

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



EFFECTO DEL GOSIPOL SOBRE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA DE
MACROFAGOS PERITONEALES DE GERBILES DE
MONGOLIA IN VITRO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

CARLOS ENRIQUE AGUILAR RIVAS

GUADALAJARA, JALISCO MAYO DE 1995

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.
DIRECTOR DE LA DIVISION DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante Carlos Enrique Aquilar Rivas código 086377632 con el título Efecto del qosipol sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de gerhiles invitro. consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos .

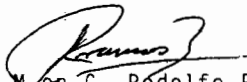
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo .

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 11 de Mayo de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS

EL ASESOR




M. en C. Rodolfo Ramos Z.
NOMBRE Y FIRMA

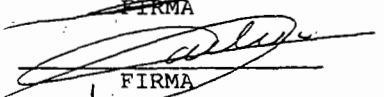
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

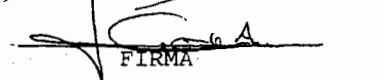
1. DR. Oswaldo Palacios
NOMBRE COMPLETO
2. O. F. B. Adolfo Cárdenas
NOMBRE COMPLETO
3. M. en C. Carlos Alvarez M.
NOMBRE COMPLETO



FIRMA



FIRMA



FIRMA



AGRADECIMIENTOS.

A DIOS

Por permitirme terminar una carrera universitaria y llenarme de su gracia en todo momento gracias .

A Mi MADRE

Por su apoyo y amor , su dulzura y ternura , y por ser simplemente lo que es, la mejor de las madres .

A Mi PADRE

Por estar conmigo cuando lo necesito , ser mi guía en la vida y un ejemplo que quiero seguir .

A Mis HERMANOS

Por ser compañeros en esta hermosa familia y siempre estar unidos en todo lugar y todo momento .

A la Biologa Esther Rocha

Por su alegria, amor, apoyo, así como la ayuda para hacer este trabajo de tesis .

Agradecimiento especial

Al M en C. Rodolfo Ramos Zepeda por hacer que este trabajo fuera posible , por su amistad y pascienciagracias maestro.

A la Q.F.B. Martha Barba

Por su amistad y ayuda en esta tesis .

INDICE GENERAL.

Introducción	-----	1
Hipotesis	-----	9
Objetivos	-----	10
Material y Metodos	-----	11
Resultados	-----	15
Discusion	-----	19
Conclusiones	-----	21
Bibliografia	-----	22

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA No. 1	-----	5
TABLA No. 2	-----	16
TABLA No. 3	-----	16
TABLA No. 4	-----	16
FIGURA No. 1	-----	17
FIGURA No. 2	-----	18

TITULO

Efecto del gosipol sobre la actividad fagocítica de
macrofagos peritoneales (MP) de gérbiles de Mongolia
in vitro.

INTRODUCCION

En los mamíferos existen mecanismos de defensa específicos e inespecíficos contra agentes patógenos. Entre los mecanismos específicos se cuenta con la inmunidad humoral y celular en la que intervienen los linfocitos B y T respectivamente .

La piel y anexos (uñas, pelo, etc)., mucosas, sistema de complemento e interferones, así como la fagocitosis son mecanismos inespecíficos ^{1,2}.

El proceso de fagocitosis es complejo y se realiza en varias etapas: Quimiotaxis, opsonización, adherencia, ingestión, muerte celular.

QUIMIOTAXIS

2

Es la capacidad que presentan las células fagocíticas para migrar hacia un estímulo, o sitio de lesión como respuesta a un gradiente de sustancias quimiotácticas como fracciones del sistema de complemento (C5), productos bacterianos, anticuerpos, etc.^{3,4,5}. Los linfocitos B y T secretan sustancias quimiotácticas específicas para macrófagos, como el factor activador de macrófagos y otras que se liberan en el proceso inflamatorio que tienen la capacidad de incrementar la velocidad de migración de los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos⁴.

OPSONIZACION

Los factores séricos naturales llamados opsoninas, son anticuerpos, principalmente inmunoglobulinas (Ig) de la clase IgG1, IgG3, y el tercer componente del complemento (C3), estos se encargan de recubrir la partícula que ha de ser fagocitada y modifican las paredes microbianas, lo que permite una mejor ingestión por la célula fagocítica^{6,7,8}.

ADHERENCIA

En esta etapa se presenta la interacción de la partícula o agente con el fagocito en presencia o no de opsoninas^{9,10,11}.

INGESTION

La partícula adherida al fagocito es incorporada por medio de la emisión de pseudópodos (prolongaciones de la membrana) para englobar a la partícula por fagocitar y formar el fagosoma^{5,7,12,13}.

DIGESTION Y MUERTE CELULAR

Después de ser ingerido el agente o partícula, los lisosomas se dirigen hacia la membrana del fagosoma. Las enzimas lisosomales son vertidas al interior del fagosoma y entran en contacto con los agentes fagocitados e inducen su lisis.

Las células efectoras del proceso fagocítico son los leucocitos polimorfonucleares neutrofilos PMN y los macrófagos. Los (PMN) se producen en médula ósea y son los granulocitos más abundantes, su función principal es la fagocitosis.

Por su parte los macrófagos tienen como precursores a los monocitos sanguíneos que se producen también en médula ósea^{14,15} (Tabla 1). Los monocitos migran y se depositan en todos los tejidos del organismo^{16,17}.

Los estudios pioneros de fagocitosis fueron hechos por el ruso Elie Metchnikoff en 1883, quien observó que varias especies de invertebrados marinos tenían la presencia de células que contaban con movimiento de tipo ameboide, con la capacidad de ingerir y destruir partículas o microorganismos. En ello radicaba su defensa fundamental^{18, 19, 20}.

La vida media de los PMN es aproximadamente de 12 horas, miden de 8-12 micras de diámetro, contienen numerosas enzimas en sus lisosomas, entre las que se encuentran la mieloperoxidasa (MPO) y la lisozima que tiene poder bactericida y fungicida^{15,21,22}.

Tabla 1. Sistema fagocítico mononuclear.

Célula precursora	Médula ósea
Promocito	Médula ósea
Monocito	Médula ósea
	Sangre periferica
Macrófagos	Histiocito
	Macrófago alveolar
	Cavidad serosa
	(Macrófagos)
	Hueso (Osteoblasto)
	Microglia

La enzima MPO puede formar complejos con peroxido de hidrógeno y halógenos para constituir el complejo MPO-peróxido-halógeno, que es capaz de lisar a los microorganismos que hayan sido fagocitados. La enzima MPO representa en su concentración aproximadamente el 5% del peso seco del PMN^{5,23,25}.

Por su parte, los macrófagos son células que miden de 15-30 micras de diámetro, contienen núcleo en forma arrañonada. La vida media de los macrófagos es más prolongada, puede de ser semanas hasta meses^{5,16,24,26}.

Los macrófagos son similares a los PMN en su comportamiento fagocítico, cuentan con mecanismos bactericidas dependientes e independientes de oxígeno^{12,19,27}.

Además llevan a cabo diversas actividades: participan en la limpieza y cicatrización de heridas, actúan en la destrucción de células envejecidas, en el control de neoplasias, eliminan desechos del organismo^{16,28,29,30}. Protegen al organismo de gérmenes patógenos y regulan la respuesta inmune^{6,20,31}.

Los PMN cuentan con mayor cantidad de MPO y los macrófagos por su parte requieren de una activación previa para poder elevar la cantidad de MPO^{6,32}.

Existen diversos métodos para estudiar el proceso fagocítico. La ingestión puede valorarse por medio de la fagocitosis de *C. albicans* o *S. schenckii*, bacterias o partículas inertes^{39,40,41}. La lisis y digestión por la sobrevida de los agentes fagocíticos, a través de observaciones microscópicas o bien por cultivos microbiológicos⁴².

El metabolismo oxidativo a través de la medición de los metabolitos del oxígeno⁴³; de la cadena de transporte electrónico, por medio de la reducción de nitroazul-tetrazolio (NAT)⁴⁴, o por el método de quimioluminiscencia⁴⁵. Así como también por la determinación de la enzima MPO⁴⁶.

La actividad fagocítica es susceptible de modificarse ya sea por una infección o bien por diversas sustancias entre las que se encuentran levamisol, lipopolisacárido y gosípol^{45,47,48}.

Por otra parte, el gosípol (1,1',6,6',7,7', hexahidroxi-5,5'-diisopropil-3,3'-dimetil- (2,2'-binaftaleno)-8,8'-dicarbolilaldehído, con peso molecular de 518, es un compuesto de tipo fenólico de color amarillo, que está presente en la planta de algodón, principalmente en la semilla³³.

En China se describieron inicialmente sus propiedades antifertilizantes, las cuales han sido estudiadas en humanos y animales de experimentación entre los que se encuentran ratones, ratas, hamsters y primates³⁴.

Además se sabe que el gosípol actúa como desacoplador de la fosforilación oxidativa, inhibe la cadena respiratoria en mitocondrias, reduce la producción de adenosin trifosfato, actúa sobre diversas enzimas de la cadena de transporte electrónico³⁵.

Así mismo se le atribuyen propiedades antiparasitarias^{33,36}, antitumorales³⁴, inmunosupresoras³⁷ e inhibidoras de la enzima mieloperoxidasa (MPO) de neutrofilos humanos⁸, afecta la actividad de la fosfolipasa en el espermatozoide humano en concentraciones de 10 μM y 100 μM ⁴⁹. Se informa que también inhibe la movilidad del espermatozoide de ratas⁵⁰.

En estudios *in vitro* el gospol y sus derivados ha sido experimentado en *hamster* y se observó que afecta la fertilidad en el macho^{51,52}. También se ha utilizado como anticonceptivo vaginal en *Macaco aereoides*⁵³. En cobayos el gospol inhibe la maduración del espermatozoide *in vitro*⁵⁴. Pero se desconoce si el gospol tiene efectos sobre la actividad fagocítica, fungicida y oxidativa de los neutrofilos y de los macrófagos tanto de humanos como de animales de experimentación.

HIPOTESIS

El gosípol disminuye la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de gérbiles de mongolia *in vitro*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto del gosispol *in vitro* sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de gérbiles de mongolia.

OBJETIVOS PARTICULARES

A. Cuantificar el indice fagocítico (IF) de los macrófagos peritoneales tratados con gosispol *in vitro*.

B. Obtener el indice digestivo (ID) de los macrófagos peritoneales tratados con gosispol *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron gérbiles de Mongolia de 12-16 semanas de edad con un peso de 60-70 gramos; alojados en jaulas de policarbonato con cama de aserrín, en ambiente con temperatura y humedad controlada; ciclos de luz de 12 hrs. (condiciones de bioterio). Alimentados con purina para roedores y agua para consumo voluntario.

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 hrs. Posteriormente se resembró en caldo cerebro corazón a 37°C por 24 hrs. El cultivo fue centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos. El paquete celular se lavó tres veces con solución salina al 0.87% estéril (ss).

Las levaduras se contaron en cámara de Neubauer y se llevaron a una concentración de 10^6 levaduras de *C. albicans* suspendidas en 1 ml. de ss.

GOSIPOL

Se prepararon tres concentraciones de gosispol (Sigma G-4382), 1 μM , 10 μM , 100 μM en solución balanceada de Hank (SBH) ⁵⁵, pH 7.2.

Se mantuvieron las concentraciones de gosispol en tubos de ensayo en refrigeración a 5°C hasta el momento de ser utilizadas a temperatura ambiente.

OBTENCION DE MACROFAGOS

A los gérbiles se les inyectaron 6 Ul de heparina sódica por gramo de peso; por vía intraperitoneal. Después de 15 minutos los animales fueron anestesiados con éter anhidro. Por punción cardiaca se extrajo la sangre . Una vez obtenida se aplicaron 8 ml de buffer salina fosfatos pH 7.2 (BSF) en la cavidad peritoneal. Se le dió un ligero masaje en el abdomen y se extrajo el líquido inyectado que contenía en suspensión a los macrófagos peritoneales (MP) ⁵⁵. La suspensión de MP se llevó a una concentración de 10^6 MP/ml; se colocaron en tres tubos de ensayo numerados 1, 2 y 3 y a cada uno se le agregó 1 ml de cada concentración de gosispol 1 μM , 10 μM , 100 μM respectivamente. A los tubos 1,2 y 3 se les agregaron 10^6 MP y fueron colocados en un rotor giratorio 22 para evitar que los MP se adherieran al vidrio y tuvieran una mejor combinación con la concentración del gosispol, esto durante 15 minutos; transcurrido este tiempo se lavaron los MP tres veces con BSF.

Después de lavar los MP se realizó el método de Cunningham modificado^{56,57,58}, para valorar la actividad fagocítica.

Se procedio de la siguiente manera: se emplearon dos cubreobjetos de 22x22 mm previamente desengrasados con alcohol y se fijaron con resina a un tapón de hule. Se colocaron 0.50 ml de la suspensión de MP con BSF. Se colocaron en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos. Posteriormente los cubreobjetos fueron lavados cuidadosamente con BSF a 37°C para eliminar las células no adheridas al vidrio. Sin dejar secar los cubreobjetos se les agregaron a cada uno 0.50 ml de plasma autólogo diluido al 20% en SBH, que contenía 10^6 de levaduras de *C. albicans* por ml. Se incubaron nuevamente a 37°C por 15 minutos. Se lavaron a continuación con SBH, se dejaron secar al aire y se tiñeron por el método de Wriyth.

Después de teñidos los cubreobjetos, se despegaron del tapón, se montaron en portaobjetos de manera que las células quedaran entre el cubreobjeto y el portaobjeto utilizando resina para su fijación. Se observaron al microscopio de luz con el lente 100x.

VALORACION DE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA

Se contaron 300 macrófagos peritoneales (MP). Se contó el número de levaduras ingeridas por cada fagocito y se diferenciaron las que estaban integras de las lisadas dentro de las células.

Las levaduras digeridas se observaron como vacuolas ópticamente vacías, las cuales fueron descritas por Cunnigham como fantasmas.

Los resultados se reportaron como: a) Índice de fagocitosis (IF), el promedio de levaduras ingeridas dividido entre el número de células contadas. b) Índice de digestión (ID), el promedio de levaduras digeridas entre el número de células contadas. c) El porcentaje de células que fagocitan.

RESULTADOS

En la Tabla 2 y Gráfica 1 se muestran los porcentajes de macrófagos que tuvieron actividad fagocítica. Puede observarse que ésta disminuye significativamente ($p < 0.001$), de manera inversamente proporcional a la concentración de gosipol 1 μM , 10 μM y 100 μM .

En la Tabla 3, Gráfica 2 se presentan los IF de los macrófagos de gérbiles al ser tratados con gosipol. En la misma Gráfica 2 y Tabla 4 se encuentran sus ID . Tanto en el IF como en el ID se presentó disminución significativa ($p < 0.001$) en relación con los testigos. En ambos casos la disminución fue inversamente proporcional a las concentraciones de gosipol utilizados .

Tabla 2.- ACTIVIDAD FAGOCITICA DE MACROFAGOS DE GERBILES, TRATADOS CON GOSIPOL "in vitro".

GOSIPOL	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
% ACTIVIDAD FAGOCITICA "P"*	91 \pm 8	72 \pm 12 < 0.001	46 \pm 12 < 0.001	22 \pm 15 < 0.001

* Testigo vs gosipol.

Tabla 3.- INDICE FAGOCITICO DE MP DE GERBILES TRATADOS "IN VITRO" CON GOSIPOL.

GOSIPOL	0 μ M (1)	1 μ M (2)	10 μ M (3)	100 μ M (4)
IF	1.41 \pm 0.27	0.97 \pm 0.25	0.77 \pm 0.22	0.16 \pm 0.27
P1		< 0.001	< 0.001	< 0.001
P2			< 0.010	< 0.001
P3				< 0.010

P1 = 1 vs 2,3,4.

P2 = 2 vs 3,4.

P3 = 3 vs 4.

Tabla 4.- INDICE DIGESTIVO DE MP DE GERBILES, TRATADOS "in vitro" CON GOSIPOL.

GOSIPOL	TESTIGOS	1 μ M	10 μ M	100 μ M
ID	1.14 \pm 0.28	0.77 \pm 0.22	0.56 \pm 0.20	0.11 \pm 0.19
P1		< 0.001	< 0.001	< 0.001
P2			< 0.001	< 0.001
P3				< 0.001

P1 = 1 vs 2,3,4.

P2 = 2 vs 3,4.

P3 = 3 vs 4.

Fig. 1.- Porciento de MP con actividad fagocítica.

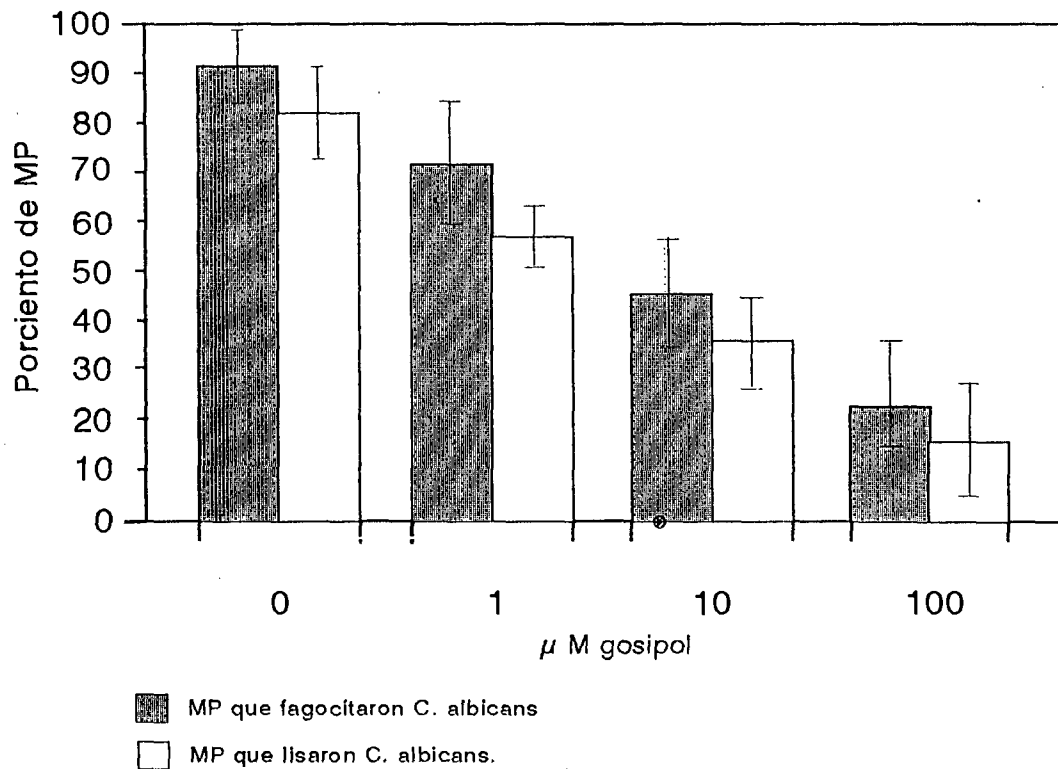
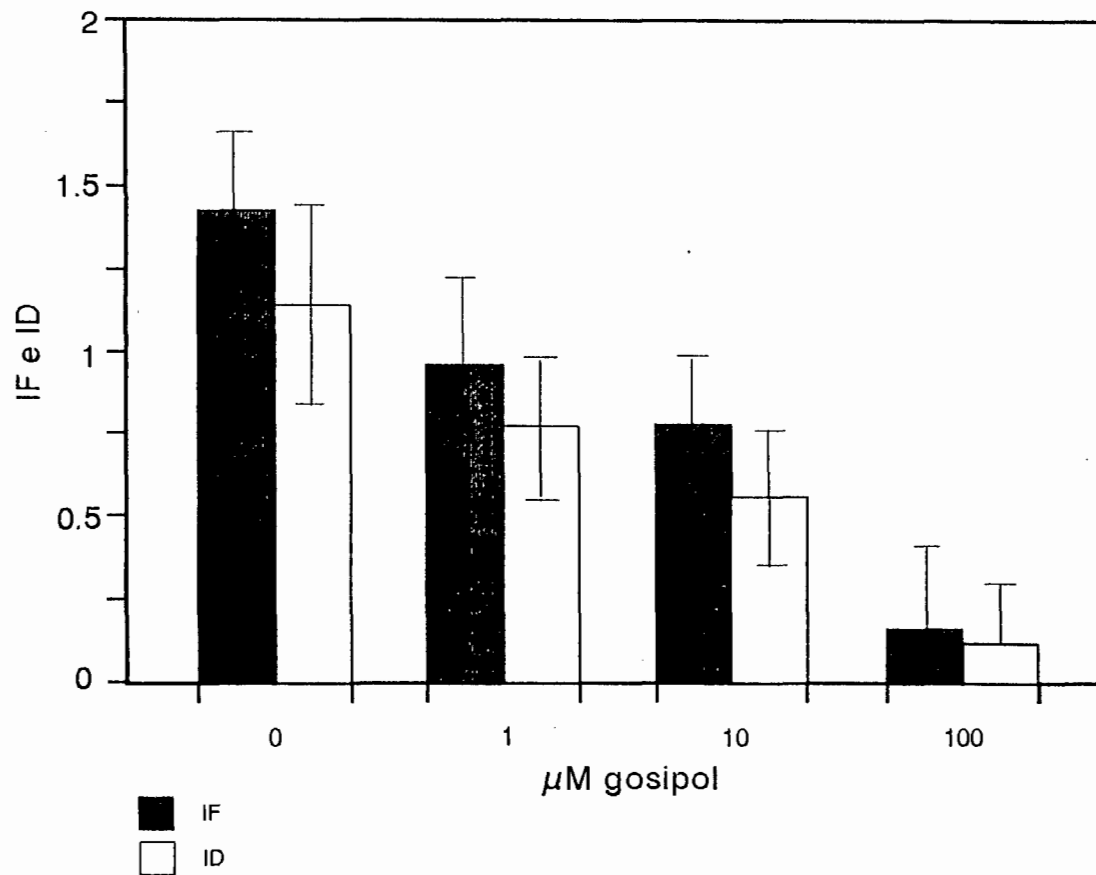


Fig. 2.- Actividad fagocitica de MP tratados con gosipol.



DISCUSION

El efecto del gosipol sobre la actividad de las células fagocíticas, a sido poco estudiado³⁸. Se cuenta con un antecedente de dicho efecto *in vivo* sobre la actividad de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, en él se informa una disminución en el contenido de la enzima MPO³⁸. Dicha enzima es importante en los mecanismos microbicidas de los fagocitos, principalmente en el que participan la MPO, peróxido de hidrógeno y halógeno (Cl o I)²⁸.

Al respecto en el presente trabajo no se observó modificación en el contenido de MPO en los macrófagos, debido a que estos eran macrófagos residentes y no se encontraban activados^{60,61}. La activación es indispensable para que muestren actividad de MPO y al ser previamente activados el efecto que pudiera ejercer el gosipol sobre el contenido de la enzima ya no sería detectable, puesto que el contacto de este compuesto con los macrófagos sería posterior a la activación y la MPO ya habría sido producida.

Por otra parte, se observó que el gosipol tiene un efecto inhibitor tanto a nivel del IF como del ID, sobre los macrófagos peritoneales de garbilles. Asi mismo disminuyó el porcentaje de células con actividad fagocítica, esta disminución fue más marcada conforme se aumento la concentración de gosipol.

Independientemente de la disminución de la actividad fagocítica de los macrófagos, se observó que su adherencia al vidrio se vio también disminuida de manera considerable, conforme se aumentó la concentración de gosisol. Los resultados obtenidos de la cuantificación de la adherencia, realizada a través del microscopio de luz con el lente 40x, contando 20 campos de cada placa por concentración de gosisol (0, 1, 10, 100 μM) fueron los siguientes: 0 μM 192 \pm 20 macrófagos/campo, 1 μM 169 \pm 41 macrófagos/campo, 10 μM 76 \pm 12 macrófagos/campo y 100 μM 10 \pm 9 macrófagos/campo. Como puede observarse la disminución de la adherencia es altamente significativa ($p < 0.001$) en todos los casos en relación con el grupo testigo. Hasta el momento no tenemos precisada la forma en la que el gosisol altera la capacidad de adherencia de los macrófagos. Obviamente es a nivel de membrana, pero desconocemos si es exclusivo del cambio de cargas que alteran el potencial de las células o bien por bloqueo de algunas *adhesinas* involucradas en la adherencia⁵⁹.

CONCLUSIONES

La aplicación *in vitro* del gossipol en concentraciones de 1 μM , 10 μM y 100 μM sobre MP de gérbiles de Mongolia modificó la capacidad de ingestión de manera estadísticamente significativa.

Así como también alteró la capacidad de los MP para adherirse al vidrio disminuyéndola notablemente.

Estos datos pueden tomarse en cuenta como otras de las alteraciones que provoca el gossipol sobre las células *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

- 1 .- Michael A, Trush and Thomas W Kensler. An overview of the relation ship between oxidative stress and chemical carcinogenesis . Free Radical Biology and Medicine 1991; 10:201-209 .
- 2 .- Kaplow L S . Simplified myeloperoxidase stain using benzidin dihydrochloride . Blood , 1965;26:215-216.
- 3 .- Ronda E Schreiber, Eric R Prossnitz, Richard D Ye, Charles G. Cocharane, Algirdas J. Jesaitis and Gary M. Bakoch. Resconstitution of recombinant N-formyl chemotatic peptide receptor with G protein . Journal Leukocyte Biology , 1993;53:470-474 .
- 4 .- Bellanti JA. Inmunologia Ed. Interamericana, 1988;21-29.
- 5 .- L Carpenter Philip. Inmunologia . Prensa medica mexicana , 1972:223-241 .

6 .- Rebut Bonneton C; Bailly S and C Pasquier . Superoxide anion production in glass-adherent polymorphonuclear leukocytes and its relationship to calcium movement . J.Leukocyte. Biol, 1988; 44:402 .

7 .- De la Vega G. El neutrofilo en la defensa del organismo . Patología, 1973; 2:49-56.

8 .- Polsky J WM. Clin Res , 1987; 35:478 .

9 .- 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 chemotatic migration and superoxide anion release from adheret cell. J.Cin. Exp:Immunol, 1988; 74:143.

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

11.- Watchara Kasinrerak , et al. 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;149:847-854.

12.- Rikihisa-Yasuko, Lin-Young C, L Philip-Garber and Go-Yan. *Taenia taeniae formis*: inactivation of metacestodes by gossypol *in vitro* . *Experimental parasitology*, 1990;71:135-145.

13.- Schnar RA and SL Newman . The respiratory bursts response to histoplasma capsulatum yeast and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J.Clin.Inves*, 1990;85:223.

14.- Pelczar JM, JR Chan E CS. *Elementos de microbiologia*. Ed: McGrawhill, 1981:241 .

15.- Anegón +X'Xio, Blottiere Hervé, Cuturi Ma C, et al. Characterization of a human monocyte antigen, B148.4, regulated during cell differentiation and activation . *Journal of Leukocyte Biology*, 1993;53:390-318 .

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

17.- González-Garza MT and Said-Fernández S. Entamoeba histolytica: Potent *in vitro* antiamebic effect of gossypol . Experimental Parasitology, 1988;66:253-255.

18.- Meltzer MS, Ochionero M, Roco LP. Macrophages activation for tumor cytotoxicity activity. Fed. Proc. 1982;41:2198-2205.

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

20.- Ramos-Zepeda R., Ramos-Damian Ma.E., González-Mendoza M.. Estudios de la actividad fagocítica de los leucocitos de gérbiles con esporotricosis experimental tratados con ioduro de potasio. Med. Cut. ILA, 1990;18:278-281.

21.- Vander Bruggen T., Kok Paul TM., et al. 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;53:347-353.

22.- Adams DO, Hamiltón TA, The cell biology of macrophage activation. *Annw. Rev. Immunol*, 1984;2:283.

23.- Marchiani C, Abbogui EL A, Roch-Aveiller M, Congy F, Dohan R, Paul JL, et al. Polymorphonuclear functions and biostim. *Advances in the Biosciencies*, 1988;68:244.

24.- Hsuch W, Kuhn Ch and Nedd-Leman. Relationship of prostaglandine secretion by rabbit alveolar macrophages to fagocytosis and lysosomal enzyme release. *Biochen. J*, 1979;184:345-354.

25.- Gómez-Estrada H, García GJL, Aragón MM, Díaz GA, Arellano GJ, Fernández QP: Disfagocitosis neonatal por deficiencia de tetrapéptido. *Arch. Invest. Med.* 1975;6:403-412.

26.- Meltzer MS, Ochionero M, Ruco LP, . Macrophages activation for tumor cytotoxic. Regulation mechanims for infection and control of cytotoxic activity. *Fed. Proc.* 1982;41:2198-2205.

27.- Nelson DS. Macrophages: Progress and problems. *Clin. Exp. Immunol*, 1981;45:225-233.

28.- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase hialide hidrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol*, 1968;95:2138.

29.- Blusse A, Van Oud A, and Van Furt R. Origen kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. J. Med. 1979;149:1504.

30.- Nathan CF: Neutrophil activation on biological surfaces. J. Clin. Inves. 1987;80:1550.

31.- Furth UR, Reaburn AJ, Zwet UTL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. Blood, 1979;54:485-500.

32.- R Smith Mark, Ramburg EA, Fu-Kung H. and Durum SK. Components of protein kinase C pathway induce Ia expression after infection into macrophage.

33.- Blanco A, Aoli A, Montamat EE, Rovali LE. 1981 . Effect of gossypol upon movility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Protozool, 30:648-651.

34.-Wu Y-W, Chick CL, Knazek RA. 1989. An *in vitro* and *in vivo* study of antitumoral effects of gossypol an human SW-13 adrenocortical carcinoma. Cancer res. 49: 3754-3758 .

35.- Strom-Hansen T, Cornett C, Jaroszewsk JW. Interaction of gossypol with amino acids and peptides a model of enzyme inhibition. Int. J. Pent. Protein Res. 1989;34:306-310.

36.- Rikihiza Y, Lin YC, Garber PL, Gu Y. *Taenia taenia formis*: Inactivation of metacestodes by gossypol in vitro. Exp. Parasitol. 1990;71:135-145.

37.- Amadov N, Yu GF, Ya AV. Microbial ecology of intestine and its modulation induced by immunodepressants. antibiot. Khimiater. 1989;34:453-457.

38.- Fitzpatrick LR, Bostwick JS, Renzetti M, Pendleton RG, Deckton DL. Antiinflammatory affects of various drugs on acetic acid induced colitis in the rat. Agents actions. 1990;30:393-402.

39.- Lehrer RI, Cline MJ. Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils. J.Clin.Invest. 1972;51:2566-2572.

40.- Cunningham KM, Blumer GS, Rhoades ER. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporotrix schenckii*. J. Infect. Dis. 1979;140:815-817.

41.- Stossel T P. Phagocytosis. N. Eng. J. Med. 1974;290:717-723.

42.- Phillips T A, Kujub D A, Mackay R J, et al. The mouse macrophages activation-associated marker protein p 71/73 is an inducible prostaglandin endoperoxide synthase. (*ciclooxygenase*). J. Leukoc Biol. 1993;53:411-419.

43.- Park B H, Fikrig S M, Thwick E M. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic aid. Lancet. 1968;7:532-534.

44.- Bravo-Cuellar A, Homo-Dolarche F, Cabannes J, et al. Changes in activity of murine peritoneal cells after aclacinomycin. Characteristics of the enhanced respiratory burst. Cancer res. 1990;48:3440-3444.

45.- Kaplow L S, Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood. 1965;26:215-217.

46.- González-Mendoza A, Meléndez-Ruíz C E, Ramos-Zepeda R. Phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes against cells of *Sporotrix schenkii* in patients with sporotrichosis. Proc. 5th. Internat. Conf. on Mycoses Scpub. 1980;396:308-311.

47.- Grand-Perret T, Bravo-Cuellar A, Orbach-Arbouys S. et al. Changes in murine peritoneal cell activity after administration of diethyldithiocarbamate. Int. J. Immunotherapy. 1990;6:215-220.

48.- Vainio P, Thurén T, Wichman K, et al. Hydrolysis of phospholipid monolayers by human spermatozoa. Inhibition by male contraceptive gossypol. *Biochimica et Biophysica acta*. 1985;814:405-408.

49.- Ke Y B, Tso W W. Variations of gossypol susceptibility in rat spermatozoa during spermatogenesis. *Int. J. Fertil.* 1982;27:42-46.

50.- Hoffer A, Agarwal A, Meltzer P, Herlihy P, et al. Ultrastructural, fertility, and spermicidal studies with isomers and derivatives of gossypol in male *hamsters*.

51.- Waller D P, Bunyaphatsara N, Martin A, Vournazos C J, et al. Effect of (+) gossypol on fertility in male *hamsters*. *J. Androl.* 1983;4:276-279.

52.- Cameron S, Waller D P, Zaneveld L. Vaginal spermicidal activity of gossypol in the *Macaca aereoides*. *Fertility and Sterility*. 1982;37:273-274.

53.- Shi Q X, Friend D S. Gossypol-induced inhibition on *Guinea Pig* sperm capacitation *in vitro*. *Biol. of reprod.* 1983;29:1027-1032.

- 54.- Rojas M W, *Inmunología*. Ed, CIB,1988;50.
- 55.- Gómez-Estrada H, Morales-Ortiz R, et al. Deficiencia de peroxidasa en histiocitos de pacientes con lepra lepromatosa nodular. *Arch. Invest. Med.* 1983;14:127-137.
- 56.- Cunningham K M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporotrix schenkii*. *J. Infect. Dis.* 1979;140:815-817.
- 57.- Bates E, Ferrante A, Harvey D, Poulos A. Polyunsaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. *J. Leukoc. Biol.* 1993;53:420-426.
- 58.- Koller C, King G, Hurtubise P E, Sagone A, Lobuglio A. Characterization of glass adherent human mononuclear cells. *J. Immunol.* 1973;111:1610-1612.
- 59.- Schlossman S F, Bousmell L, Gilks W, Harlan J M, Kishimoto T, Morimoto C, et al. CD antigens 1993. *immunology today* . 1994;15:98-99.
- 60.- Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. *Immunology today.* 1994;15:100-101.

61.- Nauseef W M, Metcalf J A, Root R K. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. Blood.1983;61:483-492.