3 | 2.73 | $\pm 0.70^*$ | 0.36 | ± 0.13 |
| 4 | 2.65 | $\pm 0.55^*$ | 0.20 | ± 0.19 |
| 5 | 4.02 | ± 1.27 | 0.54 | ± 0.46 |
| T | 3.52 | ± 1.27 | 0.39 | ± 0.19 |

* ESTOS CASOS MOSTRARON DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (< 0.05) AL COMPARAR SE CON EL GRUPO TESTIGO (T).

TABLA 2.

IF E ID DE MP DE RATONES QUE RECIBIERON DE
UNA A CINCO DOSIS DE GOSIPOL.

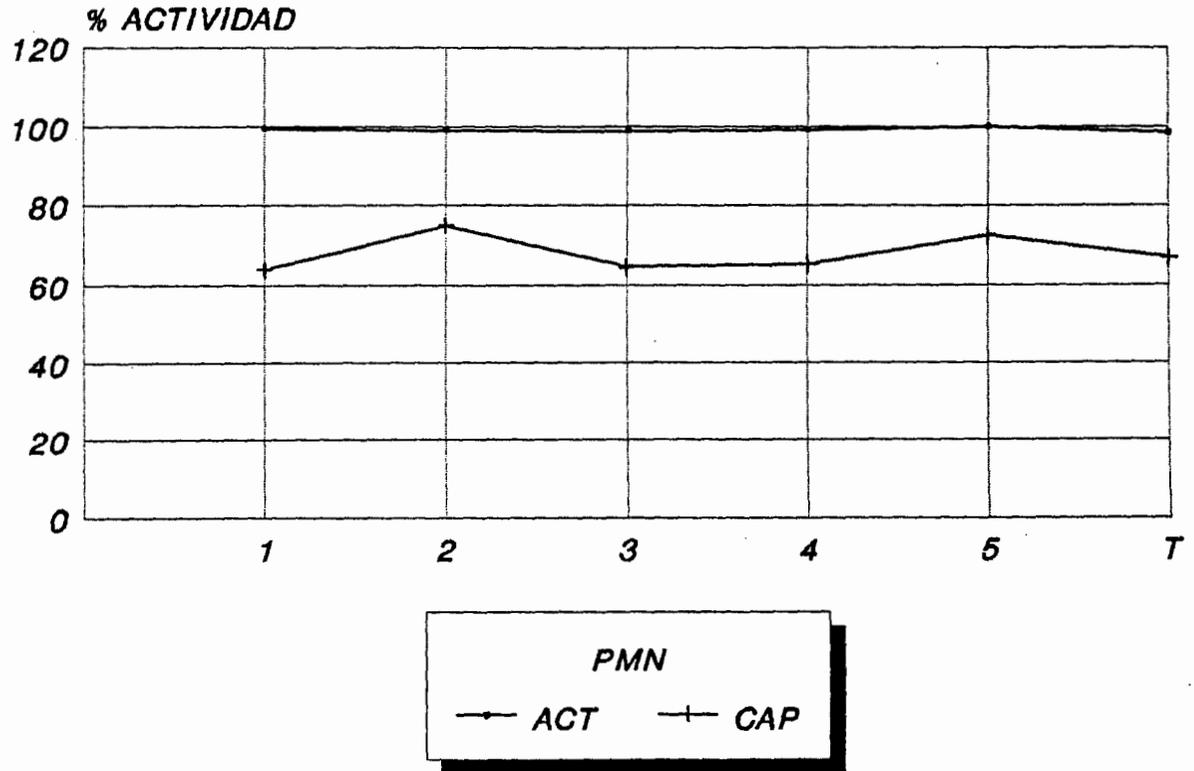
| GRUPO/DOSIS | INDICE FAGOCITICO | | INDICE DE DIGESTION | |
|-------------|-------------------|---------|---------------------|--------|
| | \bar{X} | D. E | \bar{X} | D. E |
| 1 | 0.52 | + 0.43* | 0.14 | + 0.02 |
| 2 | 1.09 | + 0.73* | 0.37 | + 0.27 |
| 3 | 0.78 | + 0.42* | 0.18 | + 0.19 |
| 4 | 1.52 | + 0.87 | 0.45 | + 0.29 |
| 5 | 1.87 | + 0.52 | 0.24 | + 0.16 |
| T | 1.91 | + 0.80 | 0.22 | + 0.19 |

* ESTOS CASOS MOSTRARON DIFERENCIA ESTADISTICA SIGNIFICATIVA (< 0.05) AL COMPARAR SE CON EL GRUPO TESTIGO (T).

En la Figura 1 se presenta los resultados de la actividad fagocítica de los PMN. Puede observarse que no hubo diferencias significativas al compararse los PMN de los grupos de ratones que recibieron de 1 a 5 dosis de gosipol, con los del grupo testigo. Igualmente se muestra que tampoco los MP de los ratones tratados con gosipol presentaron diferencias significativas al compararse con los testigos.

En la Figura 2 se muestra que la actividad y la capacidad de la enzima MPO de los PMN de ratones tratados con gosipol no tuvieron diferencias significativas en relación con el grupo testigo.

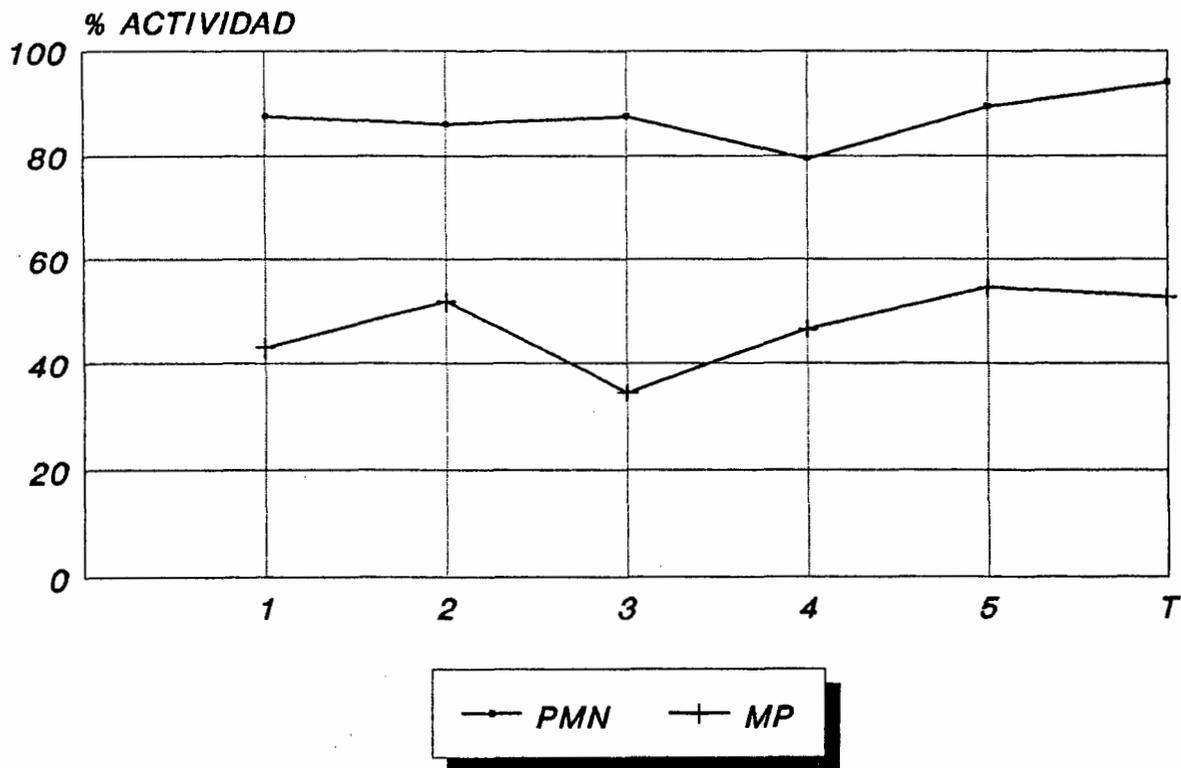
ACT. Y CAP. DE LA ENZIMA MPO EN PMN DE RATONES CON UNA Y CINCO DOSIS



DOSIS/GRUPO

FIGURA 2

ACT. FAGOCITICA DE PMN Y MP DE RATONES CON 1 Y 5 DOSIS DE GOSIPOL



DISCUSION.

En diversas enfermedades como la granulomatosa crónica, síndrome de Chediak Higashi, síndrome del leucocito perezoso 59,61 ,etc. Se presentan transtornos por deficiencias de los mecanismos de defensa. primordialmente se encuentran afectadas las células fagocíticas. Debido a ello los pacientes presentan cuadros infecciosos piógenos recurrentes. Para el restablecimiento de la actividad fagocítica se han utilizado diversos procedimientos terapéuticos como el tratamiento con sustancias inmuoestimuladoras entre las que se encuentran levamisol, tuftsina y lipopolisacarido ¹⁵. El transplante de médula ósea, de timo y la aplicación de algunos factores como el factor estimulante de colonias de granulocitos, representan otras formas de terapia para restaurar la actividad fagocítica 4,15, 28,29,50,73

En la actualidad no se tiene conocimiento de algún efecto del gopipol sobre la actividad fagocítica. Sin embargo en el presente trabajo se valoró la fagocitosis en PMN y MP de

ratones que recibieron de una a cinco dosis de 4 mg/kg de gosipol por vía intraperitoneal. En los PMN de los animales que recibieron de dos a cuatro dosis se encontró disminuída en forma significativa, la capacidad para ingerir levaduras de *C.albicans* (IF): Asimismo los MP de los ratones que recibieron de una a tres dosis, también disminuyeron su capacidad fagocítica.

La diferencia en este comportamiento puede atribuírse a la vía de administración del gosipol, ya que fue intraperitoneal de ahí que el efecto de esta sustancia sobre los MP fue más rápido: en tanto que para actuar sobre los PMN se requirió que los niveles de gosipol en sangre periférica aumentara, para manifestar algún efecto sobre la capacidad de ingestión de las levaduras. En relación con la capacidad de digestión (ID) a través de la cual se valoró la actividad microbicida no se observó diferencia significativa en los fagocitos PMN y MP de los ratones tratados con gosipol. Tampoco se observó diferencia en el contenido de la enzima MPO en los PMN de los ratones. No se realizó la determinación de MPO en los MP debido a que si no son activados previamente el contenido de MPO es muy escaso.

El uso del gosipol así como el estudio de sus efectos como anticonceptivo masculino y como inhibidor de múltiples enzimas, en los últimos tiempos ha sido motivo de numerosos trabajos; por lo que el conocimiento de los efectos que pudiera tener sobre otro tipo de células como los PMN y macrófagos es de suma importancia, ya que al ser utilizado el gosipol con otros fines, podría provocar alteraciones en estas células que constituyen la primera línea de defensa del organismo. Al respecto se sabe que entre las enzimas que inhibe el gosipol se encuentra la MPO de los PMN que tiene importante función en los mecanismos microbicidas, principalmente en el sistema MPO-peróxido-¹⁴halógeno. Aunque como se señaló anteriormente en este trabajo no se encontró disminución de MPO en los PMN, lo cual sugiere que debido a ello no hubo disminución en su índice de digestión.

CONCLUSION.

El tratamiento de los ratones Balb/c con gosipol modificó la capacidad de ingestión de los fagocitos PMN y MP. Lo que sugiere que puede tomarse en cuenta este hallazgo como una más de las alteraciones que provoca el empleo del gosipol.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adams DO, and Hamilton TA.. The cell biology of macrophage activation. Annw. Rev. Immunol,1984;2:283
- 2.- Anegón +X'Xio,Blottiere Hervé. Cuturi Ma Cristina. Lenne Yvonne. Trinchieri Giorgio, Faust Jeffrey. and Perussia Bice. Characterization of a human monocyte antigen, B148.4, regulated durin cell differentiation and activation.Journal of Leukocyte Biology,1993;53:390-8
- 3.- Amanov N. Garib FYu. Umarov YaA. Microbial ecology of the intestine and its modulation induced by immunodepressants. Full Journal. Antibiotiki i Khimioterapia, antibiot Khimioter,1989;34:453-7
- 4.- Beksac M, et al. Circulating endogenous granulocytes colony-stimulating factor levels after bone marrow transplantation.Blood,1992;80:2946-7
- 5.- Bellanti JA. Inmunología Ed. Interamericana,1988:21-29
- 6.- Blanco Antonio. Aoki Agustin. E Montamat Enrique. and E Rovai Leonor. Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of Trypanosoma cruzi. Protozool,1983;30: 648-51 by society of protozoologists.
- 7.-Blusse A. Van Oud Alblas y Van Furth R. Origin kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. J. Exp. Med,1979;149:1504

8.- Cline MJ, Lehrer RI, Territo MC, y Golde DW. Monocytes and macrophages: function and diseases. Ann. Inter. Med. 1978;88:78-88

9.- Cunningham KM, Bulmer GS, y Rhoades ER. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporotrix scheinkii*. J. Infect. Dis. 1979;140:815-17

10.- Christiasen MO, Larsen CS, Jhon H. and Esmann. Membrane associated protein kinase C activity in superoxide producing human polymorphonuclear leukocytes. J. Leucocyte Biol. 1988; 44:33

11.- Dahin CA, J febr, and Hungli TE. Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. J. Clin. Invest. 1983;72:113

12.- Della Bianca Vittorina, Grzeskowiak Mirosława, Dusi Stefano, and Rossi Filippo. Transmembrane signaling pathways involved in phagocytosis and associated activation of NADPH oxidase mediated by Fc Rs in human neutrophils. Journal of Leukocyte Biology. 1993;53:427-38

13.- De la Vega G. El neutrófilo en la defensa del organismo. Patología. 1973;2:49-56

14.- Fitzpatrick LR, Bostwick JS, Renzetti M, Penddeton RG, Decktor DL. Antiinflammatory effects of various drugs on acetic acid induced colitis in the rat. Agentes-Actions, 1990;30:393-402

15.- Freudenberg N, et al. The role of macrophages in the uptake of endotoxin by the mouse liver. Virchows Arch B. Cell. Pathol. 1992;61:343-9

- 16.- Fudenberg HH, Stites PD, Calwell LJ, y Wells VJ. Manual de Inmunología Clínica. Ed. El manual moderno.1983:112-116.117
- 17.- Furth VR, Reaburn AJ, Zwet VTL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. Blood,1979;54:485-500
- 18.- Gómez-Estrada H, Morales-Ortiz R, González-Mendoza A, Barba-Rubio, Ceja-Mendoza S. Deficiencia de peroxidasa en histiocitos de pacientes con lepra lepromatosa nodular. Arch. Invest. Med.1983;14:127-137
- 19.- Gómez-Estrada H, Ramos-Damián MaE, y Cerda-Ocaña C. Phagocytic activity of rabbit pulmonary macrophages at different temperatures. Arch. Inves. Med,1979:10:15
- 20.- Gómez-Estrada H, García GJL, Aragón MM, Díaz GA, Arellano GJ, Fernández QP: Disfagocitosis neonatal por deficiencia de tetrapéptido. Arch. Invest. Med.1975:6:403-12
- 21.- González-Garza MT and Said-Fernández S. Entamoeba histolytica:Potent in vitro antiamebic effect of gossypol. Experimental Parasitology,1988;66:253-55
- 22.- González-Mendoza A, Meléndez-Ruiz CE y Ramos-Zepeda R. Phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes against cell of Sporothrix schenckii in patients with sporothrichosis. Proc. 5th Internat. Conf on Mycosis Sc.1980:396:308-11
- 23.- Gruszecki W, Masihi Noel K, Kland Labischins H, Bradaczek H. Synthesis and some biological activities of a novel glucofuranose, immunomodulator. Advances in the Biosciences,1988:68:427-51

- 24.- Hamilton TA, TJ Rogers and SC Gilman. Molecular mechanism in the activation of mononuclear phagocytes in immunopharmacology. Eds. Telford press. Calwell NJ, 1988:213-52
- 25.- Hearst JE, Warr GA y Jakab GJ. Characterization of murine lung and peritoneal macrophages. J. Reticuloendothel. Soc. 1980;27:443-53
- 26.- Hsueh W, Kuhn Ch y Nedd-Leman P. Relations hip of prostaglandin secretion by rabbit alveolar macrophages to phagocytosis and lysosomal enzyme release. Biochen. J, 1979;184:345-54.
- 27.- I Gallin John and S Fauci Anthony. Advances in host defense mechanisms. Eds. Raven Press. New York, 1982;1:13-45
- 28.- Janik J. et al. Dose-related immunologic effects of levamisol in patients with cancer. J. Clin. Oncol, 1993;11:125-35
- 29.- Kaur J. et al. Enzyme immuassay of phagocytosis stimulating tetrapeptide "tuftsin" in normal and leprosy sera. Int. J. Lepr. Mycobact Dis. 1991;59:576-81
- 30.- Kaplow LS. Simplified myeloperoxidase stain using benzidin dihydrochloride. Blood. 1965;26:215,16
- 31.- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase hialide hydrogen peroxide antibacterial system. J. Bacteriol, 1968;95:2138-38
- 32.- Kottarapat N, Dileepan Robert, B Lorshach and Daniel J. Stechschulte. Mast cell granules inhibit macrophages-mediated lysis of mastocytoma cell (P815) and nitric oxide production. Journal of Leukocyte Biology, 1993;53:446-53

- 33.- Kownatzi E, A Kapp and Suhrich. Modulation of human neutrophilic granulocyte functions by recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human lymphotoxin: Promotion of adherence inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cell. J.Clin. Exp: Immunol.1988;74:143
- 34.- Kwok-Chuy Lee. Macrophages heterogeneity in the stimulation of cell proliferation. En: Macrophages regulation of immunity.Eds.Unanue ER y Rosenthal AS. Acad. Pres. New York,1980:319-32
- 35.- Lachman PJ. Biology of the complement system. En progres in immunology.V.Eds, by Y-Yamamura y T Tado. Academic press. New York,1983:445
- 36.- Laurent F, AM Benolied, C Capo and Bogrand. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes modulation by adhesive. Stimuli. J. Leukocyte. Biol,1991:49:217
- 37.- L Carpenter Philip. Inmunología. Prensa medica mexicana,1972:223-41
- 38.- Li YF, Booth GM, Segmiller RE. Evidende for embryotoxicity of gossypol in mice and chicks with no evidende of mutagenic activity in the Ame Tes. Reprod. Toxicol.1989;3:59-62
- 39.- Lin YC, Hu YF, Chang G CJ, Brueqgemejer RW and Moh PP. Effects of gossypol on cultured canine prostate epithelial cells. The Faseb Journal,1993;7:A356
- 40.- Marchiani C, Abbougi El A, Roch-Arveiller M, Congy F, Dohan R, Paul JL, Giroud JP and Raichvary D. Polymorphonuclear functions and Biostim. Advances in the Biosciences,1988;68:249

41.- Michael Thomas J. Urate causes the human polymorphonuclear leukocyte to secrete superoxide. Free Radical Biology and Medicine, 1992; 12: 89-91

42.- Meltzer MS, Occionero M, Ruco LP. Macrophages activation for tumor cytotoxic: Regulation mechanisms for induction and control of cytotoxic activity. Fed. Proc, 1982; 41: 2198-2205

43.- Michael A. Trush and Thomas W Kensler. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. Free Radical Biology and Medicine, 1991; 10: 201-9

44.- Moh PP, Chang C JG, Hu FY, Bruegg Emeier RW and Lin YC. Effect of gossypol on 5 α -reductase activity in canine benign prostatic hyperplasia. The FASEB Journal, 1993; 7: A59

45.- Murphy P. The neutrophil. Plenum medical book Co. New York and London, 1976

46.- Meltzer MS, Occionero M, Ruco LP. Macrophages activation por tumor cytotoxicity: Regulatory mechanisms for induction and control of cytotoxicity activity. Fed. Proc, 1982; 41: 2198-2205

47.- Natham CF: Neutrophil activation on biological surfaces. J. Clin. Invest, 1987; 80: 1550

48.- Nelson DS. Macrophages: Progress and problems. Clin. Exp. Immunol, 1981; 45: 225-33

49.- Ohmura H, Chang WY, Araki T and Lin YC. Suppressive effect of gossypolone and serum from gossypol treated rats on progesterone production in cultured porcine granulosa cell. FASEB Journal, 1993;7:A447

50.- Ohsaka A, et al. Increased respiratory burst activity of neutrophils in patients with aplastic anemia: Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Exp Hematol, 1992;20:1090-3

51.- Parra C Rayan I, León H Mendoza H, Masso F, Montaña L. El macrófago como célula efectora. Boletín de educación bioquímica. 1988;7:30-40

52.- Pelczar JM, Jr Chan E CS. Elementos de microbiología. Ed: McGrawhill. 1981:241

53.- Polsky J WM. Clin Res. 1987;35:478A

54.- R Smith Mark, Elizabeth A Ramburg, Hsiang-Fu-Kung and Scott K Durum. Components of the protein kinase C pathway induce Ia expression after infection in to macrophage.

55.- R Kew Richard, Christine M Grimaldi, Martha B Furie and Howard B Fleit. Human neutrophil Fc RIII B and Formyl peptide receptors are phenylalanine-induced chemotaxis. The J. of Immunol, 1992;149:989-97

56.- Ramos-Zepeda R. Ramos-Zepeda R. Ramos-Damian MaE. González-Mendoza M. Estudio de la actividad fagocítica de los leucocitos de gerbiles con esporotricosis experimental tratados con ioduro de potasio. Med. Cut. ILA, 1990;18:278-81

- 57.- Rebut Bonneton C, S Bailly and C Pasquier. Superoxide anion production in glass-adherent polymorphonuclear leukocytes and its relation ship to calcium movement. J.Leukocyte.Biol.1988;44:402
- 58.- Rikihisa-Yasuko, Lin-Young C, L Phillip-Garber and Go-Yan. Taenia taeniaeformis:inactivation of metacestodes by gossypol in vitro. Experimetal parasitology.1990;71:135-45
- 59.- Robbins SL, Contran RS: Patología Estructural y Funcional. Ed. Interamericana.1987:45-50
- 60.- Roitt Ivan. Essential Immunolgy. Ed. Blackwell Scientific Publication.1988:1-10
- 61.- Rojas MW. Inmunología.Ed,CIB,1988:50
- 62.- Ronda E Schreiber, Eric R Prossnitz, Richard D YE, Charles G. Cochrane, Algirdas J. Jesaitis and Gary M. Bakoch. Reconstitution of recombinant N-formyl chemotatic peptide receptor with G protein. Journal Leukociye Biology,1993;53:470-4
- 63.- Seig GM. The embryotoxic and immunodepressive effects of gossypol. Am J. Chin Med.1986:14:110-15
- 64.- Schnar RA and SL Newman. The respiratory burts response to Histoplasma capsulatum yeast and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages cellular cytoskeleton requierement for attachment and ingestion.J. Clin.Inves.1990;85:223

- 65.- Smets P, R Zalisz and F Boisnie. Biostim (RV 41740), immune functions and infection. Advances in the Biosciencies.1988;68:88
- 66.- Southwck FS, GA Dabiri, M Paschetto and SH Zigmonf. Polymorphonuclear leukocytes adherence induce actin polymerization by a transduction pathway which differs from that used by chemoattractans. J.Cell:Biol.1989;109:1561
- 67.- Stossel TP. Phagocytosis. New England. J.Med.1974;290:717-23
- 68.- Strom-Hansent, Cornett C, Jaroszewski JW. Interaction of gossypol with amino acids and peptides is a model of enzyme inhibition. Int.Pept.Protein Res.1989;34:304-10
- 69.-Vladimir Bazil and Vaclav Horejss. Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. J.Immunol.1992;149:747-53
- 70.- Vander Bruggen Tjomme, Paul TM Kok, Jan AM Raaijmakers, Arthur J Verhaeven, Roger GC Kessels, Jan WJ Lammers and Leo Koenderman. Cytokine priming of the respiratory burst in human eosinophils is Ca²⁺ independent and accompanied by induction of tyrosine kinase activity. Journal of Leukocyte Biology.1993;53:347-53
- 71.- Watchara Kasinrerker, Edda Foebiger, Irena Stefanová, Thomas Baumruker, Walter and Hammes Stockinger. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Iy-superfamily. Is the species homologue of Rat OX-47, mouse basigin and chicken HT 7 molecule. J.Immunol.1992;149:847-54

72.- Wu YW, Chik CL and Knazck RA. An in vitro and in vivo study of antitumor effects of gossypol on human SW-13 adrenocortical carcinoma. Cancer Research, 1989;49:3754-3758

73.- Zhongyun Dong, Catherine A, O'Brian and Isaiah J. Fidler. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. J. of Leukocyte Biology, 1993;53:53-60