

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA  
EN EL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO MEDIANTE  
EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS B4, C4, E4 Y D4  
E INTERLEUCINA 1 BETA, INTERLEUCINA 6 Y  
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

Por

PAULA CORDERO PEREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Química Biomédica

Noviembre, 1999

PAULA CORDERO PEREZ

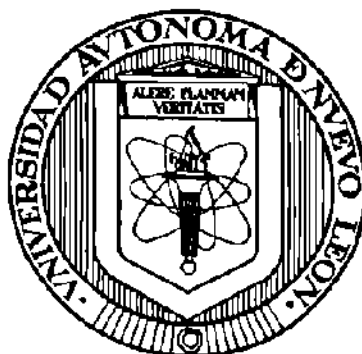
TD  
RC121  
.A5  
C6  
c.1



1080090238

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL ABSCESO  
HEPÁTICO AMIBIANO MEDIANTE EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS  
B4,C4,E4 Y D4 E INTERLEUCINA 1 BETA, INTERLEUCINA 6 Y FACTOR DE  
NECROSIS TUMORAL ALFA.**

**Por**

**PAULA CORDERO PEREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica**

**Noviembre, 1999**

TD  
RC121  
- AS  
C6



**RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL ABSCESO  
HEPÁTICO AMIBIANO MEDIANTE EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS  
B4,C4,E4 Y D4 E INTERLEUCINA 1 BETA, INTERLEUCINA 6 Y FACTOR DE  
NECROSIS TUMORAL ALFA.**

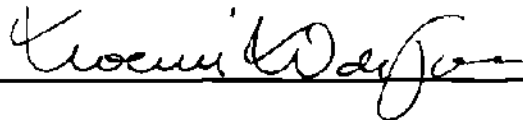
**ACEPTADOS**

Aprobación de la Tesis:



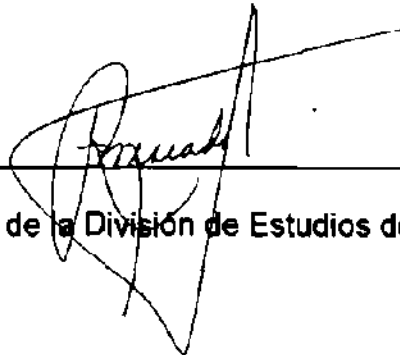
---

**Asesor de la Tesis**



---

**Co-asesor de la Tesis**



---

**Jefe de la División de Estudios de Postgrado**

**RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO MEDIANTE EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> Y E<sub>4</sub> E INTERLEUCINA 1 $\beta$ , INTERLEUCINA 6 Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL  $\alpha$**

**Aprobación de la Tesis:**




---

**DRA. PhD. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA**  
Presidente



---

**DR. CARLOS EDUARDO MEDINA DE LA GARZA**  
Secretario



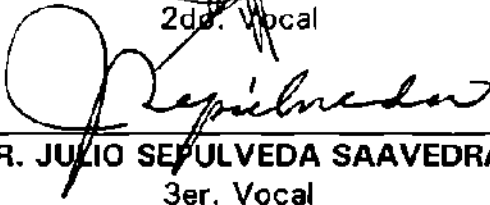
---

**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**  
1er. Vocal



---

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA**  
2da. Vocal



---

**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Respuesta Inmune de la Unidad de Hígado y en el Laboratorio de Extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa y co-asesoría de la Dra. Noemi Waksman de Torres.**



## **DEDICATORIA**

**A Dios por haberme dado la oportunidad de terminar una meta más en mi vida.**

**A mis padres Severiano y Paula por apoyarme en todo lo que yo he emprendido y por ser mis mejores amigos.**

**A mi esposo Jorge Luis por haberme apoyado y brindarme su comprensión en todo momento.**

**A mis hermanos Severiano, Rosa Elva, Jose Luis y María del Socorro por apoyarme y haber sido pacientes conmigo.**

**A Lizbeth Abigail**

**A todos mis maestros**

**A la mujer**

**Porque en las grandes decisiones de mi vida profesional siempre ha estado relacionada con el apoyo y consejo de una de ellas.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi madre por darme el mejor ejemplo de entereza y valores a seguir día con día y por ser siempre mi mejor amiga.**

**A la Dra. Linda Elsa Muñoz por haber sido mas que mi asesora una persona sensible que me supo guiar tanto en mi vida profesional como personal y a la que deberé siempre parte de lo que he logrado ser hasta hoy y estaré siempre agradecida.**

**A la Dra. Noemi Waksman de Torres por haberme permitido lograr uno de mis sueños al aceptarme dentro de su programa de Química Biomédica y por brindarme su confianza y su amistad durante esta etapa de mi vida.**

**A la Dra. Guadalupe Gallegos por sembrar en mi desde estudiante la inquietud de hacer investigación y por brindarme su amistad**

**Al Dr. Francisco J. Martínez por su critica siempre constructiva para mi trabajo y formación profesional así como por su amistad.**

**Al Dr. Carlos E. Medina por su amistad y su apoyo durante el tiempo que tenemos de trabajar en conjunto.**

**A la Dra. Alma Yolanda Arce y al Dr. Julio Sepulveda** por sus críticas constructivas para mi trabajo de tesis.

A mis **amigas** Virginia, Gloria, Angeles, Laura Rdz, Laura Mtz, Lupita, Cruz, Concepción, Leticia Ortiz, Irma Calderon y Rosy Eguía por darme siempre su amistad incondicional. Y a mis **amigos** José, Angel, Juan Pedro y Eloy por brindarme su confianza y amistad.

Al personal de la **Unidad de Hígado**: Paty, Mardia, Manuel, Irma, Isaias y Lupita por haberme apoyado durante la realización de mi tesis.

Al **Dr. Alfredo Pyñero López** por las facilidades dadas para la realización de mi trabajo experimental.

Al personal del **Departamento de Farmacología y Toxicología**:

M.C. María de la Luz Salazar

QCB. Magda Gómez

Laboratorio de Extracción

Laboratorio de Cromatografía

Por el apoyo recibido de forma incondicional.

A la Dirección de nuestra Facultad en especial al **Dr. Jesús Ancer Rodríguez** por el apoyo otorgado para la realización de mi tesis.

Al **la Unidad de Hígado**, al programa **PAICYT Proyecto (SA-105)** y al **CONACYT (Proyecto 565-0/PAD)** por los apoyos otorgados para la realización de mi tesis. Al **CONACYT** por la beca otorgada.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>I. INTRODUCCION. . . . .</b>	<b>1</b>
1.1 La respuesta inflamatoria. . . . .	1
1.2 La respuesta inflamatoria en el absceso hepático amibiano. . . . .	3
1.3 Las Citocinas. . . . .	5
1.3.1 Las citocinas en el absceso hepático amibiano. . . . .	8
1.3.2 Análisis de las citocinas . . . . .	10
1.3.3 Análisis de las citocinas por ELISA . . . . .	11
1.4 Las proteínas de fase aguda. . . . .	12
1.4.1 Las proteínas de fase aguda en el absceso hepático amibiano . .17	
1.4.2 Análisis de las proteínas de fase aguda en el AHA . . . . .	19
1.5 Los leucotrienos . . . . .	21
1.5.1 Metabolitos del ácido araquidónico . . . . .	21
1.5.2 Los leucotrienos en el absceso hepático amibiano . . . . .	23
1.5.3 Análisis de los leucotrienos. . . . .	24
1.5.4 La cromatografía en el análisis de los leucotrienos. . . . .	26
1.5.4.1 Validación de un método cromatográfico. . . . .	28
1.6 Importancia y originalidad del trabajo. . . . .	30

1.7 Hipótesis. . . . .	31
1.8 Objetivo general. . . . .	31
1.8.1 Objetivos específicos . . . . .	32
<b>II. MATERIALES Y METODOS . . . . .</b>	<b>34</b>
2.1 REACTIVOS Y SOLVENTES. . . . .	33
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO. . . . .	36
2.2.1 Suero, plasma y orina de pacientes con AHA. . . . .	36
2.2.2 Suero, plasma y orina de pacientes con AHA en fase de post-recuperación. . . . .	36
2.2.3 Suero, plasma y orina de sujetos control. . . . .	36
2.3 EQUIPO. . . . .	37
2.4 METODOS. . . . .	38
2.4.1 Grupo de pacientes. . . . .	38
2.4.2 Grupo control. . . . .	38
2.4.3 Criterios de inclusión. . . . .	38
2.4.4 Criterios de exclusión. . . . .	39
2.5 Determinación de proteínas de fase aguda. . . . .	39
2.6 Determinación de citocinas. . . . .	40
2.6.1. Preparación de soluciones para IL-1 $\beta$ . . . . .	41
2.6.1.1 Preparación de los estándares para IL-1 $\beta$ . . . . .	42

2.6.1.2. Determinación de IL-1 $\beta$ .	42
2.6.2 Preparación de soluciones para IL-6.	43
2.6.2.1 Preparación de los estándares para IL-6.	43
2.6.2.2 Determinación de IL-6.	44
2.6.3 Preparación de soluciones para FNT $\alpha$ .	44
2.6.3.1 Preparación de los estándares para FNT $\alpha$ .	45
2.6.3.2 Determinación de FNT $\alpha$ de alta sensibilidad	45
2.7. DETERMINACION DE LEUCOTRIENOS.	46
2.7.1 Preparación de soluciones.	46
2.7.2 Optimización de los parámetros cromatográficos	47
2.7.3 Selección del método de extracción	
en fase sólida.	48
2.7.4 Soluciones de trabajo para las curvas de calibración.	49
2.7.4.1 Aplicación del método seleccionado como el proceso	
de extracción (método 2) en las muestras	
de orina del grupo control para la obtención de	
las curvas de calibración.	49
2.7.5 Validación del método.	50
2.7.5.1 Determinación de la linealidad y la precisión	
del método	50
2.7.5.2. Sensibilidad.	52
2.7.5.3 Exactitud.	52

2.7.5.4	Robustez. . . . .	52
2.7.6	Aplicación del método validado a las muestras de orina de los tres grupos de estudio (AHA,GPR y GC). . . . .	53
2.8	Análisis estadístico. . . . .	54
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>55</b>
3.1	Constitución de los grupos de estudio. . . . .	55
3.2	Expediente clínico para ingreso al protocolo de investigación. . . . .	55
3.3	Determinación de las proteínas de fase aguda. . . . .	56
3.3.1	Curvas de calibración de las proteínas de fase aguda. . . . .	56
3.3.2	Cuantificación de las proteínas de fase aguda . . . . .	60
3.3.3	Valores promedio de las proteínas de fase aguda. . . . .	66
3.4	Determinación de citocinas. . . . .	67
3.4.1	Curvas de calibración de las citocinas IL1 $\beta$ , IL6 y FNT $\alpha$ . . . . .	68
3.4.2	Cuantificación de las citocinas. . . . .	71
3.4.3	Valores promedio de la cuantificación de la citocinas. . . . .	73
3.5	Análisis de leucotrienos. . . . .	75
3.5.1	Optimización de los parametros cromatográficos. . . . .	75
3.5.2	Evaluación de los sistemas de extracción. . . . .	80
3.5.3.	Sensibilidad. . . . .	84
3.5.4.	Robustez. . . . .	84

3.5.5. Determinación de los LTS en los pacientes con AHA, GPR y GC. . . . .	86
3.6 Correlación de los niveles de citocinas con las PFA. . . . .	87
3.7 Correlación de las citocinas con los LTS en los grupos de estudio. . . . .	88
<b>IV. DISCUSION . . . . .</b>	<b>89</b>
<b>V. CONCLUSIONES. . . . .</b>	<b>101</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS . . . . .</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS . . . . .</b>	<b>104</b>
<b>APENDICES . . . . .</b>	<b>121</b>
APENDICE A.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO . . . . .	122
APENDICE B.- EXPEDIENTE CLINICO . . . . .	124



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Proteínas de fase aguda en enfermedades inflamatorias. . . . .	17
II. Comparación de parámetros de análisis de dos proteínas de fase aguda. . . . .	21
III. Biometría hemática y pruebas de funcionamiento hepático en pacientes con absceso hepático amibiano en la fase aguda. . . . .	56
IV. Estándares utilizados para obtener las curvas de calibración de las proteínas de fase aguda. . . . .	57
V. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda en el grupo con AHA, GPR y GC (C3, PCR y HPT) . . . . .	62
VI. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda en el grupo con AHA, GPR y GC (TRF y CER) . . . . .	64
VII. Niveles de proteínas de fase aguda. . . . .	66
VIII. Estándares utilizados para obtener las curvas de calibración de las citocinas. . . . .	68
IX. Concentraciones séricas de las citocinas en el grupo con AHA, GPR y GC. . . . .	72
X. Niveles de citocinas. . . . .	73
XI. Parámetros cromatográficos de separación. . . . .	78
XII. Porcentajes de recuperación de la extracción en fase sólida empleando cartuchos SepPack C-18. Estimación en base áreas. . . . .	80
XIII. Límites de detección y cuantificación obtenidos para el análisis de los leucotrienos por el método desarrollado. . . . .	84
XIV. Resultados de los ensayos realizados para valorar la robuztes del método. . . . .	86
XV. Determinación de los LTS en los pacientes con AHA, GPR y GC. . . . .	87

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Sistema amplificador de los métodos de ELISA de sensibilidad alta para citocinas. . . . .	12
2. Cascada del ácido araquidónico vía lipooxigenasa. . . . .	23
3. Estrategia para la determinación de las proteínas de fase aguda en el suero de los pacientes con AHA, GPR y GC por nefelometría. . . . .	40
4. Diagrama de la estrategia para la determinación de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$ en suero de pacientes con AHA, GPR y GC por la técnica de ELISA. . . .	41
5. Diagrama de los métodos planteados para el proceso de extracción de los leucotrienos. . . . .	48
6. Diagrama de la estrategia para la extracción en fase sólida y separación de LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> y LTE <sub>4</sub> en orina de sujetos del GC adicionada con estándares de leucotrienos por la técnica de CLAR-FR. . . . .	50
7. Curva de calibración de ceruloplasmina. . . . .	57
8. Curva de calibración de la fracción C3 del complemento. . . . .	58
9. Curva de calibración de haptoglobina. . . . .	58
10. Curva de calibración de transferrina. . . . .	59
11. Curva de calibración de proteína C reactiva. . . . .	59
12. Niveles de las proteínas de fase aguda. . . . .	67
13. Curva de calibración de IL-6. . . . .	68
14. Curva de calibración de IL-1 $\beta$ de alta sensibilidad. . . . .	69

<b>15. Curva de calibración de IL-1<math>\beta</math> de baja sensibilidad. . . . .</b>	<b>69</b>
<b>16. Curva de calibración de FNT<math>\alpha</math> de alta sensibilidad. . . . .</b>	<b>70</b>
<b>17. Curva de calibración de FNT<math>\alpha</math> de baja sensibilidad. . . . .</b>	<b>70</b>
<b>18. Niveles de citocinas en AHA, GPR y GC. . . . .</b>	<b>74</b>
<b>19. Cromatograma de los cistenil-leucotrienos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Las condiciones de elución son descritas en el texto. . . . .</b>	<b>76</b>
<b>20. Cromatograma de LTB<sub>4</sub> y sus metabolitos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: trans-6-LTB<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, trans-6-12-epi-LTB<sub>4</sub>, (5S,6S)DiHETE y el (5S,6R)DiHETE. Las condiciones de elución son descritas en el texto. . . . .</b>	<b>77</b>
<b>21. Cromatogramas obtenidos para la curva de calibración del LTE<sub>4</sub> separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. Las condiciones de elución son descritas en el texto. . . . .</b>	<b>79</b>
<b>22. Cromatogramas obtenidos despues del proceso de extracción en fase sólida de una muestra de orina adicionada con LTE<sub>4</sub> y separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. Las condiciones de elución son descritas en el texto. . . . .</b>	<b>81</b>
<b>23. Espectro de absorción del LTB<sub>4</sub> y superposición del espectro del LTB<sub>4</sub> del paciente No. 8 con AHA. . . . .</b>	<b>82</b>
<b>24. Cromatogramas obtenidos despues del proceso de extracción en fase sólida y separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. a) Mezcla de estándares de leucotrienos, b) Paciente con Absceso hepático amibiano en fase aguda, c) paciente con absceso hepático amibiano en fase de recuperación y d) Sujeto del grupo control. Las condiciones de elución son descritas en el texto. . . . .</b>	<b>83</b>
<b>25. Cromatograma de los cistenil-leucotrienos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>. Las condiciones de elución son descritas en el texto. Efecto del pH. . . . .</b>	<b>85</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>A</b>	<b>Área</b>
<b>Ac.</b>	<b>Acido</b>
<b>AHA</b>	<b>Absceso hepático amibiano</b>
<b>Alb</b>	<b>Albúmina</b>
<b>ALT</b>	<b>Alanin amino transferasa</b>
<b>AST</b>	<b>Aspartato amino transferasa</b>
<b>B.H.</b>	<b>Biometría hemática</b>
<b>BD</b>	<b>Bilirrubina directa</b>
<b>BI</b>	<b>Bilirrubina indirecta</b>
<b>BT</b>	<b>Bilirrubina total</b>
<b>C3</b>	<b>Fracción C3 del complemento</b>
<b>CER</b>	<b>Ceruloplasmina</b>
<b>CLAR</b>	<b>Cromatografía de líquidos de alta resolución</b>
<b>CLAR-FR</b>	<b>Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa</b>
<b>CMHG</b>	<b>Concentración media de hemoglobina globular</b>
<b>CV</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>DI</b>	<b>Diámetro interno</b>
<b>DE</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>EDTA</b>	<b>Etilen diamino tetra acético</b>
<b>FA</b>	<b>Fosfatasa alcalina</b>
<b>Glob</b>	<b>Globulinas</b>
<b>GGT</b>	<b>Gama glutamil transpeptidasa</b>

<b>Hb</b>	<b>Hemoglobina</b>
<b>HCl</b>	<b>Acido clorhídrico</b>
<b>HP</b>	<b>Hewlett Packart</b>
<b>HPT</b>	<b>Haptoglobina</b>
<b>HS</b>	<b>Hight sensibility (alta sensibilidad)</b>
<b>Hto</b>	<b>Hematocrito</b>
<b>HTMP</b>	<b>4-hydroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1 oxyl</b>
<b>F</b>	<b>Femenino</b>
<b>FNT<math>\alpha</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa</b>
<b>FNT<math>\beta</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral beta</b>
<b>GC</b>	<b>Grupo control</b>
<b>GPR</b>	<b>Grupo post-recuperación</b>
<b>HPT</b>	<b>Haptoglobina</b>
<b>HETE</b>	<b>Hidroxieicosatetraenoico</b>
<b>IDR</b>	<b>Inmuno difusión radial</b>
<b>IL-6</b>	<b>Interleucina 6</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Interleucina 1 alfa</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Interleucina 1 beta</b>
<b>K'</b>	<b>Factor de capacidad</b>
<b>Leu</b>	<b>Leucocitos</b>
<b>L.D.</b>	<b>Limite de detección</b>
<b>L.C.</b>	<b>Limite de cuantificación</b>

<b>LTB4</b>	<b>Leucotrieno B4</b>
<b>LTC4</b>	<b>Leucotrieno C4</b>
<b>LTD4</b>	<b>Leucotrieno D4</b>
<b>LTE4</b>	<b>Leucotrieno E4</b>
<b>LTS</b>	<b>Leucotrienos</b>
<b>M</b>	<b>Masculino</b>
<b>mL</b>	<b>Millilitro</b>
<b>min</b>	<b>minuto</b>
<b>µm</b>	<b>micrómetro</b>
<b>mm</b>	<b>milímetro</b>
<b>n</b>	<b>Número de datos</b>
<b>N</b>	<b>Normalidad</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de sodio</b>
<b>ND</b>	<b>No detectable</b>
<b>NEF</b>	<b>Nefelometría</b>
<b>nm</b>	<b>nanometros</b>
<b>ODS</b>	<b>Octadecilsilano</b>
<b>P</b>	<b>Paciente</b>
<b>PCR</b>	<b>Proteína C reactiva</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrógeno</b>
<b>PFA</b>	<b>Proteínas de fase aguda</b>
<b>PFH</b>	<b>Pruebas de función hepática</b>

<b>PGB2</b>	<b>Prostaglandina B2</b>
<b>Plaq</b>	<b>Plaquetas</b>
<b>ppm</b>	<b>Parte por millón</b>
<b>PT</b>	<b>Proteínas totales</b>
<b>R</b>	<b>Resolución</b>
<b>RIA</b>	<b>Radioinmunoanálisis</b>
<b>r.p.m.</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>TRF</b>	<b>Transferrina</b>
<b>X</b>	<b>Media</b>

## RESUMEN

**Paula Cordero Pérez**

**Fecha de Graduación: Noviembre, 1999**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio: RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL  
ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO MEDIANTE EL  
ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> Y D<sub>4</sub> E  
INTERLEUCINA 1 BETA, INTERLEUCINA 6 Y FACTOR  
DE NECROSIS TUMORAL ALFA.**

**Número de páginas: 129**

**Candidato para el grado de Doctor en  
Ciencias con especialidad en Química  
Biomédica.**

**Area de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Propósito y Método del Estudio:** El absceso hepático amibiano se caracteriza *por la destrucción de tejido en las zonas invadidas por los trofozoitos dando una respuesta inflamatoria y de fase aguda característica. Se ha propuesto que esta respuesta puede ser regulada por varios mecanismos entre los cuales las citocinas y los leucotrienos pueden*



estar involucrados. Hasta la fecha no se cuenta con una evidencia que demuestre como estos mediadores regulan la respuesta inflamatoria en el absceso hepático. Una estrategia que podría aportar pruebas directas acerca de la participación de estos mediadores, es realizar la determinación de los niveles de las tres citocinas principales reguladoras de la respuesta de fase aguda así como la determinación de leucotrienos. De esta manera los objetivos del presente trabajo fueron evaluar a nivel sistémico los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  en suero de pacientes con AHA por el método de ELISA y la separación e identificación del LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en orina de pacientes con AHA por cromatografía de líquidos de alta resolución y conocer el grado de significancia estadística de los resultados. Nuestros pacientes fueron evaluados durante la fase clínica aguda y período de post-recuperación. Se determinó también la concentración de 5 proteínas de fase aguda: TRF, CER, HPT, PCR y C3 por nefelometría para demostrar una respuesta de fase aguda. Se estudió a la par un grupo de sujetos sanos sin antecedentes de proceso inflamatorio alguno como grupo control.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de las proteínas de fase aguda así como en las citocinas estudiadas en la fase aguda de la enfermedad con respecto al grupo post-recuperación y al grupo control. La IL-6 puede ser el principal mediador de la RFA observada por la estimulación positiva de PFA como la PCR, CER y HPT y a la vez existe una inhibición de TFR y C3 en este grupo de pacientes.

Entre las 3 citocinas estudiadas la IL-8 se encontró significativamente más elevada que la IL-1 $\beta$  y el FNT $\alpha$  en la fase aguda. Los niveles de citocinas en la mayoría de los grupos de estudio, no presentaron relación estadísticamente significativa con las PFA y los leucotrienos. Para el análisis de los metabolitos del ácido araquidónico en muestras de orina con el método de CLAR-FR se obtuvieron resultados: rápidos, reproducibles, sensibles y con buenos porcentajes de recuperación. La presencia del leucotrieno quimiotáctico (LTB<sub>4</sub>) en 30/49 pacientes con AHA indican que estos podrían estar involucrados en las alteraciones quimiotácticas reportadas en la fase inicial del AHA. La participación de los LTS en el AHA es determinante ya que en 42/49 (85.7%) de este grupo de pacientes se detectó al menos un leucotrieno.



Firma del Asesor

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria es un proceso fisiopatológico que involucra la migración de elementos formes de la sangre y proteínas al tejido afectado. Este proceso se caracteriza por: dolor, calor, infiltrado celular y disminución de la función. Las fases vascular y celular en el proceso inflamatorio son controladas por diferentes mediadores que actúan en su amplificación <sup>(1-2)</sup>. Los sistemas efectores humorales y celulares: el sistema del complemento, el sistema cinina-caliceína, el sistema de coagulación y fibrinolítico son partes fundamentales en este proceso <sup>(1-5)</sup>.

La respuesta inflamatoria aguda es inducida durante una infección o lesión por factores liberados en el sitio dañado y puede progresar a la fase crónica. La respuesta inflamatoria es un proceso altamente complejo y bien organizado. Las células del sistema fagocítico mononuclear se encuentran en el centro de ésta organización y dirigen las diversas fases de la respuesta inflamatoria <sup>(1-5)</sup>.

Las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria están reguladas por los neutrófilos. Estas células y otros tipos celulares del sistema inmune son atrapadas en un coágulo de fibrina al mismo tiempo que la lesión sana y se elimina al organismo invasor. Durante la fase aguda de la respuesta inflamatoria, los fagocitos mononucleares inactivos en el tejido son activados

por sustancias que se originan en el sitio de la inflamación (i.e. interferón gamma). También existe una proliferación localizada de fagocitos mononucleares en el tejido y un infiltrado de monocitos de la sangre<sup>(1,3)</sup>.

La capacidad de las células para migrar hacia los tejidos durante el proceso es controlada en parte por interacciones específicas entre los monocitos y el endotelio vascular a través de las moléculas de la superficie celular conocidas como integrinas. Estas moléculas son expresadas específicamente en las células que se encuentran en el sitio de la inflamación en respuesta a otras sustancias generadas durante el proceso inflamatorio<sup>(1-3)</sup>.

Algunos factores derivados del suero, de bacterias, de parásitos y de linfocitos B y T pueden aumentar la velocidad de migración y controlar la orientación y el movimiento de los fagocitos mononucleares en una dirección específica (quimiotaxis)<sup>(1-5)</sup>. Los factores quimiotácticos estimulan a un gran número de monocitos para su migración y e infiltración en el tejido. Los monocitos se mueven hacia el sitio de lesión o infección, lo cual sugiere un mayor gradiente de concentración de los factores quimiotácticos en esa zona. Una vez que los monocitos dejan la circulación, ocurren alteraciones en su morfología y características histoquímicas celulares; las células se convierten así en macrófagos y asumen funciones específicas en el tejido en el cual residen. Cuando los macrófagos son atraídos al sitio de la inflamación por factores quimiotácticos, otras sustancias (i.e, linfocinas y enzimas proteolíticas) al parecer funcionan para retener a los macrófagos en el sitio de la inflamación<sup>(1-5)</sup>.

Finalmente, durante la fase crónica de la respuesta inflamatoria, los monocitos y los linfocitos predominan sobre los neutrófilos. Los fagocitos mononucleares eliminan las células muertas o agonizantes, como los neutrófilos y sintetizan y excretan factores que "limpian" la lesión e inducen la neovascularización y el crecimiento de células nuevas<sup>(1)</sup>.

## **1.2 LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO**

La amibiasis es una parasitosis causada por el protozoo *Entamoeba histolytica*. Afecta al 10% de la población mundial en su prevalencia<sup>(6-7)</sup>. El 10% de los sujetos infectados presentan cuadro clínico. La mortalidad por la infección se calcula en alrededor de 100,000 personas al año<sup>(5)</sup>. En el 10% de los individuos infectados el parásito invade la mucosa intestinal y puede diseminarse a otros órganos, de los cuales el hígado es el órgano principalmente afectado con la formación de abscesos<sup>(6-7)</sup>.

El absceso hepático amibiano (AHA) es la complicación extraintestinal más frecuente de la amibiasis invasora en México. Clínicamente se caracteriza por: dolor en el área hepática, con fiebre alta, náusea, vómitos y en algunos casos diarrea o disenteria. A la exploración física existe hepatomegalia dolorosa y en algunos casos ictericia moderada. Los estudios de laboratorio muestran leucocitosis, anemia normocítica-normocrómica, elevación de la fosfatasa alcalina e hipoalbuminemia y en algunos casos existe elevación de la bilirrubina conjugada; además hay anticuerpos anti-amibianos en el suero de casi el 100%

de estos pacientes <sup>(7)</sup>. Histopatológicamente las lesiones amebianas muestran infiltrado celular variado indicando la participación activa del sistema inmune. La mayoría de las descripciones histopatológicas se refieren a casos de autopsia, con la descripción de estadios avanzados, caracterizados por necrosis y destrucción extensa de la glándula hepática. La amibiasis intestinal aguda es acompañada por una inflamación hemorrágica generalizada de la mucosa intestinal del colon, con edema pronunciado e infiltrado de neutrófilos y eosinófilos. También en la amibiasis hepática el tejido hepático viable que rodea el absceso puede contener infiltración de neutrófilos y eosinófilos <sup>(6-9)</sup>.

Se han empleado diversas especies de animales para la producción experimental de lesiones hepáticas; Tsutsumi y cols. reportaron en hámsters, extenso infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) rodeando a los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en la fase inicial de la formación del absceso. El resultado de este estudio involucra tres fases consecutivas: inflamación aguda, formación de granuloma y necrosis progresiva <sup>(10)</sup>. En el AHA en el humano, la respuesta inflamatoria y de fase aguda se caracteriza por fiebre, leucocitosis e incremento en la síntesis de proteínas de fase aguda <sup>(4-5)</sup>. La respuesta inflamatoria es regulada por diversos mediadores activos que se liberan en tejidos locales e incluyen productos de metabolismo de fosfolípidos (metabolitos del ácido araquidónico) y mediadores polipeptídicos o citocinas los cuales tienen efectos fisiológicos amplios y variados <sup>(11-12)</sup>.

### 1.3 LAS CITOCINAS

Las citocinas regulan el crecimiento, la motilidad, la activación y la diferenciación de diversos tipos de células<sup>(13)</sup>. Se ha estudiado el papel de las citocinas como mediadoras de la respuesta inflamatoria en diversas enfermedades parasitarias<sup>(14-18)</sup>. La participación en la patogenia y en la protección del hospedero ha sido definida en las enfermedades causadas por *plasmodium*, *trypanosomas* y *leishmanias*<sup>(17-19)</sup>.

Las citocinas como la interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (FNT $\alpha$ ) son los mediadores más importantes en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hepatocito<sup>(20-29)</sup>. La secreción de estas proteínas plasmáticas constituye una respuesta a la infección y señala la presencia del proceso inflamatorio<sup>(20-29)</sup>.

El FNT $\alpha$  también conocido como caquectina y el FNT $\beta$  también conocido como linfotoxina son dos proteínas estrechamente relacionadas. Estas moléculas se unen al mismo receptor de superficie celular, sin embargo su efecto es diferente. El FNT $\beta$  es producido por neutrófilos activados, los linfocitos T y los B, las células NK, las células endoteliales, las células de músculo liso y por algunas células transformadas mientras que el FNT $\alpha$  es producido por los linfocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y astrocitos. El FNT $\alpha$  humano es un polipéptido de 157 residuos de aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa bajo condiciones desnaturalizantes<sup>(30-31)</sup>.

El FNT $\alpha$  es una citocina que tiene efectos pleiotrópicos y parece tener un papel clave en el fenómeno inflamatorio al ejercer su acción en las células inflamatorias y endoteliales<sup>(14-15)</sup>. Se ha reportado el incremento de FNT $\alpha$  en el plasma de pacientes con diversas infecciones bacterianas y parasitarias. Los niveles plasmáticos elevados de FNT $\alpha$  que han sido detectados en pacientes infectados con pronóstico pobre sugieren un papel patogénico de esta citocina<sup>(32-36)</sup>.

La IL-6 es una proteína multifuncional producida por las células linfoides y no linfoides y por células normales y transformadas: células T, monocitos/macrófagos, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, células de mieloma y carcinomas. La producción de IL-6 por estas células puede ser regulada positiva o negativamente por una variedad de señales incluyendo mitógenos, estimulación antigénica, lipopolisacáridos, IL-1, FNT y virus. En base a sus actividades la IL-6 también es conocida con diversos términos como: interferón beta, proteína de 26 KDa, factor-2 estimulador de células B, factor de crecimiento hibridoma/plasmacitoma, factor estimulante del hepatocito, factor diferenciador de células T citotóxicas y factor inductor de granulocitos macrófagos<sup>(37-39)</sup>.

La secuencia del cDNA de IL-6 en el humano predice una proteína de 212 residuos de aminoácidos con dos sitios potenciales de N-glicosilación<sup>(37)</sup>. La variedad de actividades descritas para la IL-6 sugiere que ésta juega un papel importante en la mediación de la respuesta inflamatoria y de la respuesta inmune iniciada por infección. El incremento de los niveles plasmáticos de IL-6



ha sido reportado en pacientes con infecciones , en enfermedades autoinmunes y neoplásicas<sup>(40-43)</sup>.

La IL-1 es el nombre que se designa a dos proteínas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  las cuales son productos de distintos genes que reconocen el mismo receptor de la superficie celular. Con excepción de los queratinocitos de la piel, de algunas células epiteliales y de ciertas células del sistema nervioso central, la IL-1 no es producida constitutivamente. En respuesta a estímulos inflamatorios: endotoxinas microbianas y agentes infecciosos se observa un incremento dramático en la producción de IL-1 por macrófagos y diversas células implicadas en el proceso inflamatorio. La IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son polipéptidos estructuralmente relacionados que muestran un 25% de homología en su secuencia de aminoácidos. Estas proteínas son sintetizadas como precursores que subsecuentemente se fragmentan en proteínas con un peso molecular de aproximadamente 17.5 KDa<sup>(44-46)</sup>.

La IL-1 posee una variedad de actividades biológicas. En el hígado inicia la respuesta de fase aguda con un incremento en la síntesis de proteínas hepáticas y disminución de la producción de albúmina. La producción prolongada de IL-1 ha sido implicada en una variedad de condiciones patológicas entre las que se incluyen sepsis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina y arteriosclerosis<sup>(47-50)</sup>.

### 1.3.1 Las citocinas en el absceso hepático amibiano

En un período de 12 a 24 hrs después de una infección el hígado responde a la exposición a citocinas iniciando una respuesta de fase aguda hepática con síntesis de aminoácidos y modulación de la glucogénesis. Subsecuentemente las mismas citocinas influyen la respuesta inmune contra el organismo invasor<sup>(51)</sup>. La señal de incremento de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda es derivada de macrófagos en el sitio de inflamación<sup>(52-53)</sup>. Este factor estimulador del hepatocito (IL-6) es idéntico al factor estimulador de la célula B que es secretado por monocitos activados en conjunto con IL-1 y FNT<sup>(54-56)</sup>.

Las funciones reguladoras de las citocinas en el AHA son escasamente conocidas; no obstante, en la infección por parásitos la respuesta del hospedero depende de múltiples factores<sup>(54-56)</sup>.

Los niveles plasmáticos e *in vitro* de FNT $\alpha$  e IL-6 producidos por células mononucleares de pacientes con AHA se determinaron recientemente por medio de técnicas de bioensayo<sup>(57)</sup>. Asimismo, se ha descrito un incremento en la expresión y secreción de citocinas quimioattractantes e inflamatorias *in vitro* en cultivos de células epiteliales y células del estroma. La producción de IL-8, GRO $\alpha$  e IL-6 se ha asociado en respuesta a infección por *E. histolytica*<sup>(58)</sup>.

En un estudio retrospectivo en suero de pacientes con AHA<sup>(22)</sup> se encontró ausencia sistémica de FNT $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; estos hallazgos han sugerido una participación de estas citocinas en el fenómeno quimiotáctico alterado que

se observa en el AHA<sup>(22)</sup>. También se ha considerado como factor determinante en la inmunosupresión transitoria observada en esta enfermedad parasitaria<sup>(58)</sup>.

Estas citocinas comparten una gran variedad de funciones biológicas y su sinergismo en el proceso inflamatorio se ha descrito en diversos modelos animales. Tanto el FNT como la IL-1 tienen funciones antiproliferativas *in vitro* para los hepatocitos de ratones y de humanos. Es posible que su ausencia confiera una ventaja homeostática para el tejido hepático dañado<sup>(60)</sup>.

Las citocinas como IL-1, IL-6 y FNT son consideradas como los principales mediadores de la inducción de proteínas de fase aguda por el hígado. Estas sustancias regulan la respuesta inmune específica a los protozoarios parásitos<sup>(35,54)</sup>.

La ausencia sistémica de FNT $\alpha$  observada en estos pacientes confirma las observaciones previas en pacientes con colitis amibiana o AHA y se sugiere la acción de un mecanismo "regulador paradójico" presente en pacientes con AHA<sup>(56-57)</sup>. En estos casos, durante la etapa aguda del proceso inflamatorio ocurre una destrucción importante tisular con inflamación.

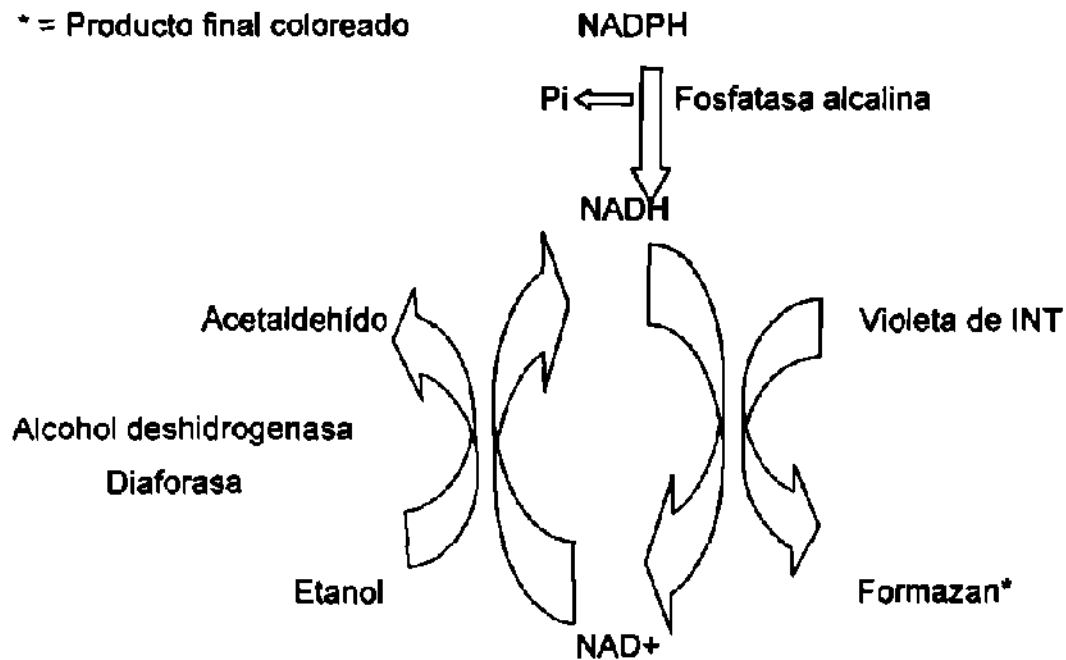
Se ha demostrado que la rhIL-6 regula la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos humanos y al comparar la acción de ésta con IL-1 $\alpha$  y FNT $\beta$  sobre el hepatocito, sólo la IL-6 induce esencialmente el mismo espectro de proteínas de fase aguda que se observa en los humanos durante un estado inflamatorio<sup>(27,28)</sup>. Esto podría explicar la respuesta alterada de las proteínas de fase aguda descrita en los pacientes con AHA.

### 1.3.2 Análisis de las citocinas

Los métodos actualmente en uso para el análisis de IL-1 $\beta$  están basados en la estimulación dosis-dependiente de la incorporación de timidina tritiada en timocitos estimulados por fitohemaglutinina y en la proliferación de la línea celular murina D10 de células T cooperadoras. Estos ensayos son prolongados y no se distingue entre IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Los métodos para la detección de FNT $\alpha$  están basados en el efecto citolítico del FNT $\alpha$  en líneas celulares sensibles como la L929. Estos ensayos requieren de 3 a 4 días para realizarse y no son específicos para FNT $\alpha$  humano, mientras que los métodos para la detección de IL-6 están basados en los efectos mitogénicos de esta citocina en líneas celulares apropiadas como B9, línea hibridoma de células B de ratón, o en T1165.85.2.1, una línea celular de plasmocitoma de ratón. Estos bioensayos consumen gran cantidad de tiempo y no son altamente específicos para IL-6. Los inmunoensayos Quantikine para IL-6 y Quantikine HS para IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  son un ensayo de ELISA en fase sólida que mide específicamente IL-6, IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  humana en un tiempo promedio de 5 hrs. La sensibilidad reportada de estos inmunoensayos es de hasta 0.70 pg/mL., 0.10 pg/mL y 0.18 pg/mL respectivamente para cada citocina <sup>(81-83)</sup>.

### 1.3.3 Análisis de las citocinas por ELISA

Los métodos de ELISA de alta sensibilidad para la determinación de citocinas emplean un anticuerpo monoclonal específico para cada citocina (FNT $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ) unidos a las microplacas. Estos sistemas cuentan con un sistema de amplificación en el cual la fosfatasa alcalina desfosforila la reducción del fosfato dinucleótido adenina nicotinamida, NADPH (sustrato) al dinucleótido adenina nicotinamida reducido, NADH. El NADH, se utiliza como un cofactor específico que activa un ciclo redox conducido por un sistema enzimático secundario constituido por alcohol deshidrogenasa y diaforasa. En la reacción catalizada por la diaforasa, el NADH reduce una sal de tetrazolio (violeta de yodonitrotetrazolio –INT- ) produciendo formazan de color intenso y NAD<sup>+</sup>. El NAD<sup>+</sup> se reduce por etanol, en una reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa para generar NADH que se reincorpora al ciclo redox. La reducción de la sal de tetrazolio cuya evidencia es la cantidad del producto coloreado formado, es proporcional a la cantidad de citocina unida en la etapa inicial (Fig. 1) <sup>(61-63)</sup>.



**Figura 1. Sistema amplificador de los métodos de ELISA de sensibilidad alta para las citocinas**

#### 1.4 LAS PROTEINAS DE FASE AGUDA

Este grupo de proteínas presenta la propiedad común de mostrar aumento de su concentración en respuesta a situaciones de estrés o de inflamación, que se producen en las infecciones, en las lesiones tisulares, en la cirugía, en los traumatismos u otras necrosis tisulares<sup>(25-27, 29)</sup>.

En el humano durante una reacción de fase aguda, la proteína C reactiva y el amiloide A, son las proteínas que muestran un incremento acentuado en los niveles plasmáticos (aumentan de diez a mil veces). Las

concentraciones plasmáticas de fibrinógeno,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina, haptoglobina (HPT) y la  $\alpha$ 1-antitripsina aumentan de dos a diez veces, mientras que la albúmina y transferrina (TRF) disminuyen<sup>(64-66)</sup>.

La haptoglobina se combina con la hemoglobina que se libera durante la lisis de los eritrocitos para mantener el hierro corporal y los depósitos proteicos. Los complejos hemoglobina-HPT son captados por el sistema fagocítico mononuclear tisular, donde la hemoglobina es degradada a globina y heme. El heme posteriormente se transforma en hierro y bilirrubina. La HPT presenta dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras ligadas por enlaces disulfuro, conformando una estructura similar a la estructura básica de las inmunoglobulinas. La HPT normal (tipo 1-1) da lugar a una especie molecular única de peso molecular 100,000. Los individuos heterocigotos (1-2) presentan, además de la HPT tipo 1-1, una serie de multímeros por medio de enlaces disulfuro intermoleculares a través de la cadena ligera duplicada. La HPT tipo 2-2 se conforma por una serie de distintos multímeros, dado que la cadena ligera tipo 2 tiene un peso molecular diferente de la cadena ligera tipo 1<sup>(64-68)</sup>.

La HPT sérica aumenta en respuesta al estrés, a la infección, a la inflamación aguda o a la necrosis tisular, debido probablemente a la estimulación de su síntesis. Durante un episodio hemolítico, las concentraciones de HPT disminuyen a medida que los complejos de hemoglobina son eliminados de la circulación. Este efecto se incrementa durante la hemólisis masiva, en quemaduras térmicas o en la anemia hemolítica autoinmune. Asimismo, constituye una determinación útil para el seguimiento

seriado de los pacientes que presentan una tasa uniforme y lenta de hemólisis; tales como pacientes portadores de prótesis valvulares, portadores de hemoglobinopatías y los que presentan traumatismos por ejercicio físico. Las concentraciones bajas de HPT pueden acompañar hepatopatías cuando la capacidad de síntesis hepática se ve alterada<sup>(64-67)</sup>.

La transferrina es una beta-globulina (siderofilina) que transporta iones férricos. Estos son llevados de los depósitos de hierro de la ferritina en la mucosa o espacio intracelular a la médula ósea. Ahí los precursores de eritrocitos presentan receptores de TRF en sus superficies celulares. La TRF está formada por 687 aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 79,550 Da. El análisis de la secuencia de aminoácidos muestra que la TRF tiene dos dominios homólogos que pueden haber surgido de la duplicación contigua en un gen transferrínico ancestral. En esta proteína cada dominio presenta un locus para la fijación del hierro. En el suero normal, la TRF se halla en concentraciones de 200 a 400 mg/dl y se define como la capacidad de fijación del hierro (CFH). Los niveles de TRF aumentan al doble del nivel normal o a niveles superiores en respuesta a un déficit férrico de corta evolución. La TRF es una especie molecular única, con movilidad electroforética fija y puede presentar la apariencia de una paraproteína en casos de déficit acentuado de hierro. Debe esperarse cierta deficiencia de hierro y elevación de la TRF en la gestación. La administración de hierro a pacientes deficitarios aumenta la saturación, produciéndose a continuación una normalización de los niveles de TRF. La saturación crónica aparece en la hemocromatosis idiopática y en la hemosiderosis transfusional. En estas condiciones, el hierro no puede



desplazarse con normalidad para su eliminación pues existe CFH no saturada. Esto favorece los trastornos del depósito que también se presenta en la deficiencia congénita de TRF. La TRF puede restringir el crecimiento bacteriano que requiere hierro mediante la formación de quelatos de hierro. La pérdida de proteínas puede contribuir al desarrollo de una anemia hipocrómica<sup>(64-66)</sup>.

La ceruloplasmina (CER) es una proteína que migra en la fracción de alfa-2-globulina. Aunque se sabe que es una proteína fijadora del cobre, su función precisa es desconocida. Es sintetizada en el hígado, tiene un peso molecular de 132,000 Da. y está compuesta por una cadena polipeptídica. Si bien, su concentración es inferior en el momento del nacimiento, los niveles séricos oscilan entre 20 y 40 mg/dl en los adultos normales. Existen elevaciones al doble de su valor promedio en el curso del tratamiento anticonceptivo y durante la gestación o en una situación de respuesta de fase aguda. Cada molécula de CER puede fijar 6 átomos de cobre que le dan un tinte azulado a la proteína y una coloración verde al plasma cuando hay concentraciones elevadas. En las alteraciones genéticas del metabolismo del cobre como la enfermedad de Wilson y el síndrome de Menkes, las concentraciones de CER sérica están fuertemente disminuídas, sobre todo, en los portadores homocigotos. Las disminuciones de CER, se presentan también en la insuficiencia hepática y en los síndromes de pérdida de proteínas<sup>(64-66)</sup>.

Otro componente crítico de la respuesta inflamatoria es la generación de la anafilotoxina C3a por la ruptura específica del tercer componente de complemento durante la activación del mismo. El C3 del complemento es una glicoproteína compuesta de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Durante la activación del

complemento la cadena  $\alpha$  es escindida por su convertasa para formar C3a el cual tiene una actividad pro-inflamatoria. El resto de la molécula, C3b se adhiere a la célula blanco para la ulterior formación del complejo de ataque a la membrana celular. Los efectos de C3a son diversos e incluyen contracción del músculo liso, incremento de la permeabilidad vascular, liberación de histamina de las células cebadas y liberación de IL-1 de macrófagos. La actividad biológica de esta anafilotoxina en suero está limitada por una carboxipeptidasa que remueve un residuo esencial de arginina del carbono terminal. La disminución de C3 aparece en trastornos autoinmunes cuando el sistema del complemento es activado y el C3 se fija a los depósitos de inmunocomplejos en los tejidos desapareciendo del suero <sup>(64-66, 68)</sup>.

La Proteína C reactiva (PCR) fue descubierta por interacción del suero con el polisacárido C de *Streptococcus pneumoniae*. Los pacientes que se habían recuperado de infecciones neumocócicas presentaban esta reacción. Se puso de manifiesto que la PCR se encuentra también en el suero de pacientes afectados por otros trastornos distintos a las infecciones neumocócicas. Esta proteína aumenta notablemente siempre que existe necrosis tisular. Su peso molecular oscila entre 118,000 Da. y 144,000 Da. y presenta un elevado contenido en hidratos de carbono. Su concentración sérica en sujetos adultos es de 470 a 1340 ng/mL. La PCR tiene mucha importancia como reactante de fase aguda altamente sensible aún a concentraciones bajas <sup>(64-65, 69)</sup>.

La PCR migra en el grupo gamma durante la electroforesis de proteínas del plasma y puede formar una banda de aspecto monoclonal independiente en los pacientes que presentan una respuesta inflamatoria intensa <sup>(64-65, 69)</sup>.

Se ha estimado el tiempo de respuesta así como las concentraciones normales y producidas durante el proceso inflamatorio de algunas proteínas de fase aguda (Tabla I).

**Tabla I. Proteínas de fase aguda en enfermedades inflamatorias**

Proteína	Concentración Normal (gr/L)	Concentración en inflamación aguda (gr/L)	Tiempo de respuesta (hr)
PCR	$7 \times 10^{-5} - 10^{-2}$	0.04	6-10
HPT	1.00-3.00	6.00	24
C3	0.60-1.20	3.00	48-72
CER	0.20-0.60	2.00	48-72

*Referencia # 64*

#### 1.4.1 Las proteínas de fase aguda en el absceso hepático amibiano.

El hígado juega un papel predominante en la síntesis de proteínas plasmáticas: albúmina, haptoglobina, transferrina y ceruloplasmina. Los experimentos clásicos de Miller y cols. han demostrado esta función <sup>(70)</sup>.

En el AHA se ha descrito la presencia de una respuesta de fase aguda caracterizada por fiebre, leucocitosis e incremento en la síntesis de proteínas de fase aguda <sup>(71-72)</sup>. En los pacientes con AHA los niveles de albúmina <sup>(71-73)</sup> y transferrina <sup>(74)</sup> están disminuidos. Estos cambios son característicos de

enfermedad hepática ya que el daño de las células del parénquima hepático puede resultar en una disminución de la síntesis de proteínas séricas y en un cambio en el metabolismo proteico. Además, se ha reportado el incremento de los niveles séricos de C3 <sup>(75-77)</sup> y PCR <sup>(57)</sup> así como niveles disminuidos de albúmina<sup>(73)</sup>, en los pacientes con AHA. Lo anterior sugiere la presencia de una reacción de fase aguda. Estos datos implicarían que las citocinas IL-6 y FNT $\alpha$  pudieran participar en la regulación de la síntesis alterada de las proteínas de fase aguda que se observa en los pacientes con AHA.

Las citocinas IL-6, la IL-1 y el FNT $\alpha$  son consideradas como los mediadores más importantes en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hepatocito<sup>(25-29)</sup>. La secreción de estas proteínas plasmáticas representa una respuesta a la infección durante el proceso inflamatorio presente.

Los cambios en las proteínas séricas (i.e. TRF, ALB, FER) pueden ser un indicador útil en ciertas condiciones fisiopatológicas, por lo que se han estudiado los patrones séricos de éstas en diversas enfermedades parasitarias (i.e. la malaria) <sup>(74)</sup>. Es posible que los patrones séricos de estas proteínas ayuden a diferenciar el AHA de otras condiciones hepáticas, especialmente el cáncer primario de hígado<sup>(74)</sup>. El daño del parénquima hepático puede resultar en una disminución en la síntesis de proteínas séricas y en un cambio en el metabolismo proteico. Se ha reportado que la TRF disminuye en la hemólisis, en la enfermedad hepática, en la nefrosis y en la inflamación<sup>(66)</sup>. Los pacientes con AHA presentan disminución de la albúmina y de la transferrina<sup>(66, 74)</sup>. Estos cambios son característicos de enfermedad hepática.

La HPT es otro de los reactantes de fase aguda que se incrementa rápidamente durante las infecciones<sup>(68)</sup>. La inflamación y el proceso neoplásico también causan un incremento de esta proteína. Esta es también considerada como un indicador muy sensible de la persistencia de la enfermedad hemolítica. Concentraciones significativamente altas de HPT se han reportado en los pacientes con AHA<sup>(74)</sup>.

#### 1.4.2 Análisis de las proteínas de fase aguda

La haptoglobina puede cuantificarse por medio de la fijación con la hemoglobina o por métodos inmunológicos. Actualmente existen discrepancias entre estas dos determinaciones al comparar los distintos fenotipos. En el método descrito por Owen y cols. en 1960 la HPT se combina con metahemoglobina para formar un complejo HPT-metahemoglobina. El efecto catalizador (de tipo peroxidasa) mide la oxidación del guayacol por el peróxido de hidrógeno, para formar tetraguayacol. La cantidad de HPT se expresa como metahemoglobina combinada<sup>(64-65)</sup>.

La ceruloplasmina se puede cuantificar midiendo su actividad de oxidasa en un ensayo colorimétrico con p-fenilendiamina. Se emplea además métodos inmunoquímicos, debido a que la banda que se obtiene es demasiado débil para ser utilizada en la electroforesis de proteínas<sup>(64-65)</sup>.

La determinación de proteína C reactiva se realiza por medio de la capacidad de esta proteína para precipitar la sustancia C o por métodos

inmunológicos que incluyen: las precipitaciones, el radioinmunoanálisis y el inmunoensayo enzimático<sup>(64-65)</sup>.

La técnica de nefelometría para el análisis de las proteínas de fase aguda se ha empleado recientemente en aplicaciones a gran escala, ya que se dispone de instrumentos automatizados. Este método tiene las siguientes ventajas: utiliza un volumen pequeño de muestra, es rápido, los resultados están disponibles el mismo día y existe una precisión relativamente elevada en los resultados. Las desventajas son: los costos de los reactivos y la necesidad de un equipamiento especializado<sup>(64-65,79)</sup>. En comparación con la técnica de inmunodifusión radial (IDR) que también se emplea para determinar estas proteínas, ambos métodos tienden a exhibir buena concordancia, aunque la IDR es una técnica semicuantitativa, a menos que las áreas de precipitación se lean por densitometría. La elección del método a utilizar depende del número de las muestras disponibles (un número elevado favorece el uso de la nefelometría y un número pequeño la IDR) y de la sensibilidad deseada<sup>(64-65)</sup>.

En la Tabla II se puede observar la comparación de la técnica de IDR y nefelometría para el análisis de dos proteínas de fase aguda.

**Tabla II. Comparación de parámetros de análisis de dos proteínas de fase aguda**

Parámetro	TRANSFERRINA		HAPTOGLOBINA	
	IDR	NEF	IDR	NEF
Temperatura	23±2°C	22°C	23±2°C	22°C
PH	7.4	7.0	7.4	7.0
Tiempo de Reacción	18 hr.	30 min.	18 hr.	30 min.
Muestra	suero	suero	suero	suero
Tamaño de Muestra	5 µl	10 µl	5 µl	1 µl
Precisión (% CV)	3.1-6.4%	2.8%	3.5-5.3%	2.5%

*Ref. Quantiplate. Kallestad Laboratories, Chaska. MN 55318.*

## 1.5 LOS LEUCOTRIENOS

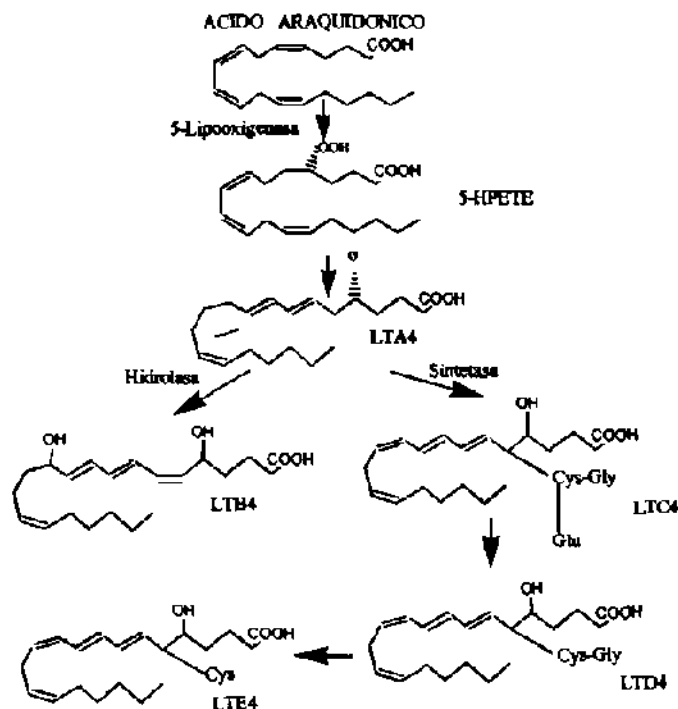
### 1.5.1 Metabolitos del ácido araquidónico.

Diversos metabolitos del ácido araquidónico han sido considerados mediadores potentes de la respuesta inflamatoria recientemente. Estos metabolitos se clasifican en diferentes familias dependiendo de la vía enzimática que se active. La vía de la ciclooxigenasa incluye a las prostaglandinas y los tromboxanos y en la vía de la lipooxigenasa se producen los leucotrienos (LTs) que son metabolitos formados por la acción de esta enzima sobre el ácido araquidónico. La modificación de este ácido graso por hidroxilación y oxidación produce el compuesto intermediario LTA<sub>4</sub> el cual puede convertirse en LTB<sub>4</sub> o LTC<sub>4</sub> por una hidrolasa y una glutatión transferasa

respectivamente. El LTC<sub>4</sub> es convertido en LTD<sub>4</sub> por remoción de ácido glutámico por acción de la enzima gamma glutamil transpeptidasa y finalmente el LTD<sub>4</sub> es convertido a LTE<sub>4</sub> al llevarse a cabo una remoción de glicina por una dipeptidasa (Figura 2) <sup>(1-5)</sup>. La acción quimiotáctica del LTB<sub>4</sub> y la acción microvascular de los cistenil-LTS (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>) indican el potencial proinflamatorio de ambos grupos de LTS <sup>(60-83)</sup>.

En el hígado se realiza la síntesis de LTS al menos por tres tipos celulares: las células de Kupffer, los hepatocitos, las células cebadas hepáticas y las células que infiltran al hígado en procesos inflamatorios. De éstas, el hepatocito es el sitio principal de captación e inactivación metabólica <sup>(84-89)</sup>. Posteriormente estos compuestos son eliminados por la vía biliar. La síntesis de estos mediadores puede alterarse en enfermedades que afectan al hígado como en las hepatopatías agudas y crónicas así como en la insuficiencia hepática fulminante, en las cuales se ha determinado una relación entre la respuesta inflamatoria observada y la presencia de LTS. En estas condiciones, las células inflamatorias que infiltran al hígado también pueden contribuir en la producción de LTS <sup>(90-94)</sup>.





**Figura 2. Cascada del ácido araquidónico vía lipooxigenasa.**

### 1.5.2 Los leucotrienos en el absceso hepático amibiano

Se desconoce el papel que juegan los LTs en la patogenia y en la evolución del AHA. Aunque la patogénesis de esta entidad no ha sido bien caracterizada, la generación de quimioattractantes de leucocitos en el sitio de la infección pudiera representar un papel crucial en la respuesta inflamatoria descrita en ésta infección parasitaria. Muñoz y cols. reportaron alteración de la quimiotaxis de polimorfonucleares en pacientes con AHA lo cual puede

relacionarse con la acción de LTB<sub>4</sub> y de péptido-LTs que se observan en otros procesos inflamatorios que afectan al hígado<sup>(95)</sup>.

Ha sido reportada la producción de eicosanoides por parásitos, aunque el sistema enzimático del parásito involucrado en la biosíntesis de estos mediadores no ha sido identificado. Se ha demostrado que los trofozoitos de *E. histolytica* pueden producir un tipo de eicosanoides *in vitro*, sin embargo en otras parasitosis se ha demostrado la producción de LTS: LTB<sub>4</sub> y LTC<sub>4</sub> en casos de *Schistosoma mansoni*<sup>(96-97)</sup>. Es posible que ciertos factores tanto del huésped como del parásito intervengan en la patogénesis y en la evasión de la respuesta inmune por los parásitos.

Los trofozoitos vivos de *E. histolytica* y las proteínas microsomales de las amibas producen eicosanoides como la PGE<sub>2</sub><sup>(98)</sup>. Los niveles altos de prostaglandinas producidas por las células inflamatorias del huésped al ser estimuladas por moléculas del parásito, pueden actuar localmente reclutando macrófagos hacia el sitio de inflamación<sup>(98)</sup>. Los LTs son considerados como moléculas proinflamatorias debido a su efecto quimiotáctico sobre los leucocitos polimorfonucleares. Así, los neutrófilos llegan al sitio de inflamación y desencadenan una cascada de eventos que contribuyen al estado inmunopatológico observable en muchas enfermedades parasitarias<sup>(95-98)</sup>.

### 1.5.3 Análisis de los leucotrienos

El análisis de estos mediadores de la respuesta inflamatoria incluye una variedad de técnicas: los bioensayos, los radioinmunoensayos, la

cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o una combinación de estas técnicas<sup>(99-103)</sup>. Recientemente se ha empleado la CLAR-FR para la separación y cuantificación de los diferentes LTs. Previo al análisis cromatográfico, es necesaria la extracción de estos compuestos del medio acuoso. Los procedimientos de extracción involucran una serie de solventes - extracción con solventes o adsorción a resinas unidas a Amberlite XAD-7 o XAD-8. Usualmente el éter dietílico es utilizado para el LTB<sub>4</sub> y otros metabolitos menos polares del ácido araquidónico y Amberlite XAD-8 o XAD-7 para los sulfopéptido-LTs<sup>(104-111)</sup>.

Se ha introducido recientemente como un procedimiento útil la extracción rápida empleando las columnas de extracción de octadecilsilano. La eficiencia de estas columnas para la extracción de LTs y otros metabolitos del ácido araquidónico ha sido señalada escasamente<sup>(107-111)</sup>. En las columnas Sep-Pak C18 en fase reversa los porcentajes de recuperación obtenidos para LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y la prostaglandina B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) oscilan alrededor de 57±20, 39±18, 44±8 y 87±15% respectivamente y empleando las columnas Sep-Pak de sílica, los porcentajes de recuperación para los mismos compuestos están alrededor de 76±8, 93±12, 86±8 y 82±7% respectivamente<sup>(112)</sup>. Estos porcentajes de recuperación dependen del buffer en el cual la muestra extraída se aplica a la columna.

#### 1.5.4 La cromatografía en el análisis de los leucotrienos

La CLAR ha tenido una difusión creciente desde comienzos de la década de los años '70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, tanto en la investigación básica como aplicada. Según definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), " La Cromatografía es un método primariamente utilizado para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve" (113-114).

La cromatografía se ha clasificado en diferentes modalidades cromatográficas en función de varios parámetros: la naturaleza de la fase móvil, la naturaleza de la fase estacionaria, el fenómeno que ocurre dentro de la columna y la cantidad de muestra aplicada. De acuerdo a la naturaleza de la fase móvil si ésta es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa y si es un líquido, cromatografía líquida. A este último grupo pertenece la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En los últimos años, ésta se ha transformado en una de las metodologías analíticas más ampliamente utilizadas en el análisis de sustancias orgánicas, tanto en los análisis de muestras de rutina como en el seguimiento de procesos de líneas de producción<sup>(113-115)</sup>.

El rápido crecimiento de este método analítico, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por CLAR

resultados cuantitativos. Actualmente la CLAR es capaz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes<sup>(113)</sup>.

La CLAR-FR se caracteriza por tener las siguientes ventajas:

- Pueden separarse compuestos no iónicos, iónicos e ionizables en la misma columna, con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
- El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precio
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema al realizar un cambio de fase móvil

Como en todo método analítico, existen diversos pasos, a saber: el muestreo, la preparación de la muestra, la inyección de la muestra, la separación cromatográfica, la detección, la integración de la señal y el cálculo de la concentración del analito<sup>(113-115)</sup>.

Los métodos de CLAR utilizados para el análisis de los LTs, inicialmente utilizaban cromatografías preparativas para su separación o no permitían la medición simultánea del LTB<sub>4</sub> y de los cistenil-leucotrienos; luego se reportaron una serie de métodos de extracción combinando columnas de resina XAD y cromatografía de columna abierta de sílica. Recientemente el empleo de

cartuchos Sep-Pak para el proceso de extracción y posterior separación por CLAR ha permitido obtener un método sensible y selectivo para el análisis de los leucotrienos. La aplicación de esta técnica analítica para el estudio de LTs ha sido evaluada por diferentes investigadores permitiendo la separación; en estos casos se requiere la posterior cuantificación por RIA de los LTs<sup>(110-112)</sup>. Esta metodología se ha empleado en la determinación de LTs en diversas enfermedades: síndrome hepatorenal, asma y en pacientes con cirrosis hepática<sup>(90-92)</sup>.

#### **1.5.4.1. Validación de un método cromatográfico**

Una vez desarrollado el método de análisis, deberá validarse para demostrar su idoneidad. En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes parámetros: Selectividad, Linearidad, Precisión, Exactitud, Sensibilidad y Robustez<sup>(113,116)</sup>.

La selectividad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes, en la matriz de la muestra<sup>(113)</sup>.

La linealidad se define como la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación de una curva estándar<sup>(113)</sup>.

La precisión es la medición del grado de reproducibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación y usualmente se expresa como % de Desviación Estándar Relativa (%DER) o % de Coeficiente de Variación (%CV) para un número de muestras estadísticamente significativas<sup>(113)</sup>.

La exactitud corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Se expresa como la recuperación<sup>(113)</sup>.

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación<sup>(113)</sup>.

Límite de detección del método (LDM)

Este se define como la mínima concentración del analito que puede ser detectada pero no cuantificada. Este se calcula a partir de la desviación estándar de la respuesta al origen de la ordenada (DE) y la pendiente de la curva de calibración (P)<sup>(113)</sup>.

Límite de cuantificación del método (LCM) se define como la mínima concentración del analito que puede ser determinada o cuantificada, en la matriz y por medio de las condiciones descritas en el LDM, con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones operacionales del método<sup>(113)</sup>.

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes<sup>(113)</sup>.

## **1.6 IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO**

En la patogenia del absceso hepático amibiano la respuesta inflamatoria y de fase aguda juegan un papel fundamental. El estudio de los mediadores: citocinas y leucotrienos, que regulan este tipo de respuestas permitirá generar conocimiento nuevo en torno a la patogénesis del AHA. En el AHA hay una regeneración del tejido hepático al desaparecer el parásito, la participación de estos mediadores en la respuesta inflamatoria descrita en pacientes con AHA, permitirá definir su implicación en la regeneración hepática y establecer su participación en otras condiciones patológicas como en las hepatopatías virales y hepatopatía por alcohol en las cuales la regeneración hepática es parcial.

La implementación de técnicas analíticas más sensibles: la CLAR-FR para el análisis de LTs, las técnicas de ELISA para citocinas y la nefelometría para las proteínas de fase aguda, permitirá evaluar su aplicación en otras hepatopatías y establecer patrones característicos para los mediadores en diversas hepatopatías.

El establecimiento de la utilidad diagnóstica y de medidas terapéuticas más efectivas como el posible empleo de antagonistas de las citocinas y de los LTS en los eventos regulados por estos mediadores podrá ser un planteamiento resultante de los hallazgos obtenidos con el presente trabajo.

La producción de LTs durante una respuesta inflamatoria puede ser regulada por citocinas: el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (FEC-GM) y el factor de necrosis tumoral alfa. La síntesis de LTs se incrementa en la interacción de las citocinas con células inflamatorias: neutrófilo y



eosinófilo. El estudio de ambos mediadores en el AHA permitirá establecer si existe asociación entre estos dos mediadores de la respuesta inflamatoria.

### **1.7 HIPÓTESIS**

“ En el absceso hepático amibiano existe una respuesta de fase aguda por elevación de IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$ , así como una respuesta inflamatoria mediada por LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y por las citocinas mencionadas.”

### **1.8 OBJETIVO GENERAL**

Dilucidar la participación de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> así como de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  en la respuesta de fase aguda e inflamatoria del absceso hepático amibiano.

### **1.8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- **Determinar las concentraciones séricas de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  por la técnica de ELISA en pacientes con AHA durante la fase aguda de la enfermedad y en el grupo en post-recuperación, así como en el grupo control.**
  
- 2.- **Determinar las concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda HPT, PCR, TRF, C3 y PCR por nefelometría en pacientes con AHA durante la fase aguda de la enfermedad y en el grupo en post-recuperación, así como en el grupo control.**
  
- 3.- **Determinar las condiciones óptimas para la separación e identificación de los leucotrienos por la técnica de CLAR-FR**
  
- 4.- **Desarrollar un método analítico para la determinación de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> de orina de pacientes con AHA y grupo post-recuperación por la técnica de CLAR-FR.**
  
- 5.- **Relacionar los niveles de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  con la síntesis de las proteínas de fase aguda HPT, PCR, TRF, C3 y PCR en el grupo con AHA en la fase aguda y grupo post-recuperación, así como en grupo control.**

- 6.- Correlacionar los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  con los niveles de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en pacientes con AHA.
  
- 7.- Correlacionar los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  con los niveles de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en el grupo post-recuperación y correlacionar con los obtenidos durante la fase aguda del AHA.

## **CAPITULO II**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 REACTIVOS Y SOLVENTES**

Los reactivos utilizados se adquirieron a las siguientes compañías:

##### **Sigma Chemical Co. De St. Louis, Missouri, US:**

Estándar de leucotrieno B4

Estándar de leucotrieno C4

Estándar de Leucotrieno D4

Estándar de Leucotrieno E4

Mezcla de estándares de leucotrienos (LTC4, LTD4, LTE4)

Mezcla de estándares de ácidos dihidroxileicosatetraenoicos (LTB4, trans-6-LTB4, trans-6-12-epi-LTB4, (5S,6R)-Di-HETE y (5S,6S)-Di-HETE

##### **Behring de México**

N Proteína-Standard SY (HPT, TRF, C3, CER)

N/T Proteína-Control SY/H (HPT, TRF, C3, CER)

Antisuero N contra la transferrina humana

Antisuero N contra la haptoglobina humana

Antisuero N contra la ceruloplasmina humana

Antisuero NA contra la C3 humana

Antisuero N látex contra la proteína C reactiva

N Proteína-Standard de PCR

Diluyente N

Tampón N de reacción

**R&D Systems, Minneapolis, MN, USA:**

Inmunoensayo Quantikine para FNT $\alpha$  humano

Inmunoensayo Quantikine para IL-1 $\beta$  humano

Inmunoensayo Quantikine para IL-6 humano

Inmunoensayo Quantikine HS para FNT $\alpha$  humano

Inmunoensayo Quantikine HS para IL-1 $\beta$  humano

**Merck de México**

Metanol grado CLAR, Merck

Agua grado CLAR, Merck

**Productos Químicos Monterrey**

Metanol grado CLAR

Agua grado CLAR

**AGA Gas S.A., México**

Nitrógeno

Argón

## **2.2 MATERIAL BIOLÓGICO**

### **2.2.1. Suero, plasma y orina de pacientes con AHA**

Se utilizó el suero, plasma y orina de los pacientes con AHA ingresados durante el periodo de marzo de 1995 a Marzo de 1998 a la sala de Medicina Interna del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **2.2.2. Suero, plasma y orina de pacientes con AHA en fase de post-recuperación**

Se utilizó el suero, plasma y orina de los pacientes con AHA en fase de post-recuperación evaluados a los 2 meses después de cuadro agudo durante el periodo de marzo de 1995 a Marzo de 1998 en la Unidad de Hígado del Depto. de Medicina Interna del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **2.2.3. Suero, plasma y orina de sujetos control**

Se utilizó el suero, plasma y orina de sujetos sanos sin antecedentes de proceso inflamatorio recientes evaluados durante el periodo de marzo de 1995 a Marzo de 1998 en la Unidad de Hígado del Depto. de Medicina Interna del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## 2.3 EQUIPO

**El equipo empleado fue el siguiente:**

**Nefelómetro Behring BN100**

**Cromatógrafo Hewlett-Packard 1090 Serie II con detector de arreglo de fotodiodos**

**Columna: Hypersil-ODS 100 mm x 2,1 mm D.I. Tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ (HP)**

**Equipo para filtrar solventes Millipore**

**Membranas para filtrar solventes y muestras con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$**

**Potenciómetro Beckman modelo 3500 (F61 pHmeter) con electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl**

**Centrífuga Beckman modelo GPKR**

**Microcentrífuga IECmiro-MB centrifuge de International Equipment Company**

**Balanza analítica marca Sartorius modelo Ba1105**

**Micropipetas marca Oxford de volumen variable y puntillas**

**Cartuchos Sep-Pack C-18 de tamaño clásico y de partículas de 5  $\mu\text{m}$**

**Agitador Vórtex**

**Computadora Acer View 34e procesador Pentium (*Microsoft Word* versión 6.0,**

***Microsoft Power Point* versión 6.0, *Statistica* y *UMAX Scan***

## **2.4 METODOS**

### **2.4.1 Grupo de pacientes.**

Se evaluaron un total de 69 pacientes con AHA de los cuales 49 (40 M y 9 F, edad promedio de  $36\pm 11$  años) reunieron los criterios de inclusión para el estudio en la fase aguda y fase de post-recuperación. El diagnóstico del AHA se realizó en base a la historia clínica, el examen clínico, las pruebas bioquímicas, la prueba de serameba positiva en títulos mayores de 1:512 y/o Western blot positivo, la ecosonografía y la respuesta al tratamiento específico.

### **2.4.2 Grupo Control**

Este grupo estuvo integrado por 30 sujetos sanos (20M y 10F, con edad promedio de  $25\pm 4$  años) sin evidencia de proceso inflamatorio reciente.

### **2.4.3 Criterios de inclusión**

- Pacientes con diagnóstico de AHA por los estudios de gabinete previamente mencionados.
- Pacientes mayores de 18 años y menores de 60.
- Pacientes con AHA único sin complicaciones hepáticas ni extra-hepáticas
- Carta de consentimiento informado autorizada por el paciente (apendice A)

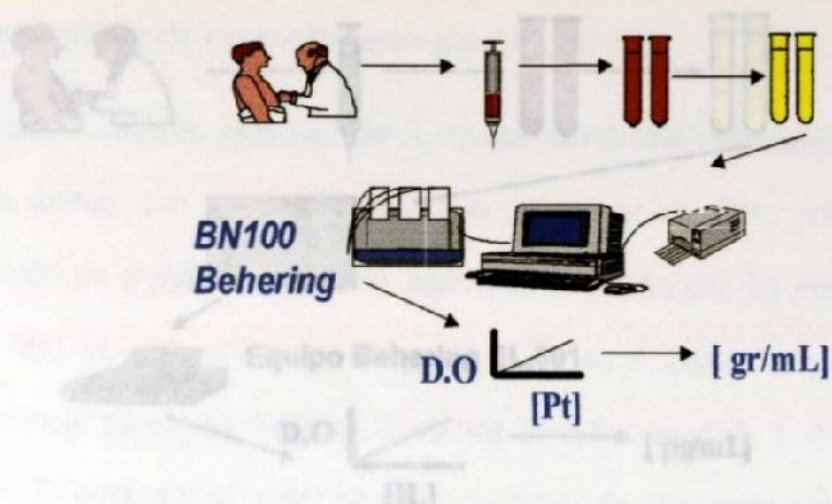


#### **2.4.4 Criterios de exclusión**

- Presencia de otra patología que tenga referencia de alteración de los mediadores en estudio o presencia de estado inflamatorio.
- Mujeres en período de menstruación
- No-reunión de criterios de inclusión

#### **2.5 Determinación de Proteínas de Fase Aguda.**

Las proteínas de fase aguda HPT, CER, TRF, C3 y PCR se determinaron por la técnica de Nefelometría empleando un Nefelómetro BN100 de Behring. Con esta técnica las proteínas HPT, TRF, CER y C3 contenidas en el suero humano reaccionaron con anticuerpos específicos, formando inmunocomplejos. Las concentraciones existentes fueron determinadas cuantitativamente mediante la medición de la difusión luminosa. La evaluación se efectuó mediante una curva de calibración trazada con la ayuda de diluciones del estándar de cada proteína. En el caso de PCR las partículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos contra la PCR, se aglutinaron al mezclarse con las muestras de suero que contienen PCR. La intensidad de la luz dispersa medida por el nefelómetro depende de la concentración de PCR en la muestra, de manera que, por comparación con estándares de concentraciones conocidas, se determinó el contenido de PCR en la muestra.



**Figura 3. Estrategia para la determinación de las proteínas de fase aguda en el suero de los pacientes con AHA, GPR y GC por nefelometría.**

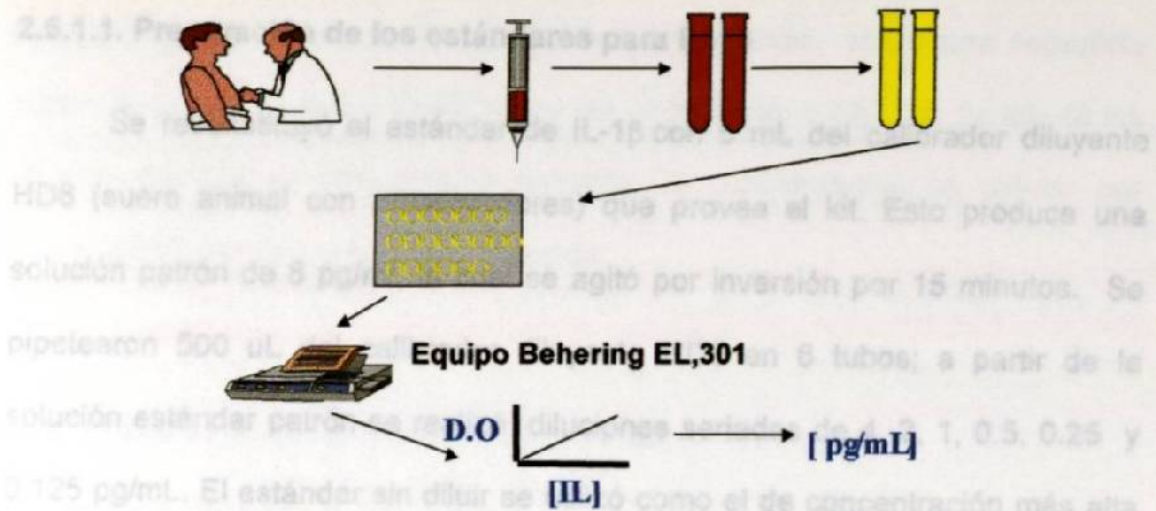
## 2.6 Determinación de Citocinas.

### 2.6.1 Preparación de las soluciones para IL-1 $\beta$ :

Las citocinas FNT $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 se determinaron por la técnica de ELISA-sandwich (R&D Systems, Minnesota, USA). Cada kit provee celdas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para la citocina respectiva. Se adicionaron 200  $\mu$ L de la muestra de suero o estándar a cada celda y se incubó a 37°C. Después se adicionó un anticuerpo conjugado con peroxidasa; se utilizó como sustrato el peróxido de hidrógeno y como cromógeno la tetrametil bencidina. La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm. Basándose en las curvas obtenidas para cada citocina se obtuvo la concentración en las muestras de suero.

### Solución amplificadora

Inicialmente se determinaron las concentraciones de IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  por ELISA de sensibilidad baja y por los resultados obtenidos con los primeros pacientes se decidió evaluar a todos los pacientes con AHA, GPR y GC por ELISA de sensibilidad alta para estas 2 citocinas.



**Figura 4. Diagrama de la estrategia para la determinación de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  en suero de pacientes con AHA, GPR y GC por la técnica de ELISA.**

### 2.6.1 Preparación de las soluciones para IL1- $\beta$ :

#### **Solución de lavado**

Se disolvió 100 mL. del amortiguador concentrado para lavados (solución de buffer surfactante con preservativos) que provee el kit de IL-1 $\beta$  en 900 mL de agua destilada

#### **Solución de sustrato**

Se disolvió el sustrato liofilizado (NADPH con estabilizadores) en 6 mL del diluyente para sustrato 10 minutos antes de utilizarse.

#### **Solución amplificadora**

Se disolvió el amplificador liofilizado (enzimas con estabilizadores) en 6 mL del diluyente para el amplificador.

### **2.6.1.1. Preparación de los estándares para IL-1 $\beta$**

Se reconstituyó el estándar de IL-1 $\beta$  con 5 mL del calibrador diluyente HD6 (suero animal con preservadores) que provee el kit. Esto produce una solución patrón de 8 pg/mL la cual se agitó por inversión por 15 minutos. Se pipetearon 500  $\mu$ L del calibrador diluyente HD6 en 6 tubos; a partir de la solución estándar patrón se realizó diluciones seriadas de 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 pg/mL. El estándar sin diluir se utilizó como el de concentración más alta y la solución diluyente sirvió como blanco.

### **2.6.1.2 Determinación de IL-1 $\beta$ alta sensibilidad.**

Se adicionaron 100  $\mu$ L del diluyente HD1C (buffer proteico con preservadores) a cada celda; se adicionaron 150  $\mu$ L del estándar o del suero en estudio a cada celda, se cubrió con una tapa adhesiva y se incubó por 2 hrs. a temperatura ambiente. Se aspiró cada celda y se lavó con buffer; se repitió este proceso tres veces para un total de 4 lavados. El buffer de lavado fue eliminado invirtiendo la placa sobre un papel absorbente. Se adicionaron 200  $\mu$ L del conjugado de IL-1 $\beta$  a cada celda y se cubrió con una tapa adhesiva nueva; se incubó 2 hrs. a temperatura ambiente. Se repitió el lavado por 4 ocasiones y se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada celda. Se incubó por 45 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución amplificadora a cada celda incubándose por 45 min. a temperatura ambiente. Se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de ácido sulfúrico 2N para detener la

reacción. Se agitó uniformemente la placa por rotación sobre una superficie plana. Se determinó la densidad óptica de cada celda a 490 nm. dentro de los 30 min. de que se detuviera la reacción, la concentración se obtuvo por interpolación con una curva de calibración.

## **2.6.2 Preparación de las soluciones para IL6**

### ***Solución de lavado***

Se disolvieron 20 mL del buffer concentrado (buffer surfactante con preservativos) que provee el kit en 480 mL de agua destilada

### ***Solución de sustrato***

Se mezcló en volúmenes iguales el reactivo A (peróxido de hidrógeno estabilizado) con el reactivo B (cromógeno tetrametilbencidina estabilizado) 10 minutos antes de utilizarse.

### **2.6.2.1 Preparación de los estándares para IL-6**

Se reconstituyó el estándar de IL6 con 5 mL del calibrador diluyente RD6F (suero animal con preservativos) que provee el kit. Esto produce una solución patrón de 300 pg/mL que se agitó por inversión por 15 minutos. Después se pipetearon 667  $\mu$ L del calibrador diluyente en un tubo correspondiente a una concentración de 100 pg/mL y en 5 tubos restantes se pipetearon 500  $\mu$ L del calibrador diluyente RD6F. A partir de la solución estándar patrón se realizó diluciones seriadas de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 pg/mL. El estándar sin diluir se utilizó como el de concentración más alta (300

pg/mL) y la solución diluyente sirvió como blanco.

### **2.6.2.2 Determinación de IL-6**

Se adicionaron 100  $\mu$ L del diluyente RD1A (buffer proteico con preservativos) a cada celda; se adicionaron 100  $\mu$ L del estándar o del suero en estudio a cada celda, se cubrió con una tapa adhesiva y se incubó por 2 hrs. a temperatura ambiente. Se aspiró cada celda y se lavó con buffer, se repitió este proceso tres veces para un total de 4 lavados. El buffer de lavado fue eliminado invirtiendo la placa sobre un papel absorbente. Se adicionaron 200  $\mu$ L del conjugado de IL-6 a cada celda y se cubrió con una tapa adhesiva nueva; se incubó 2 hrs. a temperatura ambiente. Se repitió el lavado por 4 ocasiones y se adicionaron 200  $\mu$ L de la solución de substrato a cada celda. Se incubó por 20 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción a cada celda. Se agitó uniformemente la placa por rotación sobre una superficie plana. Se determinó la densidad óptica de cada celda a 450 nm. dentro de los 30 min. de que se detuviera la reacción; la concentración se obtuvo por interpolación con una curva de calibración.

### **2.6.3 Preparación de las soluciones para FNT $\alpha$ :**

#### ***Solución de lavado***

Se disolvieron 100 mL del amortiguador concentrado de lavado (buffer surfactante con preservativos) que provee el kit de para FNT $\alpha$  en 400 mL de agua destilada.

***Solución de sustrato***

Se disolvió el sustrato liofilizado (NADPH con estabilizadores) en 6 mL del diluyente para sustrato 10 minutos antes de utilizarse.

***Solución amplificadora***

Se disolvió el amplificador liofilizado (enzimas con estabilizadores) en 6 mL del diluyente para el amplificador.

**2.6.3.1 Preparación de los estándares para FNT $\alpha$** 

Se reconstituyó el estándar de FNT $\alpha$  con 1 mL del calibrador diluyente HD6J (suero animal con preservativos) que provee el kit. Esto produce una solución patrón de 32 pg/mL que se agito por inversión por 15 minutos. Después se pipeteó 500  $\mu$ L del calibrador diluyente HD6J en 6 tubos y a partir de la solución estándar patrón se realizó diluciones seriadas de 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 pg/mL. El estándar sin diluir se utilizó como el de concentración mas alta (32 pg/mL) y la solución diluyente sirvió como blanco.

**2.6.3.2 Determinación de FNT $\alpha$  de alta sensibilidad.**

Se adicionaron 50  $\mu$ L del diluyente HD1-11 (buffer proteico con preservadores) a cada celda; se adicionaron 200  $\mu$ L del estándar o del suero en estudio a cada celda, se cubrió con una tapa adhesiva y se incubó por 3 hrs. a temperatura ambiente. Se aspiró cada celda y se lavó con buffer, se repitió este proceso tres veces para un total de 4 lavados. El buffer fue eliminado al invertir la placa sobre un papel absorbente. Se adicionaron 200  $\mu$ L del conjugado de FNT $\alpha$  a cada celda y se cubrió con una tapa adhesiva nueva y se incubó por 2

hrs. a temperatura ambiente. Se repitió el lavado por 4 ocasiones y se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada celda. Se incubó por 45 min. a temperatura ambiente y se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución amplificadora a cada celda incubándose por 45 min. a temperatura ambiente. Se adicionó 50  $\mu$ L de la solución de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción a cada celda. Se agitó uniformemente la placa por rotación sobre una superficie plana. Se determinó la densidad óptica de cada celda a 490 nm. dentro de los 30 min. de que se detuviera la reacción; la concentración se obtuvo por interpolación con una curva de calibración.

## **2.7 Determinación de Leucotrienos.**

### **2.7.1 Preparación de las soluciones.**

Se empleó una mezcla de estándares de ácido dihidroxioeicosatetraenoico {LTB<sub>4</sub>(22%), trans-6-LTB<sub>4</sub> (19%), trans-6-12-epi-LTB<sub>4</sub> (21%), 5S,6R-DIHETE (18%) y 5S,6S-DIHETE (19%)} cuya concentración era de 100  $\mu$ g/mL, una mezcla de estándares de péptido-LTS {LTC<sub>4</sub> (33%), LTD<sub>4</sub> (34%) y LTE<sub>4</sub> (33%)} con una concentración de 50  $\mu$ g/mL y así como LTB<sub>4</sub> a una concentración de 99  $\mu$ g/mL, LTC<sub>4</sub> a una concentración de 54  $\mu$ g/mL, LTD<sub>4</sub> a una concentración de 50  $\mu$ g/mL y el LTE<sub>4</sub> a una concentración de 55  $\mu$ g/mL.

A partir de estos estándares se tomaron 10  $\mu$ l de cada uno y se diluyeron en 200  $\mu$ l de metanol; estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo



variando las condiciones siguientes: volumen de inyección, pH, flujo y composición de la fase móvil hasta encontrar las condiciones ideales de separación de estos compuestos tanto para las mezclas como para los leucotrienos individuales.

### 2.7.2. Optimización de los parámetros cromatográficos

Después de establecer las condiciones de detección se procedió a optimizar los parámetros cromatográficos de resolución (R), factor de capacidad ( $k'$ ) y el factor de selectividad ( $\alpha$ ) para mejorar la separación cromatográfica.

La separación se midió en base a la resolución, la cual se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$R = (t_2 - t_1) / 1/2 (W_1 + W_2)$$

El factor de capacidad se obtuvo para evaluar la retención así como para ajustar la separación con la siguiente fórmula:

$$K' = (t_n - t_0) / t_0$$

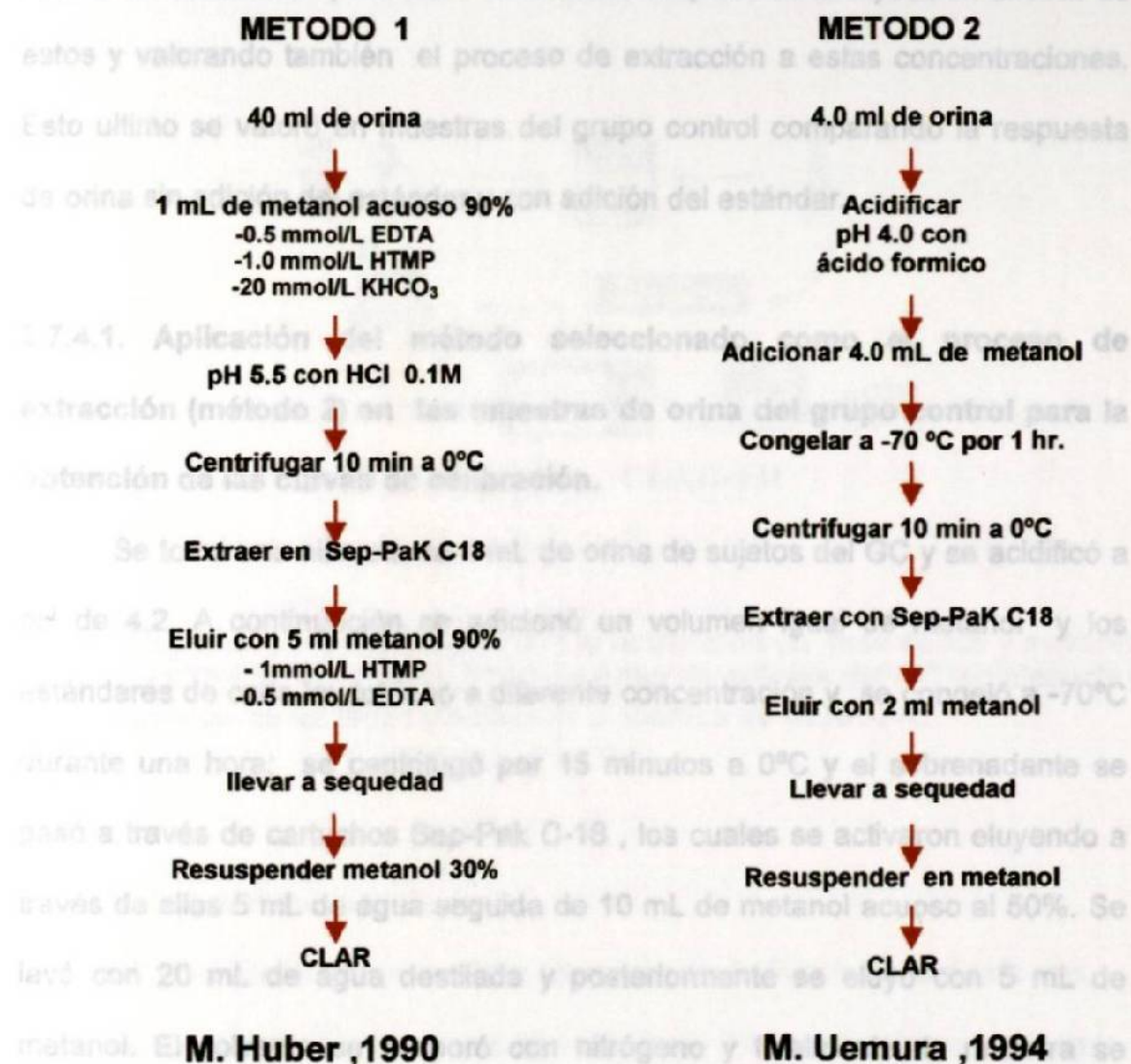
Siendo  $t_n$  el tiempo de retención del pico de interés y  $t_0$  el tiempo del volumen muerto.

El factor de selectividad se obtuvo del cociente entre los factores de capacidad de un par de picos.

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

### 2.7.3.- Selección del método de extracción en fase sólida

2.7.4 Una vez que se establecieron las condiciones de separación, se procedió a evaluar el proceso de extracción. Se compararon dos métodos descritos en la literatura por Huber y cols. (método 1) y por Uemura y cols. (método 2). El diagrama de flujo se muestra en el siguiente diagrama (Fig. 5).



(63) **Figura 5. Diagrama de los métodos planteados para el proceso de extracción de los leucotrienos.**

#### **2.7.4. Soluciones de trabajo para las curvas de calibración**

En base a los estándares de los leucotrienos y tomando en cuenta las concentraciones normales descritas en orina (LTE4: 0.228 ng/mL; LTD4: 0.258 ng/mL; LTC4: 0.325 ng/mL , LTB4 0.174 ng/mL) se procedió a evaluar las curvas de calibración para cada leucotrieno empleando la inyección directa de estos y valorando también el proceso de extracción a estas concentraciones. Esto último se valoró en muestras del grupo control comparando la respuesta de orina sin adición del estándar y con adición del estándar.

##### **2.7.4.1. Aplicación del método seleccionado como el proceso de extracción (método 2) en las muestras de orina del grupo control para la obtención de las curvas de calibración.**

Se tomó una alícuota de 4 mL de orina de sujetos del GC y se acidificó a pH de 4.2. A continuación se adicionó un volumen igual de metanol y los estándares de cada leucotrieno a diferente concentración y se congeló a -70°C durante una hora; se centrifugó por 15 minutos a 0°C y el sobrenadante se pasó a través de cartuchos Sep-Pak C-18 , los cuales se activaron eluyendo a través de ellos 5 mL de agua seguida de 10 mL de metanol acuoso al 50%. Se lavó con 20 mL de agua destilada y posteriormente se eluyó con 5 mL de metanol. El solvente se evaporó con nitrógeno y finalmente, la muestra se resuspendió en 300  $\mu$ L de la fase móvil metanol:agua:ácido acético pH 5.6 (65/35), y se filtró antes de ser inyectado en el cromatógrafo.

El análisis por CLAR-FR se realizó en un cromatógrafo de líquidos modelo HP1090 con arreglo de diodos, utilizando como fase estacionaria ODS-Hypersil C-18. Se emplearon las condiciones establecidas inicialmente en el proceso de separación..

Finalmente se evaluaron los resultados de 5 extracciones a diferentes concentraciones para cada leucotrieno en 5 matrices distintas.

### 2.7.5.2.- Sensibilidad



**Figura 6. Diagrama de la estrategia para la extracción en fase sólida y separación de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> en orina de sujetos del GC adicionada con estándares de leucotrienos por la técnica de CLAR-FR.**

### 2.7.5.- Validación del método

#### 2.7.5.1.- Determinación de la Linearidad y la Precisión del método.

Para determinar la linealidad se realizaron 3 determinaciones para cada concentración, especificadas en la curva de calibración. Se trazó una curva de regresión lineal para cada analito sin promediar los puntos. Estos cálculos fueron realizados usando el programa de computadora Cricket-Grafics.

La precisión se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{DER}=\%CV=(DE/X)*100$$

Donde:

DE: Desviación estándar de la muestra

X: Media aritmética de  $x_i$  mediciones

### **2.7.5.2.- Sensibilidad**

Se establecieron en base a los límites de detección y los límites de cuantificación de la siguiente manera:

Límite de detección del método (LDM)

Se determinó adicionando los estándares de los leucotrienos a las muestras de orina del grupo control por separado así como en mezcla de los 4 LTS. El procedimiento completo fué sometido a análisis incluyendo el procedimiento de extracción. Este se calculó a partir de la desviación estándar de la respuesta al origen de la ordenada (DE) y la pendiente de la curva de calibración (P) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{LDM}= 3.3*(DE/P)$$

El procedimiento para la obtención del LDM siguió los siguientes pasos:

- a) Se obtuvo la ecuación de la curva de calibración para cada una de las tres repeticiones efectuadas a los diferentes niveles de concentración de los leucotrienos.
- b) Se utilizaron estas ecuaciones para obtener el valor de la ordenada al origen (esto es el valor de la "b" o blanco).

- c) Se calculó la desviación estándar mediante el uso de los tres valores de "b".
- d) Se calculó la pendiente promedio general mediante el uso de las 3p (pendientes individuales) de las curvas de calibración obtenidas.
- e) Se aplicó la ecuación para LDM

El Límite de cuantificación del método (LCM) se calculó a partir de la DE y de la P de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{LCM}=10*(\text{DE}/\text{P})$$

#### **2.7.5.3.- Exactitud**

Se seleccionaron 3 estándares de calibración para cada leucotrieno cubriendo el rango de trabajo a nivel bajo, medio e intermedio. Se analizó cada nivel de concentración, por triplicado. Se calculó a cada nivel de concentración el error individual y promedio; se determinó el promedio general y la desviación estándar del error a los tres niveles de concentración.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad adicionada} \times 100}{\text{Cantidad recuperada}}$$

#### **2.7.5.4. Robustez**

Dentro de los ensayos de robustez del método de separación se consideraron los siguientes factores:

**pH:** Se realizaron inyecciones de estándares usando los siguientes valores de pH de la fase móvil: 5.0, 5.3 y 5.9

**Composición de la fase móvil:** Se realizaron determinaciones disminuyendo la concentración de metanol 68:28 65:35, 60:40,

**Flujo:** Se realizaron determinaciones usando 0.2 y 0.6 mL/min. en vez de 0.4 mL/min.

**Matriz:** Se realizaron determinaciones empleando distintas muestras de orina, incluyendo una muestra de orina de un paciente con shock séptico y otro con cirrosis hepática.

#### **2.7.6 Aplicación del método validado a las muestras de orina de los tres grupos de estudio (AHA, GPR y GC).**

Se analizaron muestras de orina de pacientes recolectadas por micción espontánea en período agudo y en post-recuperación total, así como orina del grupo control. Las muestras se dividieron en alícuotas de 40 mL de orina a las cuales se les adicionaron 20 mmol/L de EDTA, 5 mmol de HTMP y argón como estabilizadores y se congelaron a -70°C hasta su análisis por la técnica de CLAR-FR antes descrita (Método descrito por Uemura y cols.). Los eluatos fueron inyectados en un cromatógrafo de líquidos, utilizando como fase estacionaria ODS-Hypersil C-18, empleando una fase móvil de metanol:agua:ácido acético pH de 5.6 a un flujo de 0.5 mL/min y monitoreando la señal a 280 nm.

## **2.8 Análisis estadístico.**

Se utilizaron las siguientes pruebas inferenciales: el análisis de correlación múltiple, el análisis de varianza y la prueba de t de Student pareada para el análisis de los resultados. Los parámetros fueron: la media y desviación estándar para cada leucotrieno, citocina y proteína en los tres grupos de estudio. Se empleó el paquete de computación Statistica para el procesamiento de los datos.



## **CAPITULO III**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Constitución de los grupos de estudio**

El grupo total de pacientes en la fase aguda se constituyó por 49 casos (40 del sexo masculino (M) y 9 del sexo femenino (F)) con una edad promedio de  $36 \pm 11$  años.

El grupo post-recuperación se constituyó por 40 pacientes después de la recuperación total estudiados 2 meses después del alta hospitalaria.

El grupo control se constituyó de 30 sujetos clínicamente sanos (20M y 10F) con una edad promedio de  $25 \pm 4$  años.

#### **3.2 Expediente clínico para ingreso al protocolo de investigación**

A todos los pacientes se les completó un expediente clínico para su ingreso al protocolo. Se valoraron las pruebas de funcionamiento hepático (PFH), la biometría hemática (BH) y el título de seroameba por hemaglutinación. Los valores promedio de las PFH y BH se presentan en la tabla III.

**Tabla III. Biometría hemática y pruebas de funcionamiento hepático en pacientes con absceso hepático amibiano en la fase aguda**

Prueba	$\bar{x} \pm 1DE$	Prueba	$\bar{x} \pm 1DE$	Prueba	$\bar{x} \pm 1DE$
Hb(g/dL)	10.1 $\pm$ 1.6	B.T.(mg/dL)	1.8 $\pm$ 1.3	Glob(g/dL)	3.8 $\pm$ 0.7
Hto(%)	31.0 $\pm$ 4.3	B.D.(mg/dL)	1.1 $\pm$ 1.1	GGT*	3.0 $\pm$ 2.3
CMHG(%)	32.0 $\pm$ 1.4	B.I.(mg/dL)	0.7 $\pm$ 0.4	ALT*	0.3 $\pm$ 0.5
Leu (mm <sup>3</sup> )	16,520 $\pm$ 5,087	P.T.(g/dL)	6.5 $\pm$ 0.8	AST*	0.5 $\pm$ 0.8
Plaq.(mm <sup>3</sup> )	295,777 $\pm$ 124,296	Alb.(g/dL)	2.6 $\pm$ 0.6	F.A*	0.6 $\pm$ 0.6

Hb= Hemoglobina, Hto= Hematocrito, CMHG= Concentración media de hemoglobina globular, Leu.= Leucocitos, Plaq= Plaquetas, B.T.= Bilirrubina total, B.D.= Bilirrubina Directa, B.I.=Bilirrubina indirecta, P.T=Proteínas totales, Alb.= Albúmina, Glob.= Globulinas, GGT= Gamaglutamiltransferasa, ALT=alaninaminotransferasa, AST=aspartatoaminotransferasa, F.A =Fosfatasa alcalina.

\* Número de veces elevado del límite superior normal

La presencia de los signos y los síntomas de AHA durante la fase aguda en el grupo de pacientes se consignaron en el expediente clínico (apéndice A).

### 3.3 Determinación de las proteínas de fase aguda

Se obtuvo una curva de calibración para cada una de las proteínas analizadas, posteriormente se presentan los niveles séricos de las proteínas en los grupos de estudio (AHA, GPR y GC) y finalmente se resume el análisis estadístico de los datos.

#### 3.3.1 Curvas de calibración de las proteínas de fase aguda

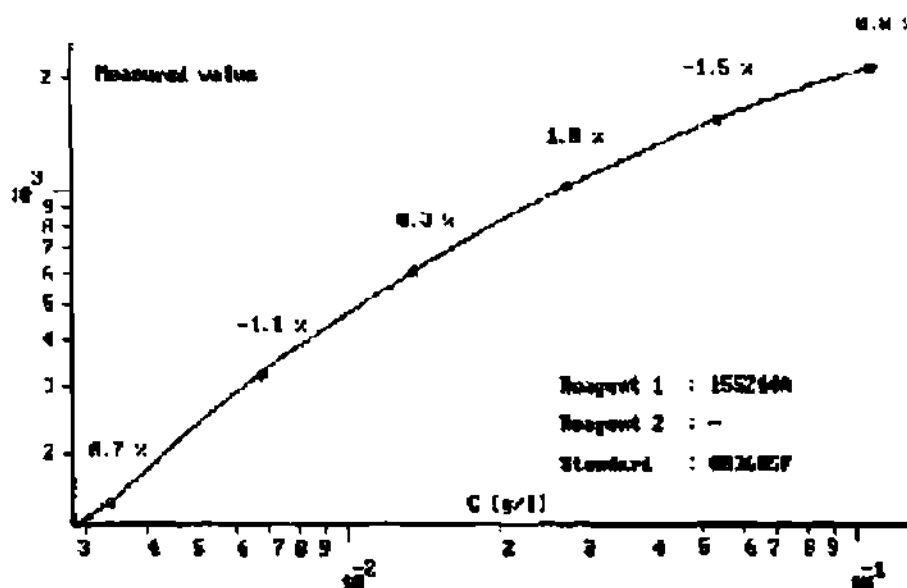
Las curvas de calibración obtenidas en el nefelómetro BN100 fueron determinadas con los estándares que se muestran en la tabla IV para cada

proteína: HPT, CER, C3, PCR y TRF. Se repitió la curva de calibración cada 15 determinaciones de cada proteína.

**TABLA IV. Estándares utilizados para obtener las curvas de calibración de las proteínas de fase aguda**

	HPT (gr/L)	CER (gr/L)	TRF (gr/L)	PCR (gr/L)	C3 (gr/L)
ESTANDAR 1	0.601	0.109	0.312	0.419	0.145
ESTANDAR 2	0.311	0.053	0.154	0.215	0.072
ESTANDAR 3	0.149	0.027	0.079	0.104	0.036
ESTANDAR 4	0.076	0.014	0.038	0.052	0.018
ESTANDAR 5	0.038	0.007	0.020	0.027	0.009
ESTANDAR 6	0.019	0.003	-----	0.013	0.005
ESTANDAR 7	-----	-----	-----	0.007	-----

Las curvas de calibración obtenidas por estos estándares se muestran en las figuras 7-11.



**Figura 7. Curva de calibración de ceruloplasmina**

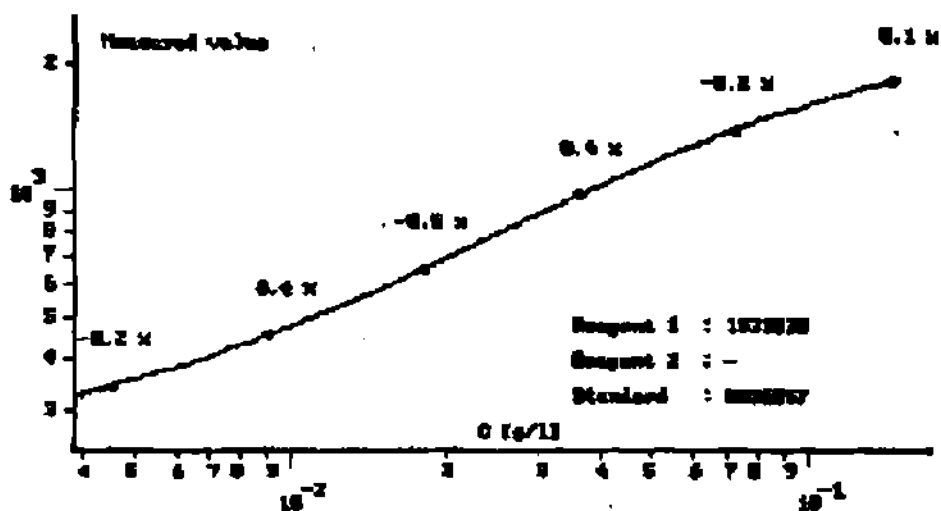


Figura 8. Curva de calibración de la fracción C3 del complemento

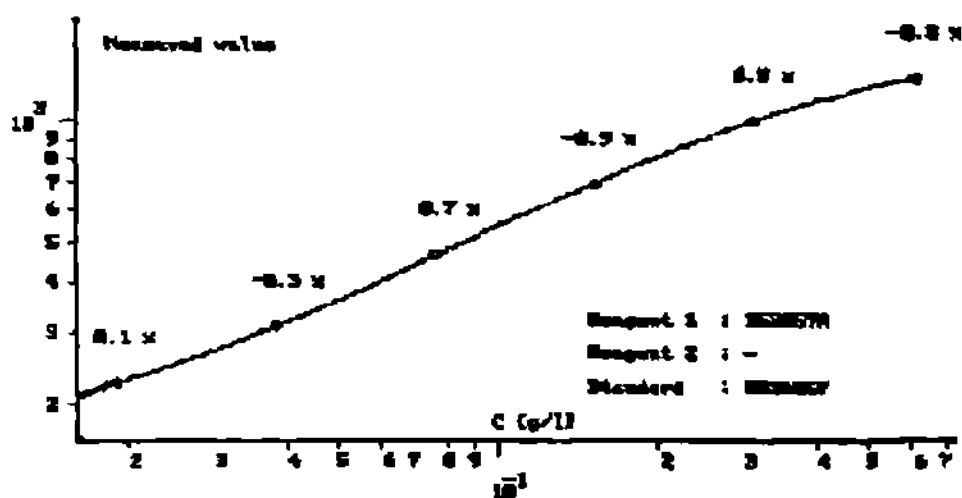


Figura 9. Curva de calibración de haptoglobina

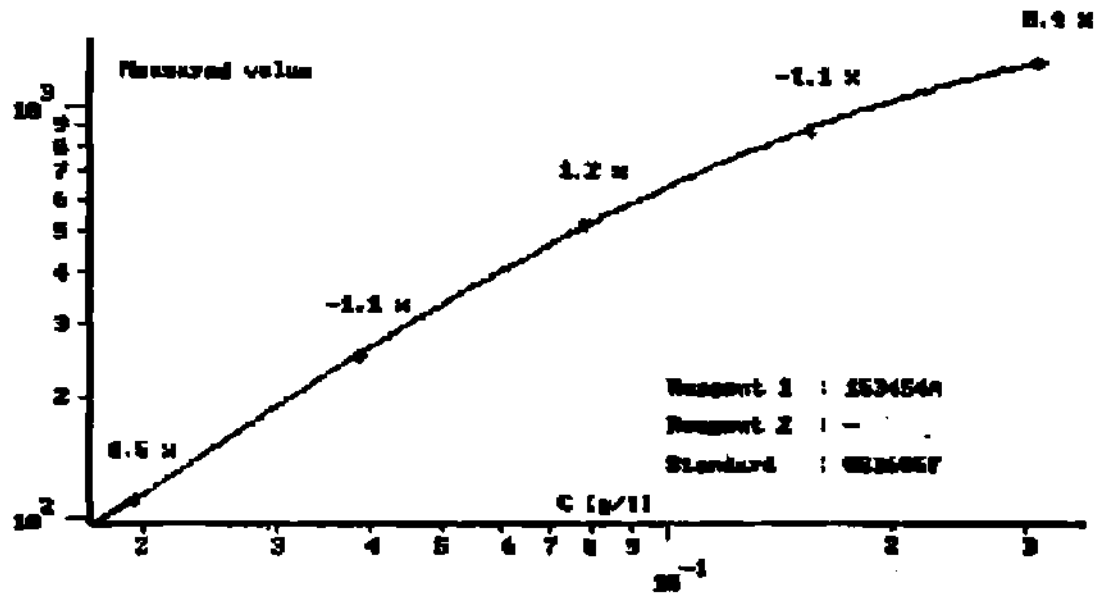


Figura 10. Curva de calibración de transferrina

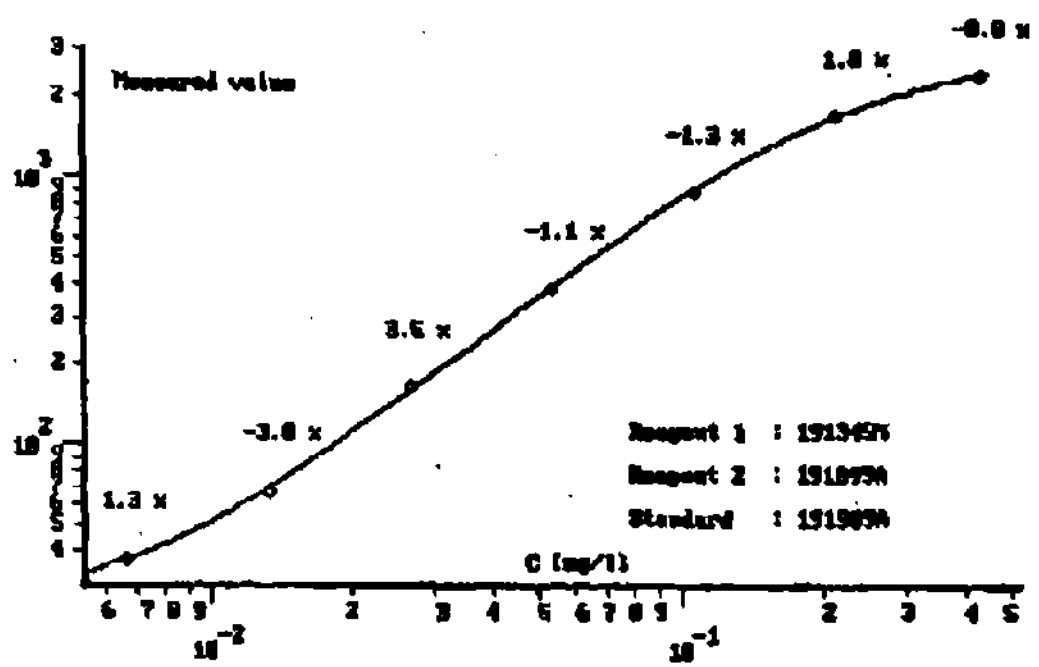


Figura 11. Curva de calibración de proteína C reactiva

### 3.3.2 Cuantificación de las proteínas de fase aguda

Se encontró con respecto al GC durante la fase aguda del AHA y en el GPR los siguientes resultados; para la fracción C3 del complemento en el grupo con AHA 15 pacientes presentaron valores disminuidos (31%), 33 pacientes (67%) tenían valores normales y sólo un paciente (2%) presentó valores elevados respecto al GC (VR= 0.8-1.2 gr/L), mientras que para el GPR 7 pacientes seguían teniendo valores disminuidos reduciéndose a un 17 % comparado con la fase aguda, 31 pacientes seguían normales (78%) y 2 pacientes (5%) presentaron valores elevados respecto al GC (Tabla V); para la proteína PCR en el grupo con AHA los 49 (100%) pacientes presentaron valores elevados respecto al GC (VR= 1.9-2.8 gr/L), mientras que para el GPR 22 pacientes se normalizaron (55%) con respecto a la fase aguda y 18 pacientes (45%) seguían presentando valores elevados respecto al GC (Tabla V); para la proteína HPT en el grupo con AHA 3 pacientes (6%) tenían valores normales y 46 pacientes (94%) presentaron valores elevados respecto al GC (VR= 0.3-1.5 gr/L), mientras que para el GPR 20 pacientes se normalizaron en un 50% con respecto a la fase aguda (80%) y 20 pacientes (50%) seguían presentando valores elevados respecto al GC (Tabla V); para la proteína TRF en el grupo con AHA 40 pacientes presentaron valores disminuidos (82%), 8 pacientes (16%) tenían valores normales y sólo un paciente (2%) presentó valores elevados al compararse con el GC (VR= 1.8-3.2 gr/L), mientras que para el GPR 2 pacientes (5%) seguían teniendo valores disminuidos comparado con la fase aguda, 32 pacientes se normalizaron (80%) y 6 pacientes (15%) presentaron valores elevados respecto al GC (Tabla VI). La CER en el grupo

con AHA 3 pacientes presentaron valores disminuidos (6%), 20 pacientes (16%) tenían valores normales y 26 pacientes (53%) presentaron valores elevados respecto al GC (VR= 0.12-0.28 gr/L), mientras que para el GPR 2 pacientes seguían teniendo valores disminuidos (5 %), 36 pacientes se normalizaron (90%) con respecto a la fase aguda y 2 pacientes (5%) presentaron valores elevados respecto al GC (Tabla VI).

Se observó que todas las proteínas de fase aguda estudiadas presentaron alteración con respecto a los valores de referencia establecidos en el GC, sin embargo la TRF, la HPT y la PCR fueron los reactantes más alterados y con mayor consistencia en la fase aguda del AHA.

**Tabla V. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda C3, PCR y HPT en el grupo con AHA, GPR y GC.**

No. de Pac.	C3 gr/L			PCR mg/L			HPT gr/L		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
1	0.86	1.10	1.69	133.00	2.90	2.70	6.42	1.07	2.59
2	0.80	1.69	0.92	117.40	2.60	2.60	6.52	1.69	1.75
3	1.16	—	1.00	107.00	—	2.70	9.13	—	1.69
4	1.61	0.85	0.83	28.00	2.90	2.70	5.62	1.40	1.77
5	0.95	1.00	1.03	348.60	6.10	2.60	6.52	1.75	2.88
6	0.90	0.83	0.86	21.80	2.60	2.60	7.26	1.63	1.10
7	0.33	1.12	1.02	126.50	4.20	2.60	2.30	1.20	0.38
8	1.07	—	0.69	22.00	—	2.60	5.71	—	0.68
9	0.58	0.86	0.76	66.10	2.80	2.80	4.10	1.90	0.43
10	1.26	1.43	1.08	79.20	2.60	2.60	11.99	1.80	1.43
11	0.80	0.83	0.87	117.80	3.50	2.80	6.70	1.11	0.92
12	0.90	1.12	1.00	209.40	13.10	2.70	5.92	0.70	0.55
13	0.51	—	1.18	106.80	—	2.60	4.92	—	0.79
14	0.85	0.96	1.50	110.50	2.90	2.60	6.70	1.78	1.02
15	0.95	0.76	0.90	301.20	3.70	2.80	5.81	2.30	0.38
16	0.68	0.87	1.16	64.80	2.60	2.70	8.61	2.72	0.53
17	0.93	1.19	0.58	145.00	2.70	2.80	3.37	1.78	0.94
18	0.73	1.42	0.80	100.90	2.80	2.80	7.48	1.94	0.41
19	1.02	—	0.50	118.10	—	2.70	7.15	—	0.38
20	0.41	0.67	1.05	331.70	4.20	2.60	3.57	2.90	0.85
21	0.53	0.82	0.75	63.10	2.90	2.60	2.53	1.72	0.64
22	0.84	0.96	0.68	78.30	3.10	2.70	2.37	0.90	0.38
23	1.62	—	1.16	323.40	—	2.80	5.70	—	0.49
24	0.80	1.12	1.15	101.20	2.70	2.60	2.23	1.13	1.21
25	1.53	—	0.80	400.30	—	2.60	4.72	—	0.93
26	0.68	0.88	1.02	20.50	2.60	2.80	1.29	0.70	0.38



**Tabla V. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda en el grupo con AHA, GPR y GC.(continuación)**

No. de Pac.	C3 gr/L			PCR mg/L			HPT gr/L		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
27	1.05	1.23	0.91	114.20	2.90	2.70	3.63	1.32	0.38
28	0.88	0.92	0.70	14.70	2.60	2.60	2.77	1.07	1.94
29	0.70	1.03	1.00	27.70	2.60	2.80	1.58	0.53	0.99
30	0.88	—	0.81	151.90	—	2.70	4.65	—	1.42
31	0.90	1.55		359.20	4.70		3.95	1.93	
32	0.86	1.43		133.90	2.30		5.43	2.70	
33	1.16	1.15		117.40	2.60		6.71	1.10	
34	0.95	1.20		126.50	3.00		4.16	0.65	
35	0.58	0.98		66.00	2.30		7.15	1.20	
36	1.26	—		81.00	—		6.23	—	
37	0.90	1.23		119.00	3.00		7.14	0.60	
38	0.85	1.10		106.10	2.70		3.61	1.31	
39	0.96	1.02		67.90	2.60		4.77	1.95	
40	0.70	0.87		102.70	3.10		5.42	2.46	
41	0.73	0.70		331.00	4.20		2.98	1.17	
42	1.01	1.00		93.00	2.30		4.42	1.65	
43	0.53	—		78.40	—		1.29	—	
44	0.85	0.75		100.12	2.80		2.77	0.63	
45	1.23	1.00		114.40	3.00		4.65	1.67	
46	0.82	0.80		29.70	2.30		3.95	1.24	
47	0.69	0.65		132.00	2.60		6.42	2.72	
48	1.02	0.97		93.20	2.60		5.62	2.67	
49	0.88	0.67		49.70	2.70		6.52	2.75	

— No determinado

**Tabla VI. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda TRF y CER en el grupo con AHA, GPR y GC.**

No. de Pac.	TRF gr/L			CER gr/L		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
1	1.66	3.52	2.63	0.36	0.20	0.16
2	1.10	2.09	3.94	0.23	0.17	0.17
3	2.07	—	2.45	0.28	—	0.18
4	3.58	3.97	1.56	0.27	0.19	0.18
5	0.93	2.77	3.03	0.34	0.15	0.14
6	1.81	2.51	1.79	0.23	0.17	0.16
7	0.40	2.47	2.46	0.34	0.23	0.18
8	1.83	—	2.33	0.32	—	0.20
9	0.74	3.81	1.67	0.40	0.24	0.18
10	1.26	2.09	2.33	0.33	0.27	0.33
11	1.20	2.48	2.35	0.28	0.19	0.14
12	1.14	2.54	2.77	0.25	0.29	0.18
13	0.76	—	2.49	0.26	—	0.17
14	1.95	3.23	2.09	0.26	0.21	0.17
15	0.94	2.77	2.36	0.28	0.26	0.15
16	1.00	2.49	2.92	0.28	0.15	0.53
17	1.14	1.96	1.34	0.31	0.13	0.10
18	0.97	2.83	2.73	0.20	0.23	0.17
19	1.49	—	1.35	0.24	—	0.21
20	0.53	2.98	3.44	0.39	0.17	0.14
21	0.88	1.97	2.32	0.30	0.12	0.15
22	1.29	3.52	1.88	0.47	0.15	0.10
23	1.48	—	4.15	0.54	—	0.19
24	0.97	2.46	1.30	0.33	0.19	0.20
25	1.72	—	2.62	0.29	—	0.17
26	1.22	2.48	3.47	0.33	0.17	0.16
27	1.47	2.53	1.93	0.26	0.19	0.16

**Tabla VI. Concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda TRF y CER en el grupo con AHA, GPR y GC.(continuación)**

No. de Pac.	TRF gr/L			CER gr/L		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
28	2.77	1.07	1.94	0.24	0.17	0.18
29	1.58	0.53	0.99	0.10	0.12	0.14
30	1.34	—		0.30	—	0.15
31	1.41	2.16		0.28	0.10	
32	1.66	2.14		0.27	0.16	
33	1.11	3.71		0.11	0.10	
34	2.07	2.89		0.25	0.19	
35	0.96	1.97		0.39	0.22	
36	1.81	—		0.36	—	
37	1.83	3.42		0.22	0.21	
38	0.74	1.79		0.06	0.23	
39	1.26	3.97		0.36	0.20	
40	1.42	3.11		0.32	0.25	
41	1.95	3.43		0.32	0.28	
42	0.94	2.31		0.29	0.23	
43	1.00	—		0.28	—	
44	1.14	2.71		0.22	0.19	
45	0.97	1.93		0.32	0.27	
46	1.49	2.75		0.30	0.24	
47	0.88	2.10		0.60	0.39	
48	1.29	3.20		0.32	0.25	
49	1.48	2.97		0.67	0.37	

— No determinado

### 3.3.3 Valores promedio de las proteínas de fase aguda

El valor promedio de cada PFA así como la existencia de diferencia estadísticamente significativa en los grupos analizados, se presentan en la tabla VII y en la Fig. 12.

**Tabla VII. Niveles de proteínas de fase aguda**

PFA gr/L	AHA n=49 x±1DE	GPR n=40 x±1DE	GC n=30 x±1DE
HPT * , ** , ***	5.11±2.15	1.58±0.67	0.95±0.67
TRF * , **	1.32±0.52	2.69±0.58	2.48±0.72
C3 * , **	0.89±0.27	1.01±0.24	0.94±0.24
CER * , **	(n=45) 0.28±0.07	0.22±0.05	0.23±0.06
PCR * , ** , *** (mg/L)	(n=42) 91.83±41.98	3.26±1.76	2.68±0.08

(\* ) = AHA vs GPR p<0.05, (\*\* ) = AHA vs GC p<0.05, (\*\*\*) = GPR vs GC p<0.05

Se decidió eliminar 4 pacientes en la determinación de CER y 7 en la determinación de PCR para disminuir la dispersión de los resultados y posteriormente aplicar el análisis estadístico.

Se encontró una alteración en las 5 proteínas de fase aguda estudiadas, esto se muestra por una elevación de la CER, la PCR y la HPT y a la vez una disminución de la TRF y la fracción C3 del complemento en los pacientes con AHA durante la fase aguda encontrándose diferencia estadísticamente significativa con respecto al GPR y GC señalada por (\*) y valor de p<0.05; se observó que los niveles de estas proteínas regresaban a niveles comparables con el GC en la fase de post-recuperación (Figura 12).

### 3.4.1 Curvas de calibración de las citocinas IL1 $\beta$ , IL6 y FNT $\alpha$

Los estándares utilizados para las curvas de calibración se presentan en la tabla VIII; en las Figuras 13-17 se presentan las curvas de calibración, las cuales fueron repetidas cada 25 determinaciones para cada citocina.

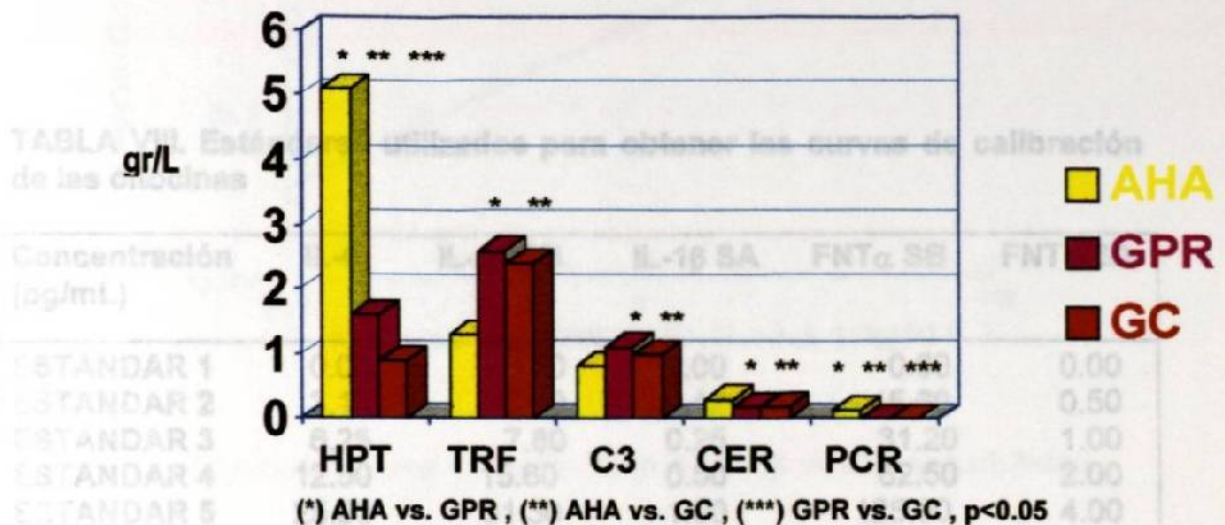


Figura 12. Niveles de las proteínas de fase aguda.

### 3.4 Determinación de las citocinas

Se obtuvo una curva de calibración para cada una de las citocinas analizadas, posteriormente se presentan los niveles séricos de las citocinas en los grupos de estudio (AHA, GPR y GC) y finalmente se resume el análisis estadístico de los datos.

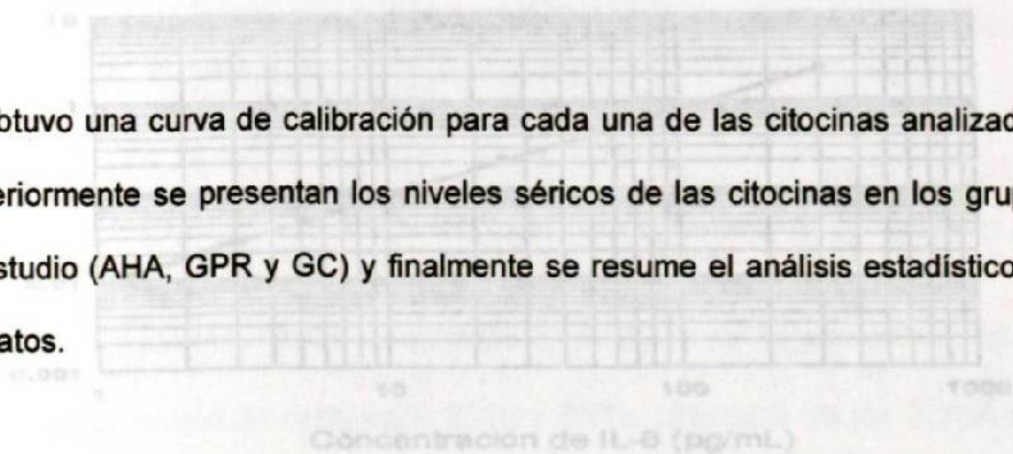


Figura 13. Curva de calibración de IL-6

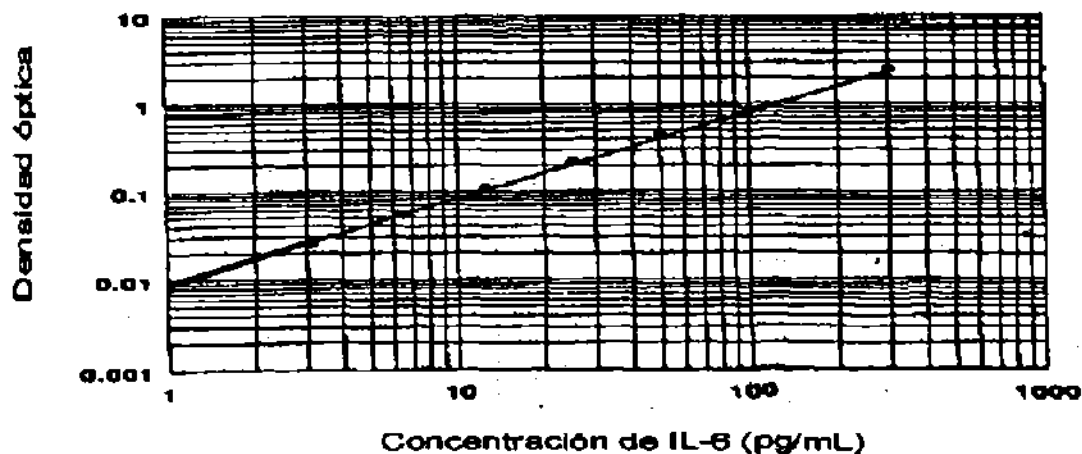
### 3.4.1 Curvas de calibración de las citocinas IL1 $\beta$ , IL6 y FNT $\alpha$

Los estándares utilizados para las curvas de calibración se presentan en la tabla VIII; en las Figuras 13-17 se presentan las curvas de calibración, las cuales fueron repetidas cada 25 determinaciones para cada citocina.

**TABLA VIII. Estándares utilizados para obtener las curvas de calibración de las citocinas**

Concentración (pg/mL)	IL-6	IL-1 $\beta$ SB	IL-1 $\beta$ SA	FNT $\alpha$ SB	FNT $\alpha$ SA
ESTANDAR 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ESTANDAR 2	3.13	3.90	0.12	15.60	0.50
ESTANDAR 3	6.25	7.80	0.25	31.20	1.00
ESTANDAR 4	12.50	15.60	0.50	62.50	2.00
ESTANDAR 5	25.00	31.30	1.00	125.00	4.00
ESTANDAR 6	50.00	62.50	2.00	250.00	8.00
ESTANDAR 7	100.00	125.00	4.00	500.00	16.00
ESTANDAR 8	300.00	250.00	8.00	1000.00	32.00

SA= sensibilidad alta, SB= sensibilidad baja



**Figura 13. Curva de calibración de IL-6**

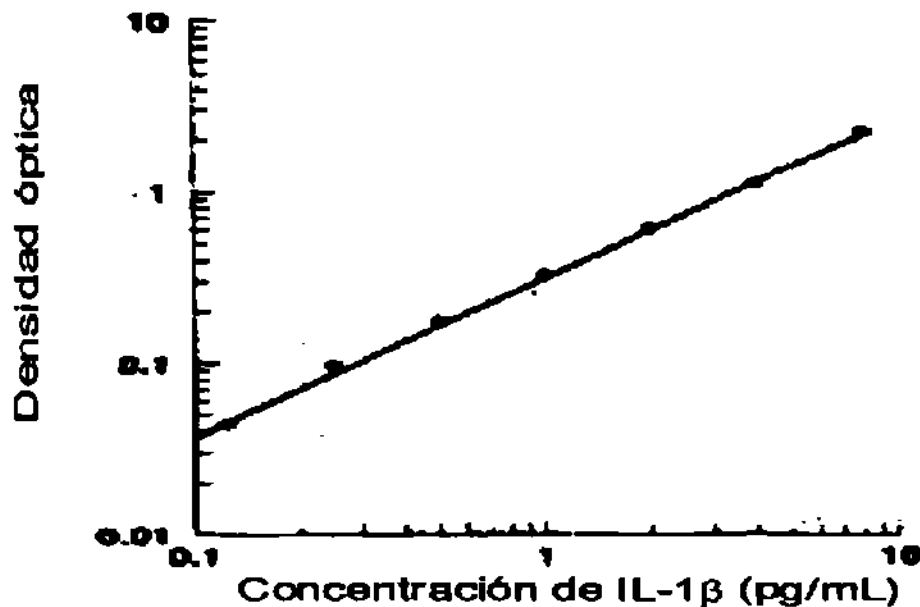


Figura 14. Curva de calibración de IL-1 $\beta$  de alta sensibilidad

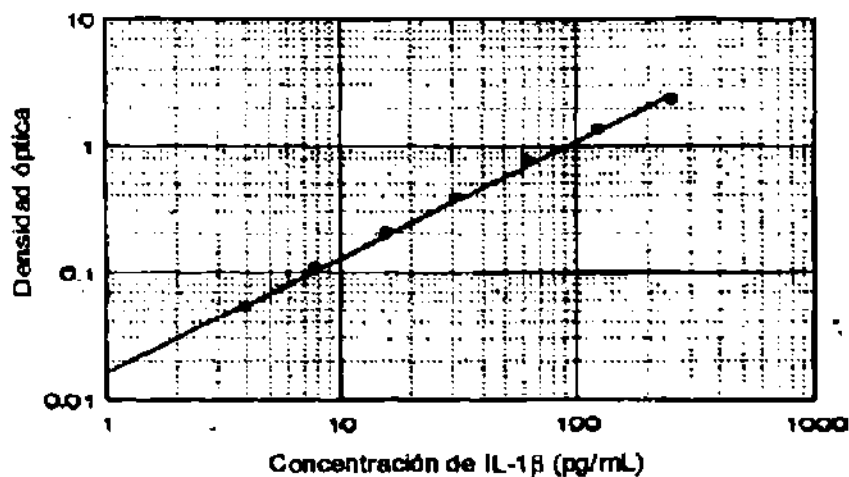


Figura 15. Curva de calibración de IL-1 $\beta$  de baja sensibilidad

Con las curvas de calibración IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  obtenidas de los ELISA de baja sensibilidad no se detectaron niveles séricos de estas citocinas en los grupos de estudio por lo que se emplearon los ensayos de ELISA de alta

sensibilidad, los cuales permitieron la cuantificación de estas dos citocinas apropiadamente.

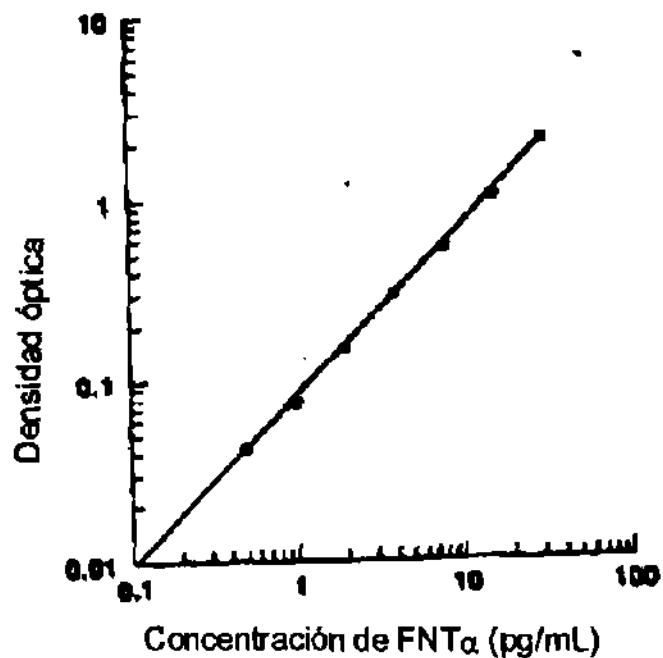


Figura 16. Curva de calibración de FNT $\alpha$  de alta sensibilidad

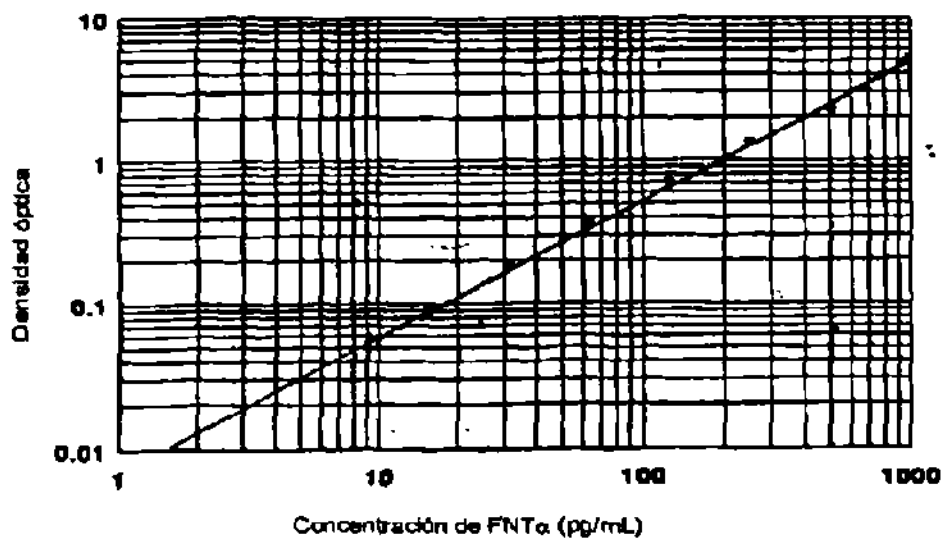


Figura 17. Curva de calibración de FNT $\alpha$  de baja sensibilidad



### 3.4.2 Cuantificación de las citocinas

La IL-6 estaba elevada en los 49 pacientes (100%) durante la fase aguda del AHA, en el GPR los 40 pacientes estudiados seguían presentando valores elevados con respecto al GC (VR=0.6-1.6 pg/mL) sin embargo estos estaban considerablemente disminuidos respecto a la medición de esta citocina en la fase aguda del AHA; la IL-1 $\beta$  se encontró elevada en los 49 pacientes (100%) durante la fase aguda del AHA con respecto al GC (VR= 0.1-0.3 pg/mL) y en el GPR 28 (70%) pacientes se normalizaron con respecto al GC mientras que 12 (30%) seguían elevados pero considerablemente disminuidos respecto a la medición inicial en la fase aguda (Tabla IX); para el FNT $\alpha$  46 pacientes (94%) tenían niveles elevados y 3 (6%) eran normales respecto al GC (VR= 0.6-1.4 pg/mL) y en el GPR 6 pacientes (15%) presentaban valores normales mientras que los restantes 34 pacientes (85%) mostraron valores disminuidos con respecto a la fase inicial del AHA (Tabla IX).

Se encontró que los niveles séricos de las tres citocinas estaban incrementados en la fase aguda de AHA, solamente los niveles séricos de IL-1 $\beta$  caían dentro del rango establecido como valor de referencia del GC en la mayoría de los pacientes del GPR (70%), mientras que para IL-6 y el FNT $\alpha$  los niveles séricos seguían elevados en el GPR pero considerablemente disminuidos con respecto a la fase aguda del AHA (Tabla IX).

**Tabla IX. Concentraciones séricas de las citocinas en el grupo con AHA, GPR y GC.**

No.de P/GC	IL-6(pg/mL)			IL-1 $\beta$ (pg/mL)			FNT $\alpha$ (pg/mL)		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
1	30.0	5.6	0.9	3.0	0.3	0.3	7.2	3.2	2.0
2	50.0	3.0	1.2	3.0	0.1	0.5	2.9	2.4	0.7
3	60.0	—	2.2	2.4	—	0.1	0.9	—	0.4
4	14.0	3.8	0.9	1.2	0.1	0.2	1.5	2.5	0.9
5	28.0	3.0	1.0	1.9	0.2	0.2	5.0	4.6	1.0
6	200.0	6.8	0.9	2.4	0.8	0.3	7.5	4.1	0.9
7	175.0	3.0	1.0	2.3	0.4	0.1	8.2	2.9	0.6
8	440.0	—	0.7	2.6	—	0.1	125.0	—	1.2
9	43.0	3.1	0.8	0.6	0.1	0.1	2.5	0.1	2.1
10	51.0	6.6	0.5	2.8	0.2	0.2	10.0	2.9	0.9
11	52.0	5.6	0.9	1.1	0.2	0.2	0.8	2.1	1.3
12	445.0	5.6	1.2	2.3	0.1	0.3	27.0	2.2	0.7
13	150.0	—	0.7	2.8	—	0.5	12.0	—	0.9
14	34.0	3.8	0.9	2.3	1.6	0.1	7.2	2.8	0.5
15	300.0	12.0	1.3	2.0	0.2	0.1	10.0	1.9	1.3
16	47.0	3.0	0.8	0.5	0.1	0.1	6.0	1.3	0.9
17	175.0	3.0	0.9	1.0	0.3	0.2	15.0	2.6	1.4
18	18.0	12.0	1.2	1.0	0.4	0.2	10.0	2.5	0.5
19	49.0	—	2.1	0.6	—	0.3	4.5	—	1.4
20	385.0	3.0	1.7	2.4	0.8	0.1	12.5	2.5	0.7
21	26.0	25.0	0.9	1.0	0.3	0.5	3.0	2.0	0.9
22	27.0	5.6	0.7	0.4	0.5	0.3	2.9	2.0	1.2
23	153.0	—	1.6	1.4	—	0.1	7.2	—	1.3
24	31.0	3.0	0.9	0.2	0.2	0.4	15.5	1.8	0.9
25	25.0	—	1.7	0.4	—	0.3	12.0	—	0.6
26	36.0	10.0	2.3	1.4	0.8	0.2	12.9	1.3	2.1
27	33.0	18.0	1.1	0.5	0.6	0.3	13.9	3.4	0.9
28	300.0	5.6	1.3	2.6	0.2	0.1	11.7	2.2	0.5
29	220.0	3.0	0.8	0.6	0.2	0.3	2.3	2.9	1.4
30	60.0	—	0.9	0.5	—	0.2	3.1	—	0.7
31	300.0	3.0		1.4	1.6		12.5	5.1	
32	130.0	5.6		0.8	0.2		5.2	2.4	
33	44.0	3.0		0.4	0.4		7.0	2.8	
34	300.0	6.8		2.5	0.5		8.6	2.2	
35	290.0	3.0		2.6	0.2		6.9	1.7	
36	150.0	—		2.3	—		3.5	—	
37	54.0	3.1		1.9	0.2		4.5	1.9	

**Tabla IX. Concentraciones séricas de las citocinas en el grupo con AHA, GPR y GC.**

No.de P/GC	IL-6(pg/mL)			IL-1 $\beta$ (pg/mL)			FNT $\alpha$ (pg/mL)		
	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC	AHA	GPR	GC
39	52.0	5.6	0.6	0.2	4.2	1.4			
40	160.0	5.6	1.5	0.1	8.7	1.7			
41	36.0	3.0	0.5	0.1	3.4	2.3			
42	7.0	3.0	1.9	0.1	5.2	3.0			
43	27.0	---	0.5	---	4.1	---			
44	74.0	3.0	2.4	0.4	12.9	3.1			
45	300.0	3.0	2.6	0.2	12.7	2.7			
46	66.0	3.1	1.1	0.3	2.1	1.3			
47	300.0	6.6	2.6	0.2	12.9	2.7			
48	6.2	5.6	0.1	0.1	1.0	1.0			
49	33.0	5.6	3.1	0.3	4.7	2.0			

---- No determinado

### 3.4.3 Valores promedio de la cuantificación de las citocinas

El valor promedio de cada citocina así como la existencia de diferencia estadística en los grupos analizados por la prueba t de tudent pareada se presenta en la tabla X y en la figura18. Se decidió eliminar 9 determinaciones de IL-6 (>300 pg/mL) y una de FNT $\alpha$  (>125 pg/mL) para disminuir la dispersión de los resultados y aplicar el análisis estadístico.

**Tabla X. Niveles de citocinas**

Citocina pg/mL		AHA n=49 $\bar{x}\pm 1DE$	GPR n=40 $\bar{x}\pm 1DE$	GC n=30 $\bar{x}\pm 1DE$
IL-6 <sup>*,**,***</sup>	n=40	73.0 $\pm$ 68.0	5.7 $\pm$ 4.4	1.1 $\pm$ 0.5
IL-1 $\beta$ <sup>*,**</sup>		1.5 $\pm$ 0.9	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.1
FNT $\alpha$ <sup>*,**,***</sup>	n=48	7.4 $\pm$ 5.1	2.3 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.4

(\*) = AHA vs GPR p<0.05

(\*\*) = AHA vs GC p<0.05

(\*\*\*) = GPR vs GC p<0.05

Sensibilidad

IL-6 = 0.70 pg/mL

IL-1 $\beta$  = 0.1 pg/mL

FNT $\alpha$  = 0.1 pg/mL

### 3.5 Análisis de leucotrienos

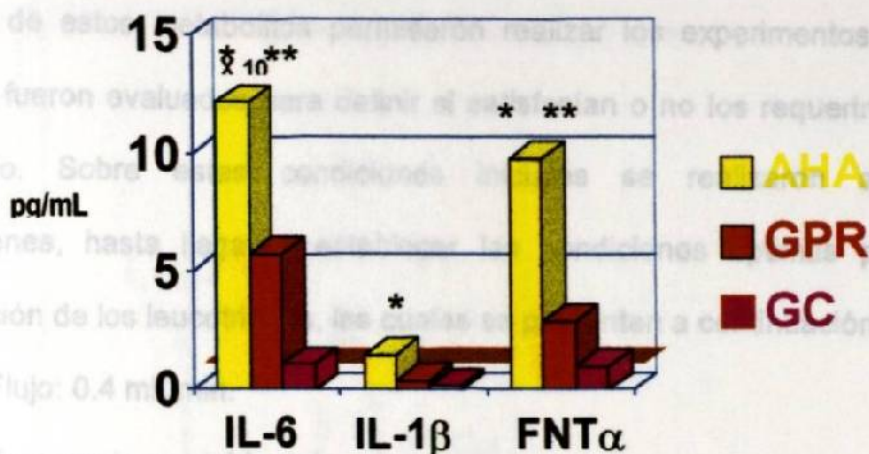
#### 3.5.1 Optimización de los parámetros cromatográficos.

Las condiciones cromatográficas iniciales reportadas en la literatura para

el estudio de estos leucotrienos se realizaron los experimentos cuyos resultados fueron evaluados para definir el método analítico que cumpliera con los requerimientos del trabajo. Sobre las condiciones iniciales se realizaron algunas modificaciones, hasta obtener las mejores condiciones para la determinación de los leucotrienos de interés en esta investigación:

Flujo: 0.4 mL/min

Temperatura: ambiental



(\*) AHA vs. GPR, (\*\*) AHA vs. GC, (\*\*\*) GPR vs. GC,  $p < 0.05$

Fase clínica aguda del AHA. **Figura 18. Niveles de citocinas en AHA, GPR y GC 1 mm, D.I.**

5 μm.

Los niveles de IL-6 fueron mayores que los de IL-1β y los de FNTα en los pacientes con fase clínica aguda del AHA. Estos valores disminuyeron durante la fase de post-recuperación pero siguieron siendo elevados con respecto al GC como se observa en la Fig. 18.

Los niveles de los leucotrienos en los pacientes con fase clínica aguda del AHA se puede observar en los cromatogramas de la figura 19 y 20. El tiempo total de elución fue de 20 minutos. De los 4 leucotrienos de interés el más abundante fue el compuesto con mayor tiempo de retención (9.3 min.). En el cromatograma se indica el orden de elución de los compuestos y los tiempos de retención característicos.

### **3.5 Análisis de leucotrienos**

#### **3.5.1 Optimización de los parámetros cromatográficos.**

Las condiciones cromatográficas iniciales reportadas en la literatura para el estudio de estos metabolitos permitieron realizar los experimentos cuyos resultados fueron evaluados para definir si satisfacían o no los requerimientos del trabajo. Sobre estas condiciones iniciales se realizaron algunas modificaciones, hasta llegar a establecer las condiciones óptimas para la determinación de los leucotrienos, las cuales se presentan a continuación:

- Flujo: 0.4 mL/min.
- Temperatura: ambiental
- Longitud de onda de monitoreo: 280 nm.
- Fase estacionaria: columna hypersil-ODS 100 mm x 2.1 mm, D.I. 5  $\mu$ m.
- Fase móvil:

Solvente A: metanol (65%)

Solvente B: agua, ácido acético pH = 5.4 (35%)

La separación de los metabolitos del ácido araquidónico con estas condiciones se puede observar en los cromatogramas de la figura 19 y 20. El tiempo total de elución fue de 20 minutos. De los 4 leucotrienos de interés el LTD4 fue el compuesto con mayor tiempo de retención (9.3 min.). En el cromatograma se indica el orden de elución de los compuestos y los tiempos de retención característicos.

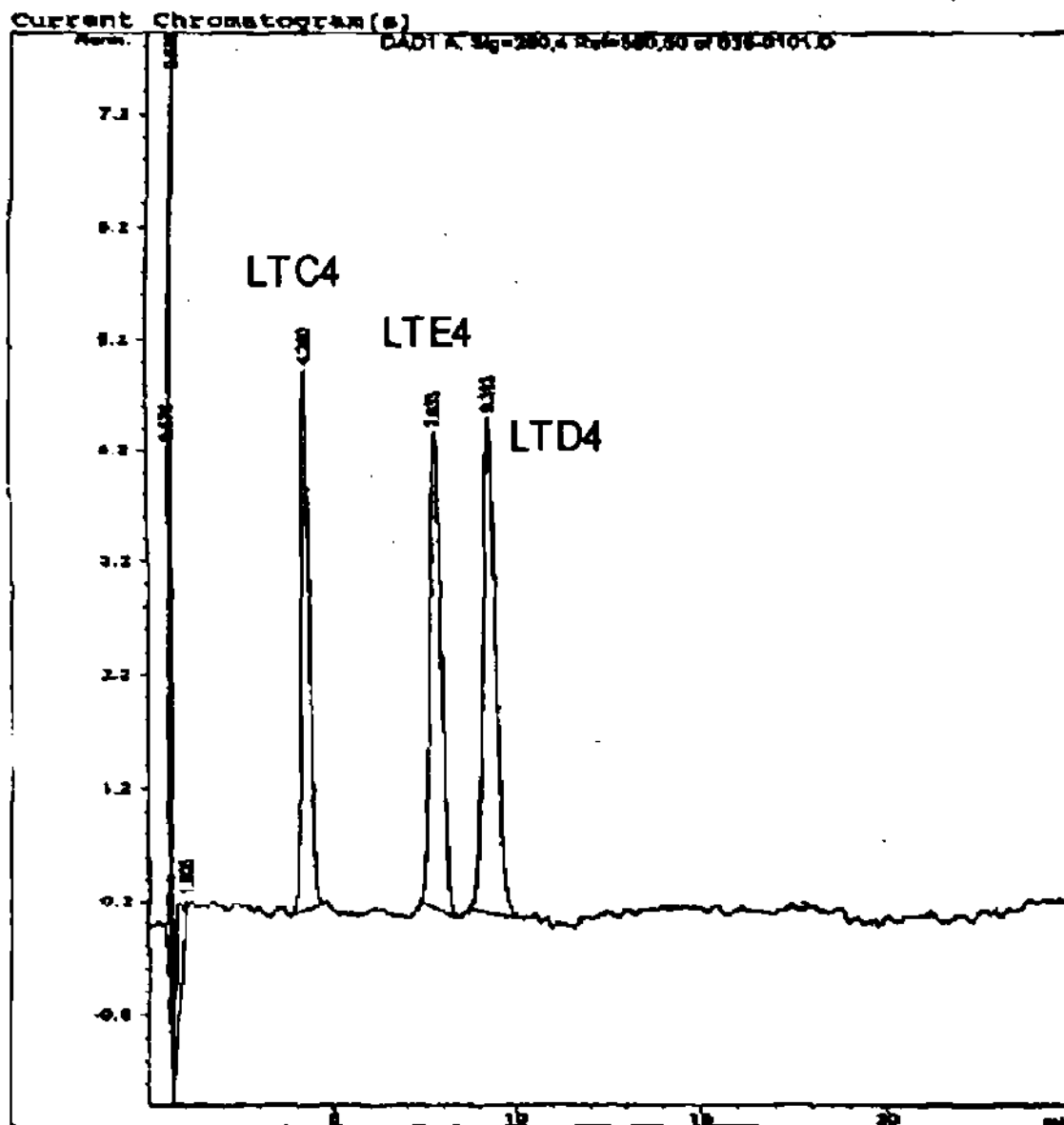


Figura 19. Cromatograma de los cistenil-eucotrienos separados por CLAR-FR. El orden de elución fue: LTC4, LTE4 y LTD4. Las condiciones de elución son descritas en el texto.

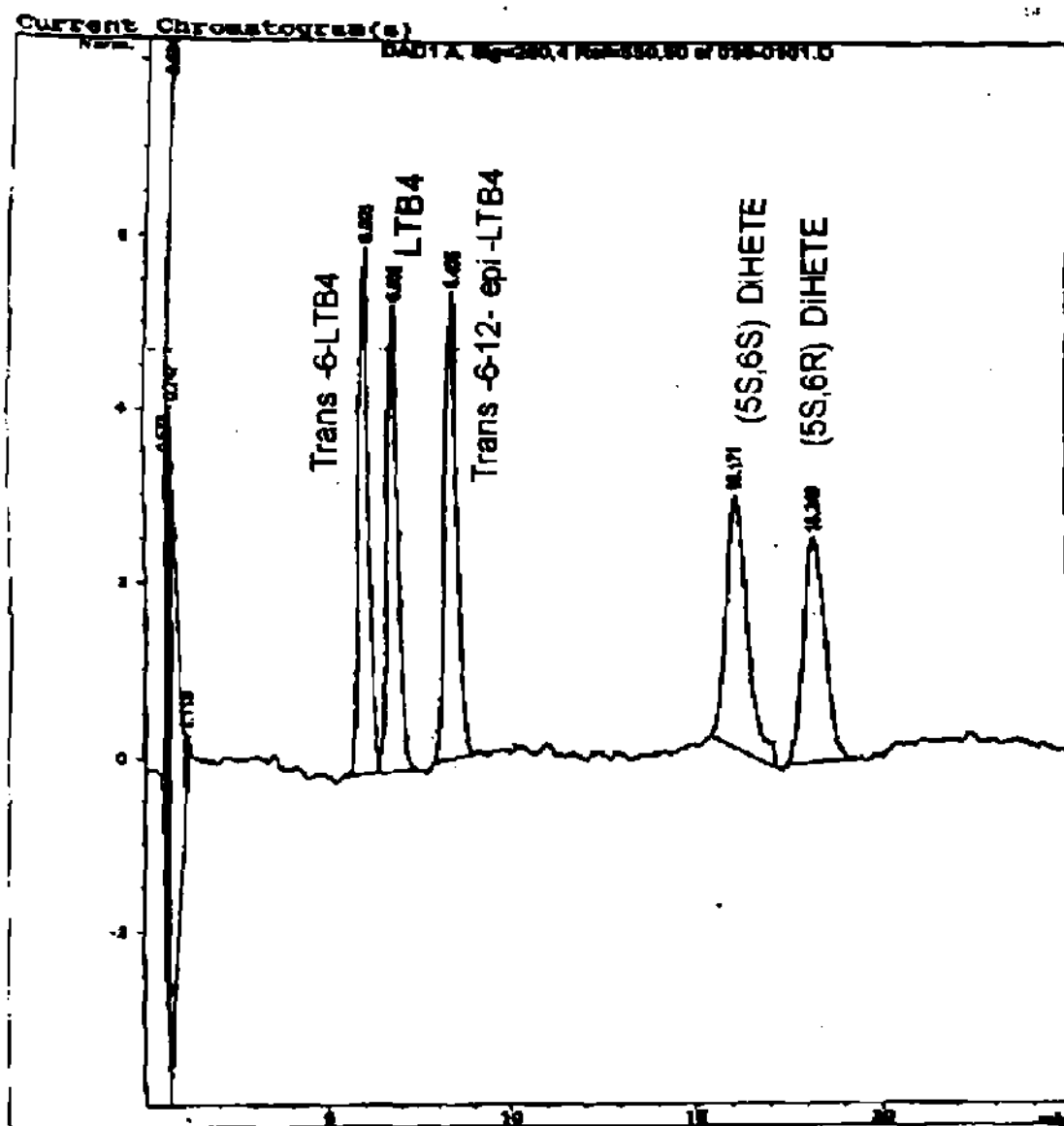


Figura 20. Cromatograma de LTB4 y sus metabolitos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: trans-6-LTB4, LTB4, trans-6-12-epi-LTB4, (5S,6S)DIHETE y el (5S,6R)DIHETE. Las condiciones de elución son descritas en el texto.

La mezcla del LTB4 y sus metabolitos se utilizó inicialmente para establecer los parámetros ideales para la detección del LTB4. Después se empleó el estándar individual de LTB4 para la optimización de los parámetros cromatográficos.

En la tabla XI se presentan los resultados de los parámetros cromatográficos de separación optimizados. Los valores de los coeficientes de separación ( $\alpha$ ) y de resolución más bajos se observaron para el LTE4.

**Tabla XI. Parámetros cromatográficos de separación**

Leucotrieno	tr	k'	$\alpha$	R
LTC4	5.27	5.58	1.20	2.17
LTB4	6.03	6.53	1.17	2.27
LTE4	7.14	7.90	1.15	1.88
LTD4	8.08	9.10	-----	-----



Se determinaron las curvas de calibración y los límites de detección para cada uno de los metabolitos analizados. Esto se ejemplifica con el LTE4 como se muestra en la Figura 21.

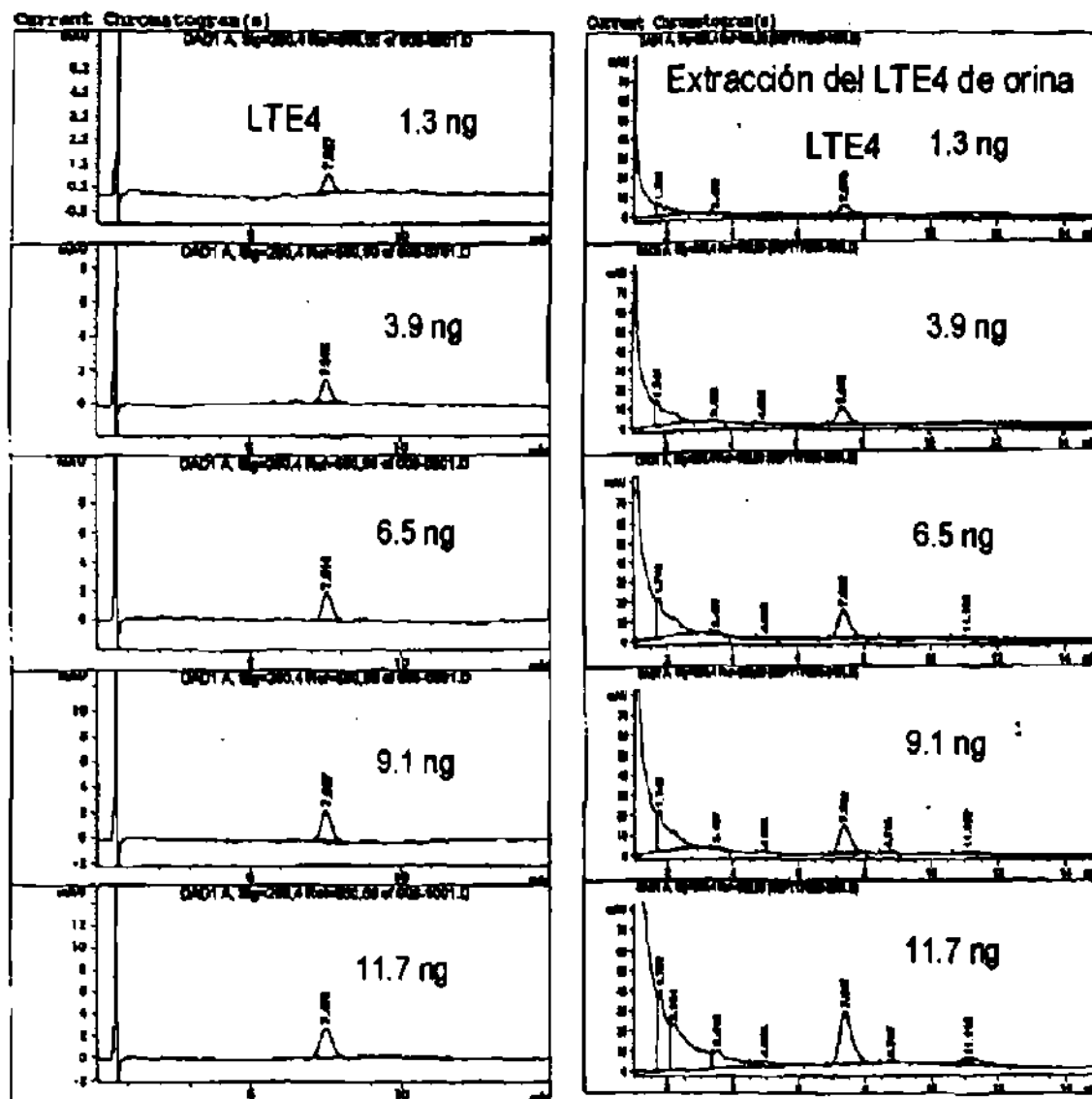


Figura 21. Cromatogramas obtenidos para la curva de calibración del LTE4 separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. Las condiciones de elución son descritas en el texto.

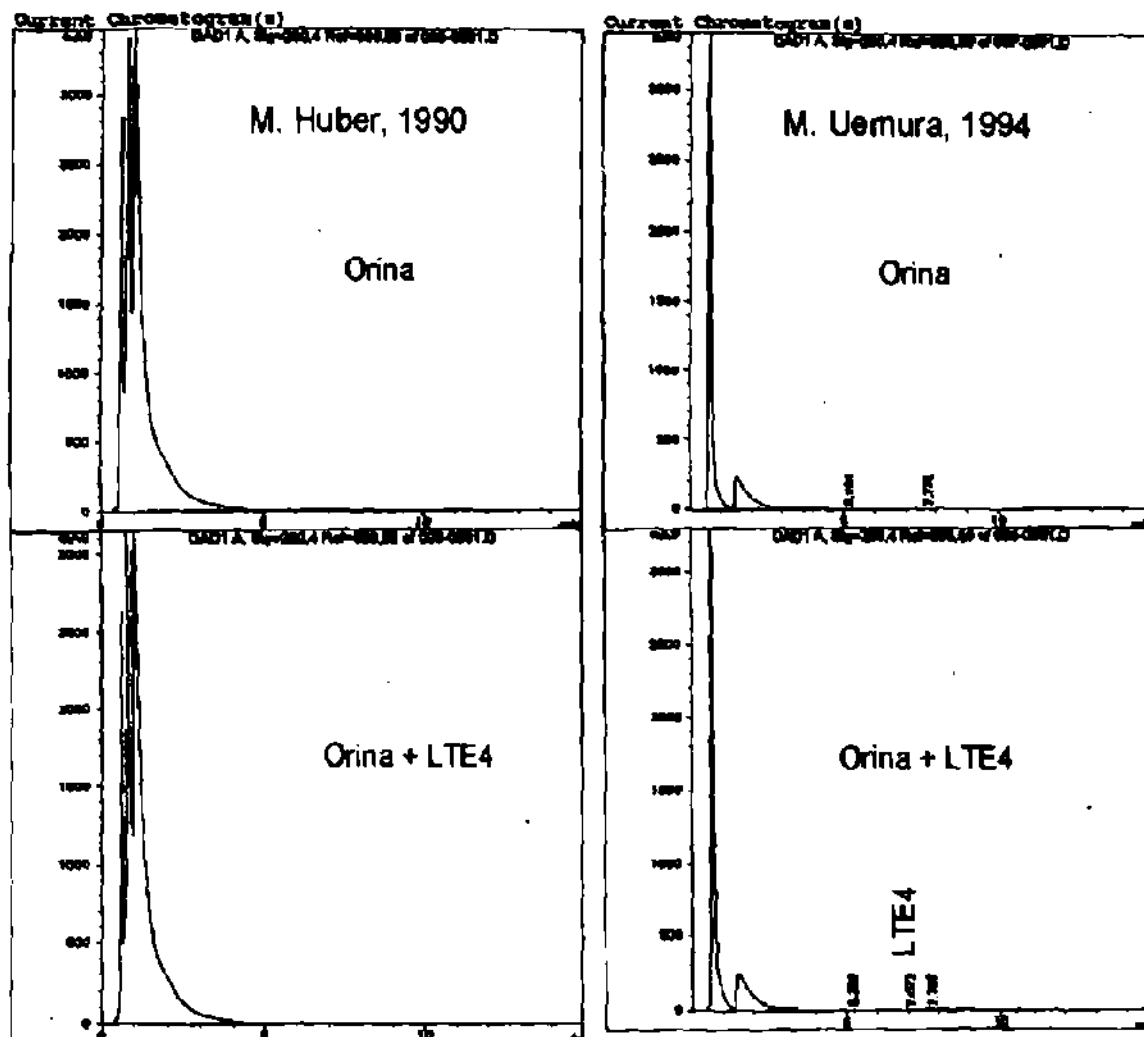
### 3.5.2 Evaluación de los sistemas de extracción

De los métodos analizados (Fig. 4), se obtuvo que el método 2 (Página 47) fue el que permitió estudiar este tipo de compuestos. Como se observa en la Fig. 22, solo se detectó la presencia de LTE4 después de la extracción por el método 2 (Fig. 22, parte inferior-derecha) lo mismo se presentó para el resto de los leucotrienos analizados.

En la tabla XII se presentan los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos después de la extracción en fase sólida; la estimación se realizó por áreas.

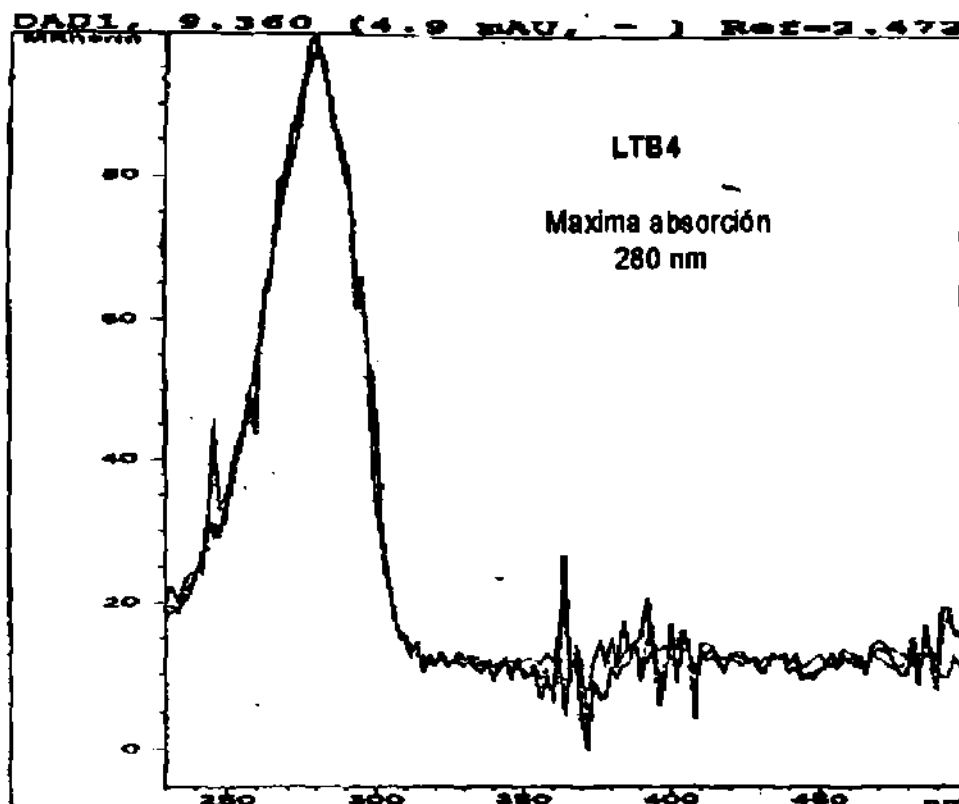
**Tabla XII. Porcentajes de recuperación de la extracción en fase sólida empleando cartuchos SepPack C-18. Estimación en base áreas.**

<b>Leucotrieno</b>	<b>% de Recuperación</b>
<b>LTB4</b>	<b>71</b>
<b>LTC4</b>	<b>80</b>
<b>LTD4</b>	<b>93</b>
<b>LTE4</b>	<b>94</b>



**Figura 22. Cromatogramas obtenidos despues del proceso de extracción en fase sólida de una muestra de orina adicionada con LTE4 y separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. Las condiciones de elución son descritas en el texto.**

Después de evaluar las diferentes condiciones del proceso de extracción se obtuvo un porcentaje de recuperación oscilante entre un 71 a 94% para cada uno de los metabolitos analizados los cuales se muestran en la Tabla XII.



**Figura 23. Espectro de absorción del LTB4 y superposición del espectro del LTB4 del paciente No. 8 con AHA.**

Se empleó la superposición de espectros para identificar cada uno de los leucotrienos como se muestra en la figura 23.

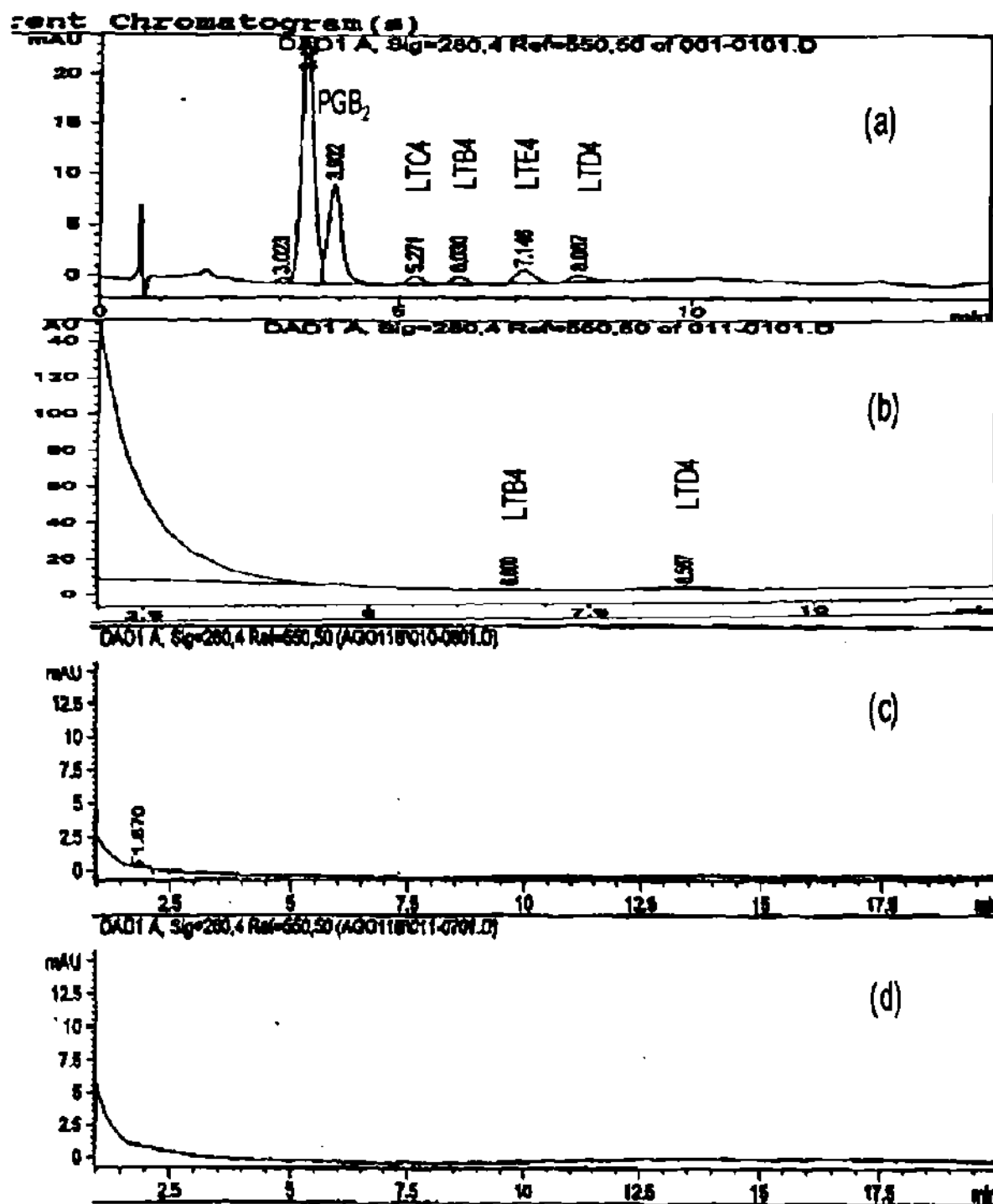


Figura 24. Cromatogramas obtenidos después del proceso de extracción en fase sólida y separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. a) Mezcla de estándares de leucotrienos, b) Paciente con Absceso hepático amibiano en fase aguda, c) paciente con absceso hepático amibiano en fase de recuperación y d) Sujeto del grupo control. Las condiciones de elución son descritas en el texto.

### 3.5.3 Sensibilidad

Este parámetro se analizó en función del límite de detección y el de cuantificación. Los cálculos fueron descritos en el capítulo 2 y los resultados se presentan en la tabla XIII.

**Tabla XIII. Límites de detección y cuantificación obtenidos para el análisis de los leucotrienos por el método desarrollado.**

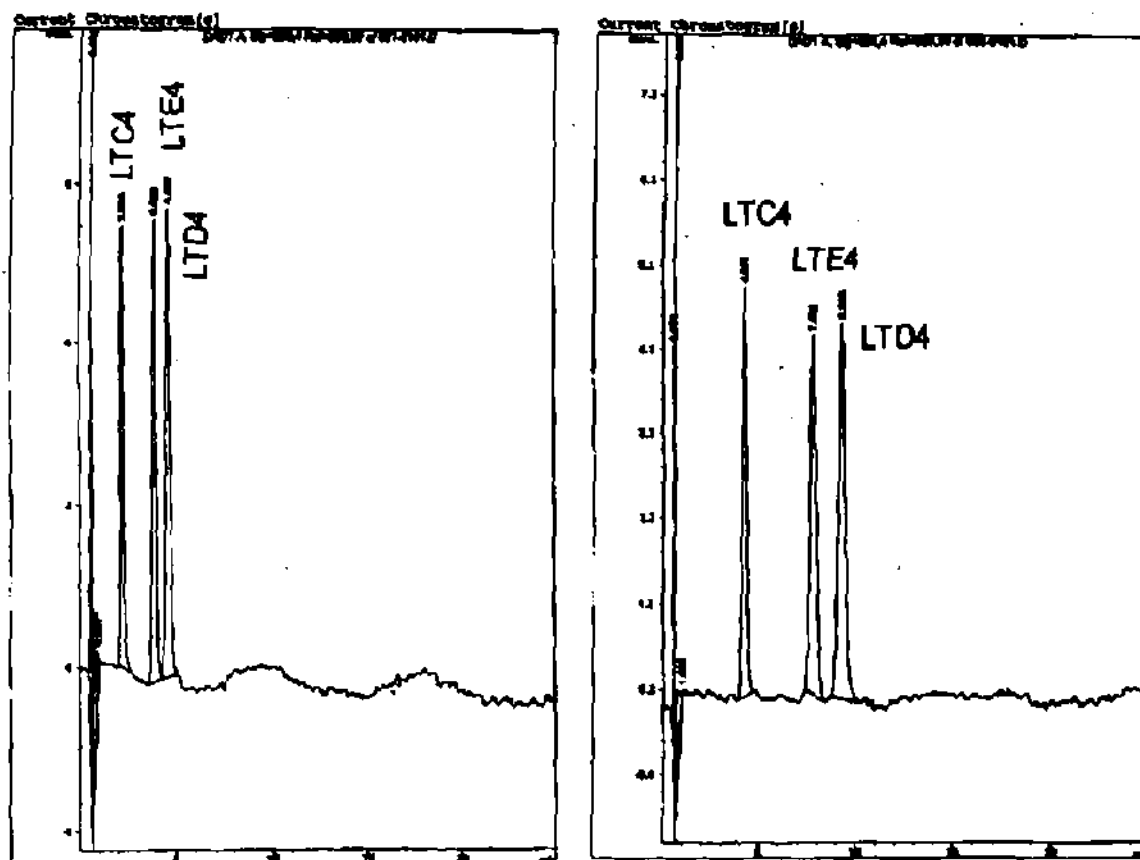
Leucotrieno	Límite de detección ng/mL	Límite de cuantificación ng/mL
LTB4	0.810	2.450
LTC4	0.178	0.539
LTD4	0.470	0.790
LTE4	1.890	5.740

En los experimentos que proporcionaron estos datos fueron utilizados 3 puntos arbitrarios incluyendo el límite inferior calculado para la curva de calibración (n=3) para cada punto.

### 3.5.4 Robustez

Los resultados de cada uno de los experimentos realizados se presentan en la tabla XV e incluyen los parámetros que se consideraron fundamentales para el desarrollo e implementación del método.

Los cambios en pH y composición de la fase móvil influyen fuertemente en la separación de este tipo de compuestos. Como se observa en las figuras 20 al hacer pequeñas variaciones de la concentración de metanol o disminuir el pH se mejoraba la resolución de los compuestos pero aumentaba el tiempo de retención de los mismos.



a) metanol:agua:ácido acético (70:30:0.01)    b) metanol:agua:ácido acético (65:35:0.01)

Figura 25. Cromatograma de los cistenil-leucotrienos separados por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El orden de elución fue: LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>. Las condiciones de elución son descritas en el texto. Efecto de la proporción del modificador (metanol) a un pH 5.4

**Tabla XIV. Resultados de los ensayos realizados para valorar la robuztes del método.**

<b>Factor</b>	<b>Modificación</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Efecto en la resolución</b>
Composición de la fase móvil	Disminución de % metanol	Aumento en los TR de los compuestos	No se afecta
pH	Se probaron los pHs de 5.0, 5.4 y 5.6	Cambio en TR	No se afecta
Flujo	Se probaron 0.2 y 0.6 mL/min	Aumento y disminución de TR respectivamente	Ninguno
Matriz	Se adicionó la mezcla de estándares a orina de diferentes individuos.	No se observaron interferencias en ningún caso	Ninguno

### **3.5.5 Determinación de los LTS en los pacientes con AHA, GPR y GC**

Después de seguir la estrategia general planteada en la metodología en solo 42 pacientes en la fase aguda se detectaron patrones cromatográficos diferentes encontrándose picos con tiempos de retención iguales a los estándares de leucotrienos analizados y corroborándose posteriormente con la comparación de espectros. De los LT estudiados en la fase aguda del AHA en 30/49 se detectaron LT<sub>B4</sub>, en 15/49 el LTC<sub>4</sub>, en 10/49 el LTD<sub>4</sub> y solo en 3/49 el LTE<sub>4</sub> como se muestra en la Tabla XVI.



**Tabla XV. Determinación de leucotrienos en pacientes con AHA, GPR y GC.**

LT	AHA n=49	GPR n=40	GC n=30
LTB4 <sup>*,**,***</sup>	30	6	ND
LTC4 <sup>*,**</sup>	15	2	ND
LTD4 <sup>*,**</sup>	10	ND	ND
LTE4	3	ND	ND

ND = No detectado

(\*) = AHA vs GPR  $p < 0.05$

(\*\*) = AHA vs GC  $p < 0.05$

(\*\*\*) = GPR vs GC  $p < 0.05$

Al analizar el número de leucotrienos que se presentaban en cada paciente durante la fase aguda del AHA se determinó que 7 pacientes no presentaron señales en el cromatograma que indicara la presencia de leucotrienos, 30 pacientes presentaron 1 leucotrieno, 6 pacientes presentaron 2 leucotrienos, 6 pacientes presentaron 3 leucotrienos y ningún paciente presentó señales de los 4 leucotrienos al mismo tiempo.

### 3.6 Correlación de los niveles de citocinas con las PFA

Al correlacionar los niveles de las citocinas con los niveles de las proteínas de fase aguda determinadas en los tres grupos de estudio sólo se encontró una correlación significativa estadísticamente entre los niveles de IL-6 en AHA vs PCR en AHA (0.56,  $p < 0.05$ )

### **3.1 Correlación de los niveles de citocinas con los leucotrienos**

No se encontró correlación entre los niveles de las citocinas con la presencia de los leucotrienos en los pacientes con AHA durante la fase aguda y en la fase de post-recuperación.

## CAPITULO IV

### DISCUSION

La amibiasis es una parasitosis cosmopolita en su distribución, causada por el protozoario enterico, *Entamoeba histolytica*. Las frecuencias mas altas se presentan en el Africa, el Sur de América, en México y en la India. En México se ha estimado que entre un 10 al 20 % de la población son portadores del parásito. Esta prevalencia se ve incrementada con la edad y en las zonas rurales. Los mecanismos de respuesta inmunitaria en contra de *E. histolytica* en el humano, no han sido establecidos. Los estudios epidemiológicos indican que el humano no adquiere inmunidad a partir de la colonización intestinal por *E. histolytica* <sup>(6-8,117)</sup>. Las proteínas amibianas inducen a los linfocitos de los pacientes a secretar linfocinas que actúan en los macrófagos y propician la muerte de trofozoitos virulentos de amibas<sup>(53,55)</sup>. En el AHA, la complicación extraintestinal más importante de la amibiasis, existe una respuesta inflamatoria y de fase aguda representada por diversas proteínas sintetizadas en el hígado <sup>(53-59,71-74)</sup>.

Actualmente se han identificado la IL-1, la IL-6 y el FNT, como las citocinas reguladoras de esta respuesta<sup>(26-27,29)</sup>. Una de las funciones que desempeñan estas citocinas en el proceso inflamatorio, es la estimulación del hepatocito para la síntesis de las proteínas de fase aguda<sup>(26-28)</sup>. Esta estimulación parece ser regulada por el sistema nervioso central. Las proteínas de fase aguda funcionan como mediadores en los procesos inflamatorios y

fagocíticos, como inhibidores del sistema mediador y de las enzimas liberadas por el daño tisular o del macrófago, como moduladores de la respuesta inmune y en la formación de tejido conectivo elástico y también como transportadores de metabolitos<sup>(78)</sup>.

Para establecer la presencia de la respuesta inflamatoria y de fase aguda en los pacientes con AHA se decidió evaluar 5 proteínas de fase aguda (HPT, TRF, CER, C3 y PCR)

Se consideraron los criterios de selección de un marcador confiable para la respuesta de fase aguda. Una elevación rápida y considerable después del estímulo inflamatorio, vida media corta que permitiera una rápida disminución después de eliminado el estímulo y la implementación de un método en el laboratorio diagnóstico<sup>(78)</sup>.

Se han referido varios métodos inmunoquímicos para la cuantificación de estas proteínas<sup>(64-65,79)</sup>. Se requiere determinar su concentración exacta, en base a dos mediciones independientes. La cuantificación de la concentración al medir simultáneamente la máxima velocidad de reacción ( $V_{max}$ ) y el tiempo ( $t_{V_{max}}$ ) que es requerido para  $V_{max}$ , permiten trazar una curva de calibración tridimensional. Así los valores obtenidos al cuantificar una proteína, presentan un alto grado de exactitud y precisión<sup>(79)</sup>.

Al comparar la variable DO en el tiempo a diferentes concentraciones de antígeno y con una cantidad constante de anticuerpo, se calcularon diferentes velocidades de reacción (DO/min). Para un tiempo determinado, existe una velocidad máxima de reacción. Al relacionar  $V_{max}$  contra la concentración, se elaboró la curva de Heidelberger- Kendall. En esta curva cada punto

corresponde a un tiempo de  $V_{max}$ , de ésta forma, es posible diferenciar claramente los valores en ambos lados de la curva y obtener sistemas de cuantificación para proteínas en rangos amplios de medición<sup>(79)</sup>.

La determinación de proteínas séricas de importancia clínica es evaluada por sistemas cinéticos de turbidimetría con programas estandarizados y control de calidad que permite una determinación confiable y rápida por lo que fue seleccionado como método de referencia para la determinación de las 5 proteínas de fase aguda en los pacientes con AHA estudiados.

El amilode A sérico (AAS) y la PCR cumplen satisfactoriamente los criterios de respuesta rápida, con una elevación considerable en el plasma<sup>(24)</sup>. La PCR es el parámetro más adecuado en el laboratorio, en los casos de inflamación<sup>(67-69)</sup>, para valorar la respuesta de fase aguda, debido a que las determinaciones diagnósticas para el AAS no están disponibles. Por otro lado, aunque la CER es menos sensible y tiene mayor vida media que la PCR, en algunos casos proporciona información adicional<sup>(78)</sup>. Por esta razón se realizó la determinación de esta proteína, en el presente trabajo.

En los pacientes con AHA tanto la CER como la PCR fueron las más elevadas de las 5 proteínas estudiadas, confirmando su utilidad como marcadores de respuesta inflamatoria de fase aguda. Aunque algunas proteínas son inadecuadas para medir la respuesta de fase aguda pues se consumen durante la inflamación, como lo son la haptoglobina, la transferrina y la fracción C3 del complemento, la valoración de estas, proporcionó información diagnóstica en los casos en que hay evidencia de consumos selectivos de proteínas por algún proceso patogénico de la enfermedad<sup>(78)</sup>. Lo anterior se

presentó en los pacientes con AHA durante la fase aguda, los cuales presentaban valores disminuidos de estas proteínas.

Algunos síntomas de ciertas enfermedades inflamatorias pueden confundirse con alteraciones funcionales, en las cuales no existe proceso inflamatorio alguno. La valoración de las proteínas de fase aguda es relevante para diferenciar y establecer el patrón característico en procesos inflamatorios. La determinación de las proteínas de fase aguda en el AHA permite diferenciarlo de otras enfermedades en las que se afecta el hígado como en el carcinoma hepatocelular<sup>(74)</sup>.

El marcador utilizado en enfermedades inflamatorias de intestino ha sido la  $\alpha$ -glicoproteína ácida. Los estudios recientes han demostrado que la PCR es un parámetro mucho más sensible y preciso, además, su elevación correlaciona con la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento<sup>(78)</sup>. En los pacientes con AHA tratados y durante la fase de post-recuperación, este parámetro disminuyó considerablemente.

Las citocinas y los leucotrienos se han propuesto como mediadores que regulan la respuesta inflamatoria y de fase aguda<sup>(2-4,21-28,38-39,80-83)</sup>. Las células mononucleares fueron las primeras en mostrar la liberación de citocinas<sup>(33)</sup>. Estas modulan la síntesis de proteínas de fase aguda por el hepatocito<sup>(29)</sup>. La estimulación con lipopolisacáridos bacterianos de células mononucleares y de macrófagos produce la síntesis y secreción IL-1, FNT $\alpha$  e IL-6 descritas como reguladores principales de la respuesta de fase aguda<sup>(21-28)</sup>. El FNT $\alpha$  e IL-1 $\beta$  actúan sobre hepatocitos de ratón<sup>(24)</sup>, sin embargo sus efectos se hallan

restringidos a un espectro limitado de proteínas de fase aguda. La IL-6, identificada como factor estimulante del hepatocito parece ser el mayor inductor de la síntesis de proteínas de fase aguda por el hepatocito<sup>(26-27,29)</sup>.

El hígado es el principal órgano de síntesis de proteínas de fase aguda<sup>(26)</sup>, por lo cual se propuso el estudio de las concentraciones de las 5 proteínas de fase aguda mencionadas anteriormente así como de la citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  en pacientes con AHA. Se planteó la existencia de una correlación entre la síntesis de estas citocinas con la producción de las proteínas de fase aguda en una entidad clínica como el AHA, en el cual hay daño tisular hepático. El daño a las células del parénquima hepático, puede resultar en una disminución en la síntesis de proteínas séricas y un cambio en el metabolismo proteico<sup>(26)</sup>. En los pacientes estudiados se encontró una alteración de las 5 PFA durante la fase aguda. En estos pacientes la TRF y la fracción C3 se encontraron disminuidas (Tabla V y VI). La HPT, la CER y la PCR se hallaban aumentadas (Tabla V y VI). Estos cambios, son característicos de enfermedad hepática. El incremento de los niveles séricos de C3 y PCR en los pacientes con AHA ha sido descrito<sup>(57,74)</sup>. En los pacientes con AHA estudiados se observó una disminución de la fracción C3 del complemento con diferencia estadísticamente significativa con respecto al GPR y GC. Los niveles de PCR se encontraron con elevación estadísticamente significativa en los pacientes con AHA con relación a los pacientes del GPR y del GC (Tabla VII).

Los pacientes del presente estudio presentaban una respuesta de fase aguda. La síntesis de PFA es regulada por las citocinas, al igual que la

respuesta inmune específica causada por parásitos protozoarios<sup>(27,54)</sup>. Inicialmente se obtuvieron valores falsamente negativos de FNT $\alpha$ , en este grupo de pacientes con el ELISA de baja sensibilidad. Al incrementar la sensibilidad en las determinaciones del FNT $\alpha$  así como de la IL-1 $\beta$  permitieron la cuantificación de estas dos citocinas a nivel sistémico. Se ha descrito que estas dos citocinas tienen efectos antiproliferativos en las células hepáticas<sup>(118)</sup>; esto sugiere la acción de un mecanismo regulatorio que, de manera paradójica, se halla presente en pacientes con AHA. En estos pacientes, durante la etapa aguda del proceso inflamatorio ocurre una destrucción tisular importante e inflamación. En contraste, en el presente estudio, los niveles elevados de IL-6, confirmaron las observaciones previas de Medina y cols. y de González Amaro y cols. Recientemente se ha descrito el efecto proliferativo de esta citocina sobre las células hepáticas<sup>(52,118-119)</sup>. Se ha demostrado que la rhIL-6 regula la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos humanos. Al comparar la acción de esta citocina con IL-1 $\beta$  y FNT $\alpha$  en el hepatocito, sólo la IL-6 induce esencialmente el mismo espectro de respuesta en las proteínas de fase aguda observado en los humanos durante un estado inflamatorio<sup>(27,29)</sup>. Lo anterior podría explicar la respuesta alterada de proteínas de fase aguda estudiadas en los pacientes con AHA. La IL-6 fue la citocina que se encontró con mayor elevación entre las citocinas estudiadas en los pacientes durante la etapa aguda del AHA. Con estos resultados, es posible sugerir que la IL-6 juega un papel clave en la síntesis alterada de las proteínas de fase aguda estudiadas en



este grupo de pacientes. También es posible que intervenga durante la regeneración hepática que se observa al desaparecer el agente etiológico.

El mecanismo por el cual la IL-6 actúa sobre las células hepáticas es desconocido. Se ha obtenido evidencia de la existencia de una gran cantidad de receptores para IL-6 en las células hepáticas de la rata (1,500 receptores de IL-6/ célula) por lo que posiblemente en los hepatocitos de humanos la IL-6 actúe por medio de un receptor específico en la superficie de la célula hepática<sup>(28)</sup>.

Se han empleado una gran variedad de técnicas analíticas para la determinación de los metabolitos de ácido araquidónico vía lipooxigenasa conocidos como leucotrienos<sup>(100-112)</sup>. El método de la CLAR-FR se ha empleado para la separación y cuantificación de los diferentes leucotrienos<sup>(104-112)</sup>. Es necesaria la extracción de estos compuestos del medio acuoso previo al análisis cromatográfico<sup>(104-112)</sup>. En este estudio se empleó la técnica de CLAR-FR para la separación de los leucotrienos. Se obtuvieron resultados excelentes al acoplar esta técnica con la extracción en fase sólida. Los procedimientos de extracción reportados, involucran un proceso de extracción con solventes o adsorción a resinas unidas a Amberlite XAD-7 o XAD-8<sup>(109-112)</sup>. Usualmente el éter dietílico es utilizado para el LTB<sub>4</sub> y para otros metabolitos menos polares del ácido araquidónico y el Amberlite XAD-8 o XAD-7 son usados para los sulfopeptido-LT<sup>(109-112)</sup>. En este trabajo se emplearon los cartuchos Sep-Pak C18 para el proceso de extracción y las muestras se procesaron por los dos métodos descritos (Método 1 y Método 2). Estos procedimientos han sido

reportados para la extracción de estos compuestos,. Los resultados fueron mas satisfactorios con el método descrito por Uemura y cols <sup>(90)</sup>.

La eficiencia de las columnas de extracción de octadecil en fase reversa para LT y otros metabolitos del ácido araquidónico han sido mencionada en pocos estudios. Metz y cols. , reportaron con el uso de la columna Sep-Pak C18 en fase reversa los porcentajes de recuperación para LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y la prostaglandina B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) fueron de 57±20, 39±18, 44±8 y 87±15% respectivamente y con el uso de las columnas Sep-Pak de sílica los porcentajes de recuperación para los mismos compuestos fueron 76±8, 93±12, 86±8 y 82±7 respectivamente<sup>(112)</sup>. Estos resultados dependían de la constitución del buffer en el cual la muestra era extraída y aplicada a la columna. Luderer y cols., reportaron porcentajes de recuperación para el LTB<sub>4</sub>, ácido 5-hidroxiicosatetraenoico (5-HETE), 12-HETE y la PGB<sub>2</sub> de 98±2, 77±10, 88±9 y 87±25 respectivamente empleando las columnas de extracción de octadecil en fase reversa<sup>(109)</sup>. Los porcentajes de recuperación (80-96%) que se obtuvieron en el presente estudio, fueron aceptables ya que este tipo de compuestos se determinan a bajas concentraciones. La matriz de orina puede haber tenido cierta implicación en la menor recuperación de los compuestos estudiados (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>).

Los cartuchos Sep-Pak pueden realizar la extracción de muchos compuestos polares, de fosfolipidos y de prostaglandinas que coeluyen con los leucotrienos. Sin embargo en la CLAR-FR, sólo se observan los picos de los leucotrienos debido a que otros compuestos que pudieran estar presentes, tienen un coeficiente de extinción molar bajo a 280 nm.

Los efectos del pH y la composición de la fase móvil fueron los factores que más influyeron en la separación de los LT. La adición del ácido acético a la fase móvil favoreció el porcentaje de recuperación y mayor resolución de las mezclas de estándares de peptido-LTS durante la extracción y separación de los mismos. El ácido actúa aquí como un reactivo par iónico al asociarse con los grupos amino libres del LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> incrementando la afinidad de los LTs al soporte de fase reversa.

La cuantificación de LTs en pacientes con AHA no había sido realizada con anterioridad. El papel de estos mediadores de la respuesta inflamatoria en pacientes con colestasis y con insuficiencia hepatocelular han sugerido una participación importante de los peptido-LTs *in vivo* en la patogénesis de estas entidades clínicas<sup>(84,88)</sup>. Se ha descrito un intenso infiltrado de neutrófilos durante la formación del AHA por lo que se sugiere la participación de los LTs. Se ha descrito previamente la elevación de la fracción C3 del complemento e inhibición de la quimiotaxis de polimorfonucleares en pacientes con AHA, lo cual podría estar también relacionado con la acción de los LTs como mediadores.

Ciertos factores del huésped y del parásito, juegan un papel en la patogénesis de la formación del AHA y en la evasión de la respuesta inmune. Hasta ahora la participación de moléculas amibianas en la inmunomodulación es desconocida.

Recientemente se ha demostrado que los trofozoitos vivos de *E. histolytica*, así como proteínas microsomales de las amibas producen eicosanoides como la PGE<sub>2</sub><sup>(96-97)</sup>. Las moléculas parasitarias que estimulan la

producción de eicosanoides no han sido aisladas o identificadas. Los niveles altos de prostaglandinas que se producen por las células inflamatorias del huésped al ser estimuladas por moléculas del parásito, pueden actuar localmente reclutando macrófagos al sitio de inflamación<sup>(96-97)</sup>. Los leucotrienos son considerados como moléculas proinflamatorias, debido a su efecto quimiotáctico sobre leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos llegan al sitio de inflamación desencadenando una cascada de eventos ligados que contribuyen al estado inmunopatológico observado en muchas enfermedades parasitarias.

En este estudio la presencia de LTB<sub>4</sub> en 30 de 49 pacientes con AHA en fase aguda indica que este metabolito con acciones principalmente de quimiotaxis, podría estar involucrado en los eventos quimiotácticos observados en los pacientes con AHA. La diferencia en el patrón cromatográfico de los pacientes sugiere la participación de los péptido-LTs (LTC<sub>4</sub> 15/49, LTD<sub>4</sub> 10/49 y LTE<sub>4</sub> 3/49) en la patogénesis del AHA. La ausencia en los pacientes en recuperación total, indica la desaparición del proceso inflamatorio regulado por este tipo de mediadores. En el grupo control no se detectó ninguno de estos compuestos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio y en otras infecciones parasitarias y patologías en las que se implica la función hepática indican que los mediadores estudiados, pueden ser responsables de eventos como el infiltrado inflamatorio y la quimiotaxis alterada.

El presente estudio demostró que los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , FNT $\alpha$  e IL-6 están elevados en los pacientes con AHA

en fase aguda con diferencia estadísticamente significativa y que estos cambios son independientes de los niveles de leucotrienos en la misma fase. No hubo correlación entre ambos parámetros, lo cual sugiere que estos dos mecanismos de la respuesta inflamatoria se encuentran posiblemente involucrados en los eventos descritos durante el AHA. La regulación de la producción de leucotrienos por algunas citocinas como el FNT y la IL-1 se ha involucrado recientemente en este proceso<sup>(120-122)</sup>. Falta aún por establecer cuales son los mecanismos por los que se realiza tal regulación.

Los fenómenos inflamatorios son modificados en mayor o menor grado con medicamentos. Estos suprimen el dolor y la incapacidad funcional que suelen acompañar a la inflamación. La inflamación y la respuesta de fase aguda son una respuesta defensiva y benéfica en sentido teológico. Por tanto, es necesario que el esfuerzo final sea orientado a conocer la causa y a modular su acción y no sólo a suprimirla como actualmente se realiza con el uso de medicamentos anti-inflamatorios. Por lo que el conocimiento de los mediadores de respuesta inflamatoria (citocinas y leucotrienos) en esta enfermedad parasitaria permitirá a futuro establecer nuevas perspectivas terapéuticas empleando este tipo de mediadores.

El presente estudio permitió establecer la participación de los leucotrienos y de las citocinas en el AHA a nivel sistémico. A corto plazo las técnicas específicas de la Biología Molecular permitirán conocer la participación de estos metabolitos a nivel local en las células implicadas durante el proceso inflamatorio descrito en el AHA.

En los pacientes estudiados la mayoría pertenecían a un estrato socioeconómico bajo (99%) y con una edad promedio de  $36 \pm 11$  años por lo que se sugiere que las condiciones sanitarias propiciaron la instalación de esta enfermedad en estos pacientes. Esta enfermedad continúa siendo un problema de Salud Pública de los países en desarrollo como el nuestro por lo que la investigación de los mecanismos fisiopatológicos participantes en esta enfermedad parasitaria permitirá a futuro el control y la erradicación de la misma.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES**

Las proteínas y las citocinas estudiadas durante la fase aguda del AHA se encontraron alteradas. Hubó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo con AHA en fase aguda con el grupo post-recuperación y el grupo control.

Se cuantificaron las concentraciones bajas de el FNT $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los pacientes al emplear la metodología de alta sensibilidad. Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comprar estas citocinas en el AHA con el GPR y GC.

La IL-6 parece ser el mediador principal de la RFA que se observó. La estimulación positiva de las PFA: la PCR, la CER y la HPT y a la vez una inhibición de la TFR y la fracción C3 del complemento en los pacientes con AHA, puede ser consecuencia directa de tal estimulación iniciada por la IL-6.

Se estandarizó un método de CLAR-FR para el análisis de leucotrienos en muestras de orina. Los resultados fueron reproducibles y altamente sensibles.

La elevación del leucotrieno quimiotáctico LTB<sub>4</sub> en 30 de los 49 pacientes con AHA en el presente estudio, sugiere que éste pudiera participar como agente quimiotáctico en la diapédesis descrita en el AHA.

En el 85% de los pacientes (42/49) se detectó al menos un leucotrieno elevado durante la fase aguda del AHA. Este hallazgo sugiere la participación de otros LTs durante el proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio se resolvió en el grupo post-recuperación. Estos pacientes no presentaron patrones cromatográficos de los LTs, lo cual sugiere desaparición de este proceso inflamatorio.

Los LTs y las citocinas participan como mecanismos independientes en la regulación de la respuesta inflamatoria del AHA.



## **CAPITULO VI**

### **PERSPECTIVAS**

No se han estudiado las células responsables de la elevación de citocinas, encontradas en el suero de pacientes con AHA. La expresión de las interleucinas IL-6, IL1 $\alpha$  y FNT $\beta$  por células de sangre periférica extraída de pacientes con AHA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) podrá determinar si ésta producción es a nivel sistémico o a nivel local en el sitio del proceso inflamatorio.

Los niveles de leucotrienos, citocinas y proteínas de fase aguda pueden ser investigados en otras entidades patológicas en las cuales la regeneración hepática es menor y así definir su participación en la respuesta del paciente.

La determinación de leucotrienos para el monitoreo de la evolución del proceso inflamatorio o anafiláctico permitirá dirigir nuevos tratamientos como el empleo de antagonistas de los mismos que disminuyan los efectos provocados por estos metabolitos o por los medicamentos actualmente en uso para el AHA.

**BIBLIOGRAFIA**

1. **Reyes, P.** Inflamacion. Ciba-Geigy Mexicana, S.A. de C.V. (1982).
2. **Castell, J.V., Gómez-Lechón, M., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T. and Heinrich, P.C.** Recombinant human interleukin 6 regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.*,232(2):347-350 (1988).
3. **Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Tii, T., Decker, K. and Heinrich, C.** *Eur. J. Biochem.* 173:287-293(1988).
4. **Movat, H.** Tumor necrosis factor and interleukin 1; role in acute inflammation and microvascular injury. *J. Lab. Clin. Med.* 110(6):668-681. (1987).
5. **Mortensen, R., Shapiro, J., Lin, B., Douches, S. and Neta, R.** Interaction of recombinant IL-1 and recombinant tumor necrosis factor in the induction of mouse acute phase proteins. *J Immunol.*, 140(7):2260-2266. (1988).
6. **García, N., Escandon, C., Escobedo, J., Hernández, J. and Fierro, H.** Amebiasis in the epidemiologic transition its morbidity and mortality trends in the mexican institute of social security. *Arch. Med. Res.* 25(4):393-399. (1994).
7. **Palacio, A., Sandoval, R., Fonte, L and Valdez, A.** Epidemiological study of amebiasis in Chihuahua, México. *Arch. Med. Res.* 28:S309-S310. (1997).
8. **Asorey, A., Alguacil, A., Guerra J. y Vilalta, E.** Amebiasis invasiva(II):

- formas extraintestinales y complicaciones. Diagnóstico parasitológico y serológico. Tratamiento. *Rev. Clin. Esp.* 176(6):271-280. (1985).
9. Thompson, J., Forlenza, S. and Verma, R. Amebic Liver Abscess: A therapeutic approach. *Review. Infect. Dis.* 7(2):171-179. (1985).
  10. Tsutsumi, V., Mena, R., Anaya, F. and Martínez, A. Cellular base of experimental amebic liver abscess formation. *Amer. J. Pathol.* 117:81-91. (1984).
  11. Kretschmer, R. Amibiasis Características de su comportamiento inmunológico. *Rev. Gastroenterol. Méx.* 54(3) : 157-162.(1989).
  12. Ravdin, J. Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 20:1453-1466. (1995).
  13. Olsson I. The cytokine network. *J. Inter. Med.* 233:103-105. (1993).
  14. Ramsey, K., Schneider, H., Cross, A., Boslego, J., Hoover, D., Staley, T., Kuschner, R. and Deal, C. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhoea. *J. Infect. Dis.* 172:186-191. (1995).
  15. Herendra, D., Mendis, L., Sheron, N., Alexander, G., Candy, D., Chart, H. and Rowe, B. Concentrations of interleukin 6 and tumor necrosis factor in serum and stools of children with *Shigella dysenteriae* 1 infection. *Gut.*, 34:194-198. (1993).
  16. Standyk, A. and Gaudie, J. The acute phase protein response during

- parasitic infection. Elsevier Scien. Pub. Ltd, UK, A7-A12. (1991).
17. Fresno, M. Copf, M. and Rivas, L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol. Today*. 18(2):56-58.(1997).
  18. Cox, F. and Liew, E. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitol. Today*. 8(11):371-374. (1992).
  19. Modlin, R. and Nutman, T. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr. Opin. Immunol.* 5:511-517.(1993).
  20. Tilg, H., Wilmer, A., Vogel, W., Herold, M., Nolchen, B., Judmaier, G. and Huber, C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* , 103:264-274. (1992).
  21. Dinarello, C. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N. Engl. J. Med.* 331(22):1413-1418. (1984).
  22. Darlington, G., Wilson, D. and Lachman, L. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* 103:787-793. (1986).
  23. Vaartjes, W., Hass, C. and Houweling, M. Acute effects of interleukin 1 $\alpha$  and 6 on intermediary metabolism in freshly isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 (2): 623-628. (1990).
  24. Ramadori, G., Sipe, J., Dinarello, C., Mizel, S. and Colten, H.

- Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J. Exp. Med.* 162:930-942. (1985).
25. Bankey, P., Mazuski, J., Ortiz, M., Fulco, J. and Cerra, F. Hepatic acute phase protein synthesis is indirectly regulated by tumor necrosis factor. *J. Trauma.* 30(10):1181-1188. (1990).
26. Castell, J., Gómez-Lechón, M., David, M., Fabra, R., Trullenque, R., and Heinrich, P. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology.* 12(5):1179-1186. , (1990).
27. Ramadori, G., VanDamme, J., Rieder, H., and Meyer, K. Interleukin 6, the third mediator of acute reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison  $1\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Europ. J. Immunol.* 18:1259-1264. (1988)
28. Baumann, H., Won, K. and Jahreis, G. Human hepatocyte-stimulating factor-III and interleukin 6 are structurally and immunological distinct but regulate the production of the same acute phase plasma proteins. *J. Biol. Chem.* 264(14):8046-8051. (1989).
29. Castell, J., Gómez-Lechón, M., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R. and Heinrich, P. Interleukin 6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS LETT.*, 242(2):237-239. (1989).

30. Schilling, P., Murray, L. and Markowitz, B. Novel tumor necrosis factor toxic effects. *Cancer*, 69(1):256-260. (1992).
31. Aderka, D. and Levo, Y. Does tumor necrosis factor play a role in the pathogenesis of fulminant hepatitis? *Med. Hypoth.* 27:193-196. (1988).
32. Felver, M., Mezey, E., McGuire, M., Mitchell, M., Herlong, F., Veech, G. and Veech, R. Plasma tumor necrosis factor  $\alpha$  predicts decreased long term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 14(2):255-259. (1990).
33. Kakumu, S., Yoshioka, K., Tsutsumi, Y., Wakita, T. and Arao, M. Production of tumor necrosis factor, interleukin 1 and interferon- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 56:54-65. (1990).
34. Sheron, N., Lau, J., Daniels, H., Goka, J., Eddleston, A., Alexander, G. and Williams, R. Increased production of tumour necrosis factor alpha in chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 12:241-245. (1991).
35. Scuderi, P., Lam, K., Ryan, K., Petersen, E., Sterling, K., Finley, P., Ray, G., Slymen, D. and Salmon, S. Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. *Lancet*, (DEC13)1364-1365. (1986).
36. Muller, C. and Zielinski, C. Impaired lipopolysaccharide-inducible tumor

- necrosis factor production in vitro by peripheral blood monocytes of patients with viral hepatitis. *Hepatology*, 12(5):1118-1124. (1990).
37. Van, J. Interleukin 6: an overview. *Ann. Rev. Immunol.* 8:253-278. (1990)
38. Tilg, H., Dinarello, C. and Mier, J. IL-6 and APPs: antiinflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol. Today.* 18(9):429-432.(1997).
39. Hirano, T. Interleukin 6 and its relation to inflammation and disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62(1):S60-S65. (1992).
40. Guerne, P., Carson, D. and Lotz, M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors and hormones in vitro. *J. Immunol.* 144(2):499-505. (1990).
41. Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C., Logan, G. and Allen, J. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology.*,13(29):267-276. (1991).
42. Deviere, J., Content, J., Denys, C., Vanderbussche, P., Schandene, L., Wybran, J. and Dupont, E. High interleukin 6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. *Clin. Exp. Immunol.* 77:221-225. (1989).
43. Kakumu, S., Shinagawa, T., Ishikawa, T., Yoshioka, K., Wakita, T., Ito, Y., Takayanagi, M. and Ida, N. Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B. *Am. J. Gastroenterol.* 86(12):1804-1808. (1991).

44. Dinarello, C. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77(8): 1627-1652. (1991).
45. Oppenheim, J., Kovacs, E., Matsushima, K. and Durum, S. There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today*, 7(2):45-56. (1986).
46. Larrick, J. Native interleukin 1 inhibitors. *Immunol. Today*, 10(2):61-66. (1989).
47. Peters, M., Vierling, J., Gershwin, E., Milich, D., Chisari, F. and Hoofnagle, J. Immunology and the liver. *Hepatology*, 13(5):977-994. (1991).
48. Kampschmidt, R. The numerous postulated biological manifestations of interleukin-1. *J. Leukocyte Biol.* 36:341-355. (1984).
49. McClain, C., Cohen, D., Dinarello, C., Cannon, J., Shedlofsky, S. and Kaplan, A. Serum interleukin-1 activity in alcoholic hepatitis. *Life Sciences*, 39(16):1479-1485. (1986)
50. Kakumu, S., Tahara, H., Fuji A. and Yoshioka, K. Interleukin 1 $\alpha$  production by peripheral blood monocytes from patients with chronic liver disease and effect of sera on interleukin 1 $\alpha$  production. *J. Clin. Lab. Immunol.* 26:113-119. (1988).
51. Salata, R. Martínez, A., Murray, H., Conales, L., Treviño, N., Segovia, E., Murphy, Ch., and Ravdin, J. Patients treated por amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses efective in vitro against *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 136(7):2633-2639. (1986).



52. Cornell, R. Acute phase responses after acute liver injury by partial hepatectomy in rats as indicators of cytokine release. *Hepatology*, 11:923-931. (1990).
53. Denis, M. and Chadee, K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 57(6):1750-1756. (1989).
54. Titus, R., Sherry, B., Cerami, A. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Elsevier Science Pub. Ltd, UK*, A13-A16. (1991)
55. Seguin, R. and Chadee, K. *Entamoeba histolytica* modulates TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$  and C-fos gene expression in macrophages. *Arch. Med. Res.* 23(2):147-149. (1992).
56. Denis, M., Keller, K. and Chadee, K. Tumor necrosis factor/ cachectin and amebic liver abscess. *Am. J. Med.* 88:84-85. (1990).
57. González-Amaro, R., Andrade, S., Baranda, L., Abud-Mendoza, C., Portales, D., Moncada, B., Llorente, L. Plasma levels and in vitro production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in patients with amebic liver abscess. *Rev. Invest. Clin.* 46:209-213. (1994).
58. Eckmann, L., Reed, S.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically

- released interleukin-1alpha. *J. Clin. Invest.* 96(3):1269-1279. (1995).
59. Medina, C., Cordero, P., Caballero, E., Torres, E. and Muñoz, L. Serum cytokines of acute phase response in the amebic liver abscess. *Arch. Med. Res.* 28:S250-S252. (1997).
60. Dayer, M. Chronic inflammatory joint diseases: natural inhibitors of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha. *J. Rheumatol.* 18:71-75.(1991).
61. Quantikine HS R&D Systems. Catalogo y Guía de referencia. Human TNF- $\alpha$  immunoassay.(1997)
62. Quantikine HS R&D Systems. Catalogo y Guía de referencia. Human IL-1- $\beta$  immunoassay.(1997)
63. Quantikine R&D Systems. Catalogo y Guía de referencia. Human IL-6 immunoassay.(1996)
64. Henry, J. Diagnostico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Ed. Salvat. 8.ª Edición,(1988)
65. Kaplan, L. and Pesce, A. Química Clínica. Ed. Panamericana. 1988.
66. Instructivo de operación para la determinación de transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina y hemopexina humanas por nefelometría. *Behring*, (1996)
67. McGuire, W., D'Alessandro, U., Olaleye, B., Thomson, M., Langerock,

- P., Greenwood, B. and Kwiatkowski, D. C reactive protein and haptoglobin in the evaluation of a community-based malaria control programme. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:10-14. (1996).
68. Instructivo de operación para la determinación de complemento por nefelometría. *Behring*, (1996).
69. Instructivo de operación para la determinación de proteína C reactiva por nefelometría. *Behring*, (1995).
70. Miller, L. and Bale, W. Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globulin by the liver. *J. Exp. Med.* 99:125-132. (1954).
71. Ramachandran, S., Shanmuganathan, S. and Nagarajah, N. Serum Proteins in hepatic amoebiasis. *J. Trop. Med. Hyg.* 76:97-101. (1976).
72. Kamat, G., Johri, B., Pathak, V. And Tikekar P. Role pf liver tests and electrophoretic pattern of serum proteins in giagnosis and prognosis of amoebic liver abscess. *J. Trop. Med. Hyg.* 4: 111-117. (1968).
73. Muñoz, L., Botello, M., Carrillo, O. and Martínez, A. Early detection of complications in amebic liver abscess. *Arch. Med. Res.* 23:251-253. (1992).
74. Migasena, P., Juttijudata, P., Changbumrung, S., Schelp, F. The serum protein pattern in primary hepatoma and amoebic liver abscess. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73(4):355-361. (1979).

75. Muñoz, L. and Salazar, O. Complement activation in patients with amebic liver abscess. *J. Hepatol.* 5:30-36. (1987).
76. Espinosa, L. and Salazar, O. Serum or plasma levels of C3, factor H and C3d in patients with amebic liver abscess. *Arch. Invest. Med.* 17:297-301. (1986).
77. Reed, S., Ember, J., Herdman, D., DiScipio, R., Hugli, T. and Gigli, I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylotoxines C3a and C5a. *J. Immunol.* 155:266-274. (1995).
78. NotiBehring. Proteínas de fase aguda en procesos inflamatorios. 3(4):6-7. (1988).
79. NotiBehring. Cuantificación de proteínas por inmunoprecipitación en sistemas de turbidimetría cinética. 4(2):2-3. (1989).
80. Hammarstrom, S., Orning, L and Bernstrom, K. Metabolism and Excretion of Cysteinyl-leukotrienes. *Adv. Prostaglandin Tromboxane Leukotriene Res.* 16:383-396. (1986).
81. Maltby, N., Taylor, G., Ritter, J., Moore, K., Fuller, R. and Dollery, C. Leukotriene C4 elimination and metabolism in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85(1):3-9. (1990).
82. Huber, M., Muller, J., Leier, I., Jedlitschky, G., Ball, H., Moore, K., Taylor, G., Williams, R. and Dietrich Keeper. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in monkey and man. *Eur. J. Biochem.* 194:309-315. (1990).

83. Lewis, R., Austen, K. and Soberman, R. Leukotrienes and other products of [the 5-lipoxygenase pathway. *N. Engl. J. Med.* 323(10):645-655. (1990).
84. Keppler, D., Hagmann, W., Rapp, S., Denzlinger, C. and Koch, H. The relation of leukotrienes to liver injury. *Hepatology*, 5(5):883-891. (1985).
85. Keppler, D., Huber, M. and Baumert, T. Leukotrienes as mediators in diseases of the liver. *Semin. Liv. Dis.* 8(4):357-368. (1988).
86. Tiegs, G. and Wendel, A. Leukotriene mediated liver injury. *Biochem. Pharmac.* 37(13):2569-2573. (1988).
87. Hagmann, W., Kaiser, I. and Jakschik, B. The sensitized liver represents a rich source of endogenous leukotrienes. *Hepatology*, 13(3):482-488. (1991)
88. Rodriguez, E. and Spitzer, J. Metabolic fate of arachidonic acid in hepatocytes of continuously endotoxemic rats. *J. Clin. Invest.* 81:700-709. (1987).
89. Pace-Asciak, C., Klein, J., Lombard, S., Torchia, J. and Rokach, J. Catabolism of leukotriene A<sub>4</sub> into B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> by rat liver subcellular fractions. *Bioch. Biophys. Acta.* 836:153-156. (1985).
90. Uemura, M., Buchholz, U., Kojima, H., Keppler, A., Hafkemeyer, P., Fukui, H., Tsujii, T. and Keppler, D. Cyteinyl leukotrienes in the urine of patients with liver diseases. *Hepatology*, 20(4); 804-812. (1994).
91. Shiratori, Y., Tanaka, M., Umihara, J., Kawase, T., Shiina, S. and

- Sugimoto, T. Leukotriene inhibitors modulate hepatic injury induced by lipopolysaccharide-activated macrophages. *J. Hepatol.* 10:51-61. (1990)
92. Huber, M., Kastner, S., Scholmerich, J., Gerok, W. and Keppler, D. Analysis of cysteinyl leukotrienes in human urine: enhanced excretion in patients with liver cirrhosis and hepatorenal syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 19: 53-60. (1989).
93. Rodríguez, C. Vesperinas, I., Qian, C., Quiroga, J., Medina, J. and Prieto, J. Taurocholate- stimulated leukotriene C<sub>4</sub> biosynthesis and leukotriene C<sub>4</sub> stimulated choleresis in isolated rat liver. *Gastroenterology*, 108:1793-1801. (1995).
94. Kawada, N., Mizoguchi, Y. Sakagami, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S. Changes in leukotrienes and prostaglandins in the liver tissue of rats in the experimental massive hepatic cell necrosis model. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 40:149-155. (1990)
95. Muñoz, L., and Salazar, O. Systemic inflammation in patients with amebic liver abscess chemotaxis of polymorphonuclear cells. *Arch. Invest. Med. Sup* 1:313:318. (1986).
96. Wang, W. and Chadde, K. Entamoeba histolytica alters arachidonic acid metabolism in macrophages in vitro and in vivo. *Immunology*, 76:242-250. (1992)
97. Belley, A. and Chadee, K. Eicosanoid production by parasites: from

- pathogenesis to immunomodulation. *Parasitol. Today*, 11(9):327-334.(1995).
98. Shaio, M. and Lin, P. Leucotriene B4 levels in the vaginal discharges from cases of trichomoniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89(1):85-88. (1995).
99. Qiu, D., Hui, K., Lee, C., Lim, T. and Tan, C. Simplified method for measuring urinary leukotriene E4. *J. Chromatogr.* 677: 152-155. (1996).
100. Gut, J., and Trudell, R., Leukotriene biosynthesis: direct chemical ionization mass spectrometry of underivatized arachidonic acid metabolites. *Biomed. Environm. mass spectromet.*, 15:509-516. (1988).
101. Westcott, J., Stenmark, K. and Murphy, C. Analysis of leukotriene B4 in human lung lavage by HPLC and mass spectrometry. *Prostaglandins*, 31(2):227-237. (1986).
102. Strife, R. and Murphy, R. Stable isotope labelled 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid: analysis by negative ion chemical ionization massspectrometry. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 13:1-8. (1984).
103. Hill, E. and Murphy, R. Quantitation of 20-hdroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid (20-HETE) produced by human polymorphonuclear Leukocytes using electron capture ionization gas chromatography/ mass spectrometry. *Biol. Mass Spectromet.*, 21:249-253. (1992).

104. Richmond, R., Turner, N., Maltby, N., Heavey, D., Vial, J., Dollery, C., and Taylor, G. Single-step procedure for the extraction and purification of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>. *J. Chromatogr.* 417:241-251. (1987).
105. Kikawa, Y., Nakai, A., Shigematsu, Y and Sudo, M. Extraction of urinary leukotriene E<sub>4</sub> by the combined use of octadecyl reversed-phase and NH<sub>2</sub> normal-phase extraction columns. *J. Chromatogr.* 532: 387-393. (1990).
106. Jubiz, W., Nolan, G. and Kaltenborn, K. An improved technique for extraction, identification and quantification of leukotrienes. *J. Liq. Chromat.*, 8(8): 1519-1526. (1985).
107. Raghunath, M., Stiegeler, A., Lange, B. and Frosch, P. Extraction of various arachidonic acid metabolites from minimal amounts of biological fluid with a new generation of minimaturized solid phase extraction cartridges. *J. Liq. Chromat.* 13(5):969-980. (1990).
108. Eskra, J., Pereira, M. and Ernest, M. Solid-phase Extraction and high-performance liquid chromatography analysis of lipoygenase pathway products. *Anal. Biochem.* 154: 332-337. (1986).
109. Verhagen, J., Wassink, G., Kijne, G., Vietor, R. and Bruynzeel, P. Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulphidopeptide leukotrienes LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub>, using octadecyl reversed-phase extraction columns. *J. Chromat.* 378: 208-214. (1986).
110. Huwyler, J. and Gut, J. Single-step organic extraction of leukotrienes



- and related compounds and their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 188:374-382. (1990).
111. Powell, W. Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases. *Anal. Biochem.* 148: 59-69. (1985).
112. Metz, S., Hall, M., Harper, T. and Murphy, R. Rapid extraction of leukotrienes from biologic fluids and quantitation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 233:193-201. (1982).
113. Quattrocchi, O. Abelaira, S. and Laba, R. Introducción a la HPLC. Ed. *Artes Gráficas Farro*, (1992)
114. Poole, CF. Chromatography Today. *Editorial Elsevier*, (1991)
115. García, A. y Castillo, B. Cromatografía de líquidos de alta resolución. 1ª. Edición. *Editorial LIMUSA*, (1988)
116. Castañeda P., Giral, C. Manual de validación de métodos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
117. World Health Organization, Geneva. Amoebiasis. 72,97-100. (1997).
118. Kuma, S. Inaba, M., Ogata, H., Inaba, K., Okumura, T., Saito, K., Yamamoto, M. and Ikehara, S. Effect of human recombinant interleukin 6 on the proliferation of mouse hepatocytes in the primary culture. *Immunobiology*, 180:235-242. (1990).
119. Cressman, D., Greenbaum, L., DeAngelis, R., Ciliberto, G., Furth, E.,

- Poli, V. And Taub, R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin 6 deficient mice. *Science*, 274:1379-1383. (1996).
120. Guerne, P., Carson, D. and Lotz, M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors and hormones in vitro. *J. Immunol.* 144(2):499-505. (1990).
121. Poubelle, P., Stankova, J., Grassi, J. and Pleszczynski, M. Leukotriene B4 up-regulates IL-6 rather than IL-1 synthesis in human monocytes. *Agents and Actions*, 34(1/2):42-45. (1991)
122. Locati, M., Zhou, D., Luini, W., Evangelista, V., Mantovani, A. and Sozzani, S. Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *The J. Biol. Chem.* 269(7):4746-4753. (1994).
123. Dpersio, J., Billing, P., Williams, R. and Gasson. Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor and other cytokines prime human neutrophils for enhanced arachidonic acid release and leukotriene B4 synthesis. *J. Immunol.* 140:4315-4322. (1988).

**APENDICE A**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### FORMA DE PARTICIPACION VOLUNTARIA EN EL PROYECTO:

***" Respuesta inflamatoria y de fase aguda en el Absceso Hepático amibiano mediante el estudio de leucotrienos B4, C4, D4, E4 e IL-6, IL-1  $\beta$  y FNT  $\alpha$  "***

Fecha: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / 199\_\_

### A QUIEN CORRESPONDA:

Declaro libre y voluntariamente que mi nombre es \_\_\_\_\_ y que acepto participar en este proyecto de investigación que se realiza en el Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la U.A.N.L. cuyo objetivo es dilucidar la participación de leucotrienos y citocinas en la respuesta inflamatoria y de fase aguda en el Absceso Hepático Amibiano (AHA).

Se me ha expresado que en esta investigación se espera obtener como beneficio una profundización en el conocimiento de factores clínicos y bioquímicos que permitan inferir los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de esta alteración.

Entiendo que estaré sometido en dos ocasiones a los siguientes estudios: venopunción para extracción de 20 cc. de sangre y recolección de orina por micción espontánea durante un día, esto se realizará durante el padecimiento y después de la recuperación total; lo cual no representa riesgo alguno para mi salud.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de esta. Además entiendo que estoy en la libertad de retirarme en el momento que desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además, el Hospital Universitario de la U.A.N.L. estará en la disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizado de acuerdo al daño sufrido

\_\_\_\_\_

Paciente

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Testigo

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Testigo

Nombre \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Investigador

Nombre: Q. C. B. Paula Cordero Pérez

Dirección: Sitio de Qto. 143 Fracc.

Benito Juárez, La Fama

Sta. Catarina N.L.

**APENDICE B**

**EXPEDIENTE CLINICO**

# EXPEDIENTE CLINICO

HOSPITAL UNIVERSITARIO  
"Dr. José Eleuterio González"  
Servicio de Gastroenterología  
Unidad de Hígado

PROYECTO: RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL ABSCESO HEPATICO  
AMIBIANO MEDIANTE EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS BA, CA, DA, EA, E IL-6,  
IL-1 BETA Y FNT ALFA

FECHA \_\_\_\_\_

No. Exp. H.U. \_\_\_\_\_

No. Exp. U. de H. \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

DOMICILIO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ TEL. \_\_\_\_\_

INTERNAMIENTO DE \_\_\_\_\_ A \_\_\_\_\_

CITA A CONSULTA EXTERNA (C# 7) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO: \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES

#### ALCOHOLISMO

Cantidad \_\_\_\_\_

Frecuencia \_\_\_\_\_

Duración \_\_\_\_\_

#### DIARREA

Mayor de 1 mes \_\_\_\_\_

Menor de 1 mes \_\_\_\_\_

#### OTROS

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

OBSERVACIONES DURANTE EL				
LISTA DE SINTOMAS	INGRESO	INTERNAMIENTO	ALTA	CONVALESCENCIA
Color abdominal				
Fiebre				
Ictencia				
Pérdida de peso				
Coluria				
Ataques al edo. genl.				
Otros				
MEDICAMENTOS				
Dosis				
Tiempo				
EXAMEN FISICO				
Abdomen (hepato megalia)				
Torax (hemidiafragma)				
Otros				



OBSERVACIONES DURANTE EL				
LABORATORIO	INGRESO	INTERNAMIENTO	ALTA	CONVALESCENCIA
Hemoglobina				
Hematocrito				
CMHb				
Leucocitos				
Diferencial				
TP				
TTP				
Bilirubina directa				
Bilirubina indirecta				
Bilirubina total				
Proteinas totales				
Albumina				
Globulinas				
Fosfatasa alcalina				
GGT				
ALT				
AST				
LDH				
LAPO				
Serameba				
Western blot				
Na s/o				
Creatinina				
Dep de Creatinina en 24 hrs				
Otros				

**ESTUDIOS DE GABINETE**

Tele de torax \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Placa simple de abdomen \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

US/TAC/RMN \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Tamaño de (los) abscesos: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Número de abscesos \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Localización \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**COMENTARIOS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO



Paula Cordero Pérez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

Tesis:

**RESPUESTA INFLAMATORIA Y DE FASE AGUDA EN EL ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO MEDIANTE EL ESTUDIO DE LEUCOTRIENOS B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> Y D<sub>4</sub> E INTERLEUCINA 1 $\beta$ , INTERLEUCINA 6 Y FACTOR DE NECROSIS TUMORAL  $\alpha$ .**

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Santa Catarina, Nuevo León el 26 de Noviembre de 1968, hija de Severiano Cordero Moncada y Paula Pérez Picón.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biologo en 1991.

