

PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO DURANTE EL DESARROLLO DEL ABSCESO HEPATICO AMEBIANO

JOEL RAMIREZ-EMILIANO¹, LERIDA LISS FLORES-VILLAVICENCIO²,
JOSE SEGOVIA³, SERGIO ARIAS-NEGRETE²

¹Instituto de Investigaciones Médicas; ²Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. México; ³Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), México

Resumen El óxido nítrico participa en funciones fisiológicas y fisiopatológicas, así como en el mecanismo de defensa del sistema inmunológico de mamíferos contra parásitos, virus y bacterias. La *Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario causante de la amebiasis, la cual se caracteriza por el daño intestinal y la formación del absceso hepático amebiano (AHA). El desarrollo del absceso hepático amebiano en el hámster es similar al que desarrolla el humano, mientras que el ratón es resistente a la formación de este absceso, debido a un incremento en la producción de óxido nítrico. A diferencia del ratón, el desarrollo del absceso hepático amebiano en el hámster es debido a un exceso en la producción de óxido nítrico o posiblemente a una mayor susceptibilidad del hámster al daño producido por el óxido nítrico. Por lo tanto, sería importante realizar más estudios para determinar si en el humano, un exceso en la producción de óxido nítrico favorece la formación del absceso hepático amebiano.

Palabras clave: óxido nítrico sintasa inducible, óxido nítrico, amebiasis, *Entamoeba histolytica*, absceso hepático amebiano

Abstract *Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development.* Nitric oxide participates in both physiological and pathophysiological functions, and it plays an important role in the mammalian immune system in killing or inhibiting the growth of many pathogens, including parasites, viruses and bacteria. *Entamoeba histolytica* is a protozoan parasite that causes amoebiasis, which is characterized by intestinal damage and amoebic liver abscess development. The development of amoebic liver abscess in hamsters is similar to that in humans, whereas mice are resistant to amoebic liver abscess development due to an increase in nitric oxide production. Unlike in mice, amoebic liver abscess development in hamsters is due to an excess in nitric oxide production or possibly to a greater susceptibility of the hamster to damage caused by nitric oxide. Therefore, it could be important to elucidate if, in humans, an excess in nitric oxide production favors amoebic liver abscess development.

Key words: inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, amoebiasis, *Entamoeba histolytica*, amoebic liver abscess

El sistema inmune en los vertebrados provee protección mediante mecanismos coordinados entre la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata. La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por su especificidad y memoria, y es mediada por linfocitos B y T¹.

La inmunidad innata en mamíferos es la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, la cual es mediada por macrófagos (MΦs), células dendríticas, neutrófilos y células endoteliales^{2,3}. Las células que median la inmunidad innata reconocen a molé-

culas denominadas "patrones moleculares asociados a los patógenos (PMAPs)" que se encuentran exclusivamente en parásitos, hongos, virus y bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), pero no en células de mamíferos. Los PMAPs están conformados por el lipopolisacárido (LPS), la peptidoglicana, el zimosan (componente de la pared de las levaduras), el ácido teicoico, la flagelina y los motivos CpG del ADN^{2,4}. Las células que median la inmunidad innata reconocen específicamente a los PMAPs a través de una familia de receptores denominados como TLRs, (*Toll-like receptors*^{1-3,5}). En la actualidad, en mamíferos se han descrito al menos 12 miembros de la familia de receptores TLRs³ los cuales, al unir a su ligando, inician la cascada de transducción de señales para activar a las células que participan en la inmunidad innata. Así, los MΦs activados producen tanto el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) como interleuquina (IL)-1 e IL-6; asi-

Recibido: 29-VI-2006

Acceptado: 11-X-2006

Dirección postal: Dr. Joel Ramírez-Emiliano, Instituto de Investigaciones Médicas. Universidad de Guanajuato.
20 de Enero 929, Col. Obregón. León, Gto. México C.P. 37320
Fax: (52-477) 7 14 38 12 e-mail: joelramirez2244@hotmail.com

mismo sintetizan intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y de nitrógeno, tales como el radical superóxido y el óxido nítrico (NO), respectivamente⁴.

Se ha descrito que el NO producido por los MΦs activados y por otros tipos celulares, confiere resistencia a infecciones causadas por microorganismos intra y extracelulares⁶⁻¹². Sin embargo, en algunas infecciones, la alta producción de NO es perjudicial para el huésped¹³, debido a que el NO tiene como blanco los centros hierro-azufre, los puentes disulfuro y los grupos hemo de las proteínas, así como las bases del ADN⁸. Además, el NO puede reaccionar con el radical superóxido (O₂⁻) para formar el anión peroxinitrito (ONOO⁻)¹⁴, el cual puede nitrosilar principalmente residuos de tirosina de las proteínas del citoesqueleto tales como la actina y miosina, así como residuos de tirosina de enzimas importantes del metabolismo tales como la creatin cinasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y la piruvato cinasa, entre otras; por lo tanto, también puede dañar a las células del huésped^{15, 16}.

Esta revisión se enfoca principalmente a mostrar las evidencias que sugieren que la alta producción de NO producido por la inmunidad innata facilita el desarrollo del absceso hepático (AH) experimental producido por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* en el hámster y posiblemente en el humano.

Oxido nítrico

De forma independiente Palmer y col.¹⁷, e Ignarro y col.¹⁸ en 1987 demostraron que el NO es el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF, por sus iniciales en inglés) en el sistema vascular. Este radical libre está implicado en funciones fisiológicas y fisiopatológicas, así como también en el mecanismo de defensa inmunológico contra agentes patógenos.

Propiedades del óxido nítrico

El NO es un radical libre diatómico, el cual tiene un tiempo de vida media (t_{1/2}) de 1.8 min a 5 s en tejidos biológicos¹⁹⁻²². A pesar de su t_{1/2} tan corto, el NO es capaz de difundir libremente de una célula a otra para realizar su función biológica, probablemente debido a que es una molécula sin carga y de diámetro pequeño.

Oxido nítrico sintasas y síntesis de óxido nítrico

El NO es sintetizado por una familia compuesta de tres isoenzimas homodiméricas, conocidas oficialmente como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS)²³. El nombre fue asignado con base en el tipo celular en el cual fueron originalmente encontradas las proteínas óxido nítrico sintasas (NOSs)^{23, 24}.

Se ha establecido que las isoenzimas eNOS y nNOS son de expresión constitutiva, mientras que la iNOS es inducible^{24, 25}. También se han clasificado con base en su dependencia por el ión calcio (Ca²⁺); así, se clasificó la actividad de la nNOS y la eNOS como dependientes de Ca²⁺ y la de la iNOS como independiente de este catión²⁵⁻²⁸. Sin embargo, existen evidencias que señalan que se puede incrementar la expresión de las isoformas constitutivas y que la iNOS puede ser de expresión constitutiva en algunos tejidos; además, algunos autores han descrito que la iNOS puede ser dependiente de calcio^{29, 30}. Estas diferencias no serán discutidas ampliamente en esta revisión, pero consideramos que es importante considerarlas como un antecedente. En cuanto a su síntesis, el NO es producido por las NOSs, las cuales catalizan la síntesis de NO a partir de la conversión del aminoácido catiónico L-arginina más oxígeno para producir L-citrulina y NO^{24, 25}.

Funciones del óxido nítrico

Actualmente, se ha involucrado al NO en múltiples funciones tales como: la transmisión a nivel del sistema nervioso^{31, 32}, la relajación del músculo liso¹⁹, como mensajero intra e intercelular³³, la regulación de la acción y secreción de la insulina³⁴, la regulación de la respiración y por consiguiente, la regulación de la síntesis de ATP³⁵⁻³⁸, el daño por hipoxia-reoxigenación^{38, 39}, la erección penil⁴⁰, y está implicado en enfermedades neurodegenerativas tales como el *Parkinson*^{41, 42}, *Huntington's*⁴³, *Alzheimer*^{44, 45} y la esclerosis múltiple⁴⁶. Además, se ha descrito que el NO forma parte del mecanismo de defensa del sistema inmunológico en contra de diversos agentes patógenos^{7, 12}, lo cual es el punto de interés en esta revisión.

Amebiasis

La amebiasis humana es una infección causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Este parásito se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo; sin embargo, su prevalencia es mayor en aquellas poblaciones con medidas sanitarias deficientes. Se ha calculado que anualmente hay más de 50 millones de personas infectadas con la *E. histolytica* y se estima que en la actualidad causa entre 50 000 y 100 000 muertes por año⁴⁷.

En México, se ha encontrado una alta prevalencia de la ameba en regiones rurales. Precisamente, en Cuahuixtla en el estado de Morelos, se encontró a la ameba en 33 muestras de materia fecal, de 290 analizadas, lo que corresponde a una frecuencia del 11.4%⁴⁸.

Por otro lado, un estudio mostró que en Taiwán las personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana presentaron un mayor riesgo de desarrollar

amebiasis invasiva^{49, 50}; igualmente, las personas que padecen diabetes presentan un mayor riesgo de desarrollar amebiasis invasiva^{49, 50}.

Marcadores de patogenicidad

La *Entamoeba histolytica* presenta dos estadios morfológicos importantes durante su ciclo de vida: el quíste, el cual es la forma de resistencia e infectiva, y el trofozoíto que es la forma móvil e invasiva del parásito^{51, 52}.

La formación del AH es un marcador de patogenicidad de la *E. histolytica*^{51, 53}. La infección amebiana se inicia cuando se ingieren alimentos contaminados con los quistes de la *E. histolytica*, los cuales son arrastrados con el bolo alimenticio al tracto digestivo. Al llegar el quiste al íleon terminal, por la acción de las enzimas digestivas y posiblemente otros factores del huésped, se induce en el colon el desenquistamiento generando el trofozoíto, que se multiplica y puede causar ulceraciones, colitis y disentería^{52, 53}. Además, los trofozoítos de la *E. histolytica* pueden invadir el hígado, posiblemente al ser transportados vía la vena porta, para producir el AH^{52, 53} y/o invadir otros tejidos tales como el cerebro y los pulmones⁵⁴⁻⁵⁷.

Factores de patogenicidad de Entamoeba histolytica

La ameba posee diferentes componentes para lograr la invasión y daño al huésped. Así, algunos de los factores de patogenicidad son: una lectina heterodimérica de 260 kDa, la cual se encuentra en la superficie celular y es esencial para la adhesión de la ameba a las mucinas de la pared del intestino y poder iniciar la invasión del huésped⁵⁸, una adhesina con un peso molecular de 112 kDa que se une al hialuronato de los eritrocitos, un receptor a fibronectina de peso molecular de 37 kDa que participa en la adhesión a la matriz extracelular, una proteína de 77 kDa formadora de poros, conocida como ameba-poro, que incrementa la permeabilidad de las bicapas lipídicas, serotonina que altera el transporte de electrolitos del intestino y una fosfolipasa A₂ que hidroliza diacilfosfolípidos^{51, 52}. Además, la *E. histolytica* posee una gran cantidad de proteasas para la degradación de los tejidos, de las cuales las más importantes son dependientes de cisteína^{51, 59}. Se ha observado que las cisteín proteasas amebianas son capaces de degradar las proteínas del complemento⁶⁰ e inmunoglobulinas humanas⁶¹. Otros autores han descrito dos proteínas de membrana, una de 23.5 y otra de 25 kDa con capacidad de lisar eritrocitos de rata^{62, 63}. También se han descrito dos serín proteasas que al parecer pueden actuar como homodímero de 130 kDa o homotetrámero de 250 kDa^{64, 65}; se considera que ambas proteasas son importantes para que la ameba lleve a cabo el proceso de invasión hacia su huésped.

Es importante mencionar que la invasión de la ameba es un proceso multifactorial que involucra tanto los factores de patogenicidad de la ameba como los mecanismos de defensa del huésped. Sin embargo, es nuestro interés abordar aspectos concernientes al efecto del NO durante la amebiasis experimental con la finalidad de diseñar estrategias para un mejor tratamiento de la amebiasis en humanos.

Participación del óxido nítrico en el desarrollo del absceso hepático experimental

Para estudiar el proceso infeccioso del parásito protozoario *E. histolytica* se han utilizado principalmente tres especies animales como son el ratón, el jerbo y el hámster. Se ha descrito que el desarrollo del absceso hepático amebiano, mediante la inoculación intraportal de trofozoítos de la *E. histolytica* en hámster, se lleva a cabo en tres fases consecutivas: 1) una inflamación aguda, 2) la formación de un granuloma y 3) una necrosis extensa. Entre 1 y 2 h del arribo de la ameba al hígado, el trofozoíto es rodeado por leucocitos polimorfonucleares (PMN), cuyo número se incrementa progresivamente y, después de 5 a 6 h hay un gran acúmulo de PMN y células mononucleares presentándose una destrucción de los mismos. Dos horas después de inyectar los trofozoítos amebianos en el hígado, se presenta un cuadro isquémico en el área de la infección y posteriormente se observa la muerte de los leucocitos, las amebas y las células hepáticas. A los 2 días comienzan a unirse las lesiones necróticas y a los 4 días se forma un granuloma bien definido^{66, 67}. Bajo estas condiciones experimentales, los hámsteres desarrollan el AHA de una manera similar al del humano. En estos estudios se observó que más del 90% de los hámsteres murieron 1 mes después de haber sido inducida la infección hepática experimental⁶⁷.

Diversos estudios realizados en hámsteres mostraron que la formación del AHA se caracteriza por un gran exudado constituido principalmente por células inflamatorias, formando un margen de PMN alrededor de la ameba. Estos PMN se adhieren a los trofozoítos y pueden, algunas veces, estar polarizados en un extremo del parásito, sugiriendo que se unen a receptores de superficie de la ameba. En este mismo estudio se observó que las etapas tempranas de la infección se caracterizan por la producción de reacciones inflamatorias distales en los espacios portales hepáticos, lo cual sugiere que las células inflamatorias participan junto con los trofozoítos amebianos en el daño hepático y en la producción de lesiones para producir necrosis tisular⁶⁸. Estudios recientes en el humano han confirmado que en la periferia del AHA existen interacciones entre hepatocitos, neutrófilos, MΦs y células T con los trofozoítos

de la *E. histolytica*⁶⁹. Mediante estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que tanto proteínas como componentes secretados por las amebas o los propios trofozoítos de la *E. histolytica* inducen un aumento en los niveles de IL-8 en células de colon humano en cultivo. Este hallazgo podría explicar las bases moleculares del proceso inflamatorio, puesto que la IL-8 tiene la propiedad de atraer y activar neutrófilos causando una gran inflamación, y así podría facilitar el proceso invasivo por los trofozoítos amebianos hacia los tejidos del huésped^{70, 71}.

Otros investigadores han intentado dilucidar cuáles son las células inmunes que participan en la destrucción de la *E. histolytica*. Para ello se han empleado MΦs de ratón en cultivo, los cuales después de la estimulación con LPS y/o interferón gamma (IFN-γ), incrementaron su actividad citocida contra la *E. histolytica*, lo cual correlacionó con los niveles de nitritos liberados en el medio de cultivo; estos efectos fueron dependientes de L-arginina⁷². En este mismo estudio, cuando se aplicó nitrato de sodio o nitroprusiato de sodio (donador de NO) al medio de cultivo amebiano, se observó actividad citocida contra la ameba. Al determinar la influencia del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno liberado por los MΦs sobre la viabilidad de la *E. histolytica*, se demostró que el NO es la principal molécula liberada por los MΦs implicada en la actividad citocida contra la *E. histolytica*⁷². Otro estudio *in vitro* mostró que la combinación del TNF-α e IFN-γ incrementó tanto la producción de nitritos como la actividad citocida de MΦs contra la *E. histolytica*. Por otro lado, la combinación de LPS e IFN-γ mostró una correlación lineal entre la liberación de TNF-α y la producción de nitritos⁷³.

A pesar de que se ha demostrado que los MΦs de ratón son capaces de destruir a la ameba a través de la producción de NO, en MΦs alveolares de hámster no se había descrito la producción de NO en respuesta a la estimulación con LPS y/o IFN-γ. Asimismo, con el empleo de anticuerpos no se detectó la iNOS en esta población de MΦs⁷⁴⁻⁷⁶. Cabe mencionar, que recientemente nosotros mostramos que MΦs peritoneales de hámster, en cultivo, expresaron el ARNm para la iNOS y sintetizaron NO en respuesta a la estimulación con LPS⁷⁷.

Asimismo, se ha tratado de dilucidar *in vivo* cuáles células participan en la destrucción de la *E. histolytica*. Para ello, se ha utilizado al ratón como uno de los modelos experimentales; sin embargo, esta especie no desarrolla el AHA. Por esta razón se han utilizado ratones mutantes que carecen de neutrófilos y presentan inmunodeficiencia grave combinada (SCID), los cuales son susceptibles a la formación de AH producido por la *E. histolytica*, causando un daño mayor en etapas tempranas de la infección^{78, 79}. Se ha sugerido que en el ratón la inmunidad innata es importante para evitar el desarrollo del AHA; en tal caso, el NO producido por los neutrófilos puede ser un factor amebicida importante⁸⁰.

En otros estudios realizados en jerbos (*Meriones unguiculatus*, también conocido como rata canguro), se observó que la infección hepática experimental por la *E. histolytica* inhibió la actividad citotóxica de MΦs cultivados que provenían de la lesión inflamatoria, en tanto que en MΦs cultivados que provenían de la cavidad peritoneal y el bazo, la actividad citotóxica fue inhibida a partir de los 15 días post-infección. La inhibición de la actividad citotóxica estuvo caracterizada por una baja producción de NO en respuesta a IFN-γ y LPS. Para explicar lo anterior, se cultivaron MΦs de ratón a los cuales se les adicionaron proteínas de la *E. histolytica*, encontrándose que su actividad citotóxica contra las amebas y células tumorales estaba disminuida. La disminución de la actividad citotóxica del MΦs correlacionó con la disminución de la expresión del ARNm para la iNOS y del TNF-α, así como disminución de la producción de TNF-α y nitritos por mecanismos independientes⁸¹. Además, el suero proveniente de jerbos con AHA, suprime la proliferación de las células T⁸². Adicionalmente, el factor inhibitorio de la locomoción monocítica que produce la ameba, inhibe la producción de NO por los leucocitos humanos *in vitro*⁸³.

Existen evidencias indirectas que indican que el NO se produce durante la formación del AHA en hámster, lo cual está sustentado en estudios realizados en hámsteres infectados con trofozoítos de la *E. histolytica*, en los cuales se observó la inducción de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) en MΦs y PMN del área del AH⁸⁴. Las evidencias anteriores sugieren la presencia de la iNOS, debido a que se ha descrito que tanto *in vivo* como *in vitro* existe la co-inducción de la iNOS y COX-2 en respuesta al LPS o a diversos patógenos⁸⁵⁻⁸⁷. Asimismo, se ha descrito que la expresión de la iNOS induce la expresión de la COX-2 a través de la síntesis de NO⁸⁸.

Recientemente, nosotros demostramos que en hámsteres inoculados intrahepáticamente con trofozoítos de la *E. histolytica* se induce la expresión del ARNm para la iNOS a partir de las 3 h posteriores a la inoculación de las amebas, lo cual sugiere la presencia de la proteína iNOS. Además, a los 6 días post-inoculación de las amebas, se observó un incremento del 65% en los niveles de nitritos séricos, y los hámsteres desarrollaron un AH que abarcó el 50% del hígado⁷⁷. Estos resultados correlacionaron con estudios previos realizados en hámsteres inoculados intrahepáticamente con trofozoítos de la *E. histolytica*, los cuales mostraron que los hámsteres desarrollaron el AH que corresponde aproximadamente a un 42% del peso total del hígado, lo que correlacionó con el incremento de los niveles de nitritos en suero. En este mismo estudio se observó un incremento de la actividad NADPH diaforasa (NADPHd) en hepatocitos y células inflamatorias localizadas en la periferia del foco necrótico producido por la *E. histolytica*⁸⁹. La actividad NADPHd es un indicador inespecífico de la

presencia de actividad de las NOSs. Por otro lado, cuando los hámsteres infectados intrahepáticamente con la *E. histolytica* fueron tratados con inhibidores de la producción de NO tales como el N^w-nitro-L-arginina metil éster, la aminoguanidina y la dexametasona por períodos prolongados, se encontró una disminución del nitrito sérico y del tamaño del AH⁸⁹. Estos resultados, en conjunto, demuestran que las amebas inducen la expresión de la iNOS y un incremento en la producción de NO durante la formación del AHA; sin embargo, el NO parece ser más dañino para el huésped que para la ameba, facilitando así la invasión de este parásito.

Es evidente que el NO destruye a los trofozoítos de la *E. histolytica*, ya que el NO es la principal molécula citotóxica producida *in vitro* por los MΦs de ratón⁷². Además, se ha descrito que si a la molécula de metronidazol se le agrega un grupo que libere NO, se incrementa la citotoxicidad *in vitro* contra los trofozoítos de la *E. histolytica*⁹⁰. Se ha sugerido que una de las razones de la citotoxicidad *in vitro* del NO sobre la ameba, es el resultado de la inhibición de las cistein proteasas y de la alcohol deshidrogenasa 2; actividades enzimáticas que contribuyen a la virulencia y a la sobrevivencia del parásito, respectivamente⁹¹. Además, el NO puede nitrosilar residuos de tirosina de proteínas del metabolismo inhibiendo su actividad^{15, 16}.

A pesar de que el NO *in vitro* destruye a la ameba y que *in vivo* se produce NO, no es suficiente para detener la formación del AHA en el hámster. Estudios realizados en el ratón, mostraron que hay un gran infiltrado de neutrófilos, MΦs, linfocitos T y B que limitan el área del AHA⁸⁰. En el hámster, se observó que las células polimorfonucleares y mononucleares rodean a los trofozoítos de la *E. histolytica* en la periferia del AH y también se observó la adhesión entre los trofozoítos de la ameba y las células hepáticas⁶⁶. Asimismo, en el humano, se observó que en la periferia del AHA se presentan interacciones entre hepatocitos, neutrófilos, MΦs y células T con los trofozoítos de la *E. histolytica*⁶⁹. Esto indica que durante el desarrollo del AHA, tanto en el hámster como en el humano se efectúan estas interacciones celulares, pero que estas células inmunes no tienen la capacidad de destruir a la ameba mediante la síntesis de NO y/o otros mecanismos. Otro factor que se ha visto involucrado en la destrucción de la ameba es el TNF- α . Al respecto se ha informado que durante la etapa temprana de la infección en hámster, las células inflamatorias producen bajos niveles de TNF- α , indicando inmunosupresión de estas células⁹². No obstante, se ha observado que pacientes humanos con amebiasis intestinal presentan niveles elevados de nitritos séricos, lo que sugiere un incremento en la producción de NO⁹³. Esto sugiere que la ameba no es destruida debido a una baja o alta producción de NO, o que posiblemente el NO no es sintetizado en el lugar adecuado para destruir a la ameba.

Para explicar nuestro planteamiento, primero debemos considerar que algunos autores han descrito que los trofozoítos de la *E. histolytica* tienen actividad NADPHd y algunas proteínas amebianas son reconocidas por anticuerpos específicos contra la iNOS de mamíferos, además de que sintetizan NO *in vitro*^{69, 94}. Estos hallazgos sugieren que posiblemente durante el desarrollo del AHA, los trofozoítos de la *E. histolytica* también sintetizan NO y podrían contribuir a la destrucción de las células inmunes y no inmunes del huésped, favoreciendo la formación del AHA en especies susceptibles tales como el humano, el hámster y el jerbo.

Si la ameba y las células del hámster producen NO durante la interacción que se lleva a cabo en el hígado, el NO podría ser más dañino para el hámster que para la propia ameba. Basados en los hallazgos reportados en ratón, los cuales describen que el NO producido por la iNOS es un factor determinante para que este roedor no desarrolle el AHA⁷⁹, consideramos que la ameba es capaz de producir el AH debido a una deficiencia de la respuesta inmune del hámster y no por el daño causado por el NO que produce la ameba. Esta hipótesis es sustentada por los hallazgos observados en el ratón, puesto que este roedor no desarrolla el AHA gracias a la producción de NO, sin importar que la ameba también lo produzca; sin embargo, el hamster sí desarrolla el AHA. Esto nos sugiere que el NO puede ser más dañino para el hámster que para los trofozoítos de la *E. histolytica* y, por tal motivo la ameba es capaz de producir el AH. Por lo tanto, es posible que el ratón sea más resistente al ataque del NO que el hámster; lo cual explicaría, en parte, la susceptibilidad del hámster para desarrollar el AH producido por la *E. histolytica*. Es posible que esta sea la causa por la cual el humano también desarrolla el AHA (Fig. 1).

Considerando las evidencias experimentales antes mencionadas, podrían existir tres alternativas para explicar las razones por las cuales el NO no destruye a la ameba en el hámster ni en el humano. Primero, quizás las células no están sintetizando la cantidad suficiente de NO para destruir a la ameba, pues en otros modelos el NO es importante para destruir a los patógenos^{12, 95-97}. Un estudio mostró que pacientes humanos con síntomas de amebiasis en la fase aguda, presentaron un patrón de citocinas característico de una respuesta Th2, lo cual evidencia una respuesta celular suprimida, sugiriendo por lo tanto una baja producción de NO⁹⁸. Adicionalmente, se ha descrito que pacientes humanos con deficiencia en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) por las células mononucleares, son más susceptibles a la recurrencia en la formación del AHA⁹⁹. No obstante, otro estudio mostró que pacientes humanos con amebiasis intestinal presentan altos niveles de nitritos séricos, lo que indica un incremento en la síntesis de NO⁹³.

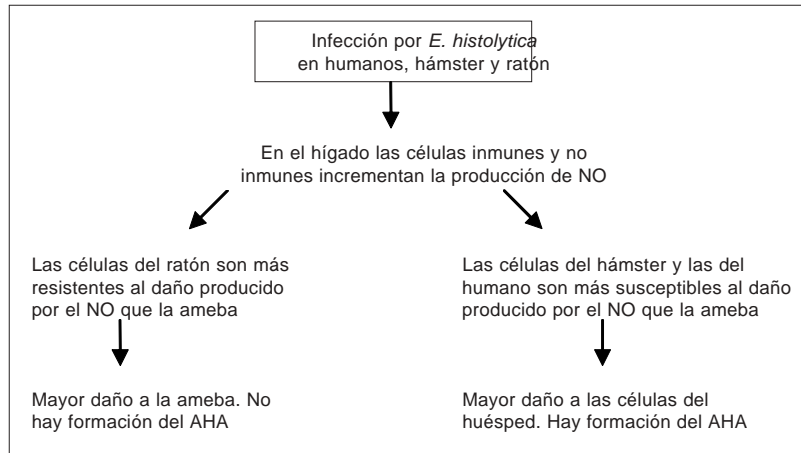


Fig. 1.— Participación del NO durante el desarrollo del AHA. En el ratón el incremento de la producción de NO evita que la ameba origine la formación del AH, mientras que en el hámster y posiblemente en el humano, el NO facilita que la ameba produzca el AH. El NO facilita que la ameba origine el AH en el humano y en el hámster debido a que estas especies son más vulnerables al daño producido por el NO que la ameba, mientras que el ratón es más resistente y consecuentemente la ameba es destruida. AHA, absceso hepático amebiano; AH; absceso hepático; NO, óxido nítrico.

Segundo, es posible que las células del huésped sintetizen demasiado NO y por tanto puedan dañarse más a sí mismas que a la ameba (Fig. 2). Este efecto dañino ha sido descrito en diferentes procesos infecciosos y modelos animales^{13, 15}. Lo anterior es apoyado por el hallazgo descrito en el hámster, en el cual se observó que al inhibir la síntesis de NO el tamaño del absceso disminuye⁸⁹. Además, se ha descrito que ratones mutantes que no expresan la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS^{-/-}) fueron capaces de sobrevivir a la fase aguda de la infección producida por *Toxoplasma gondii*, la cual se presenta a partir de los 12 días post-infección, mientras que en los ratones silvestres sólo sobrevivió el 50% de la población infectada¹³. También se ha descrito que la sobreproducción de NO en el bazo de becerros infectados con *Babesia bovis* incrementa la gravedad del proceso infeccioso⁹⁷.

Tercero, es posible que el NO sea sintetizado por células alejadas del sitio donde están los trofozoítos de la *E. histolytica*, lo cual dañaría más a las células del huésped que a los trofozoítos (Fig. 2). Por otro lado, es posible que se presente una combinación de las tres alternativas antes propuestas. Es decir, que haya una alta producción de NO por células residentes e inmunes que se encuentran alejadas del trofozoíto de la *E. histolytica*, y que las células que se encuentran en íntimo contacto con la ameba tengan una baja producción de NO (Fig. 2). Esta propuesta es apoyada por el hecho de que componentes solubles de los trofozoítos de la *E. histolytica* inhiben la activación de los MΦs⁸¹, por lo cual es posible que las células inflamatorias que se encuentran cerca de las amebas tengan una baja producción de NO y no la dañen.

Para describir la distribución del NO a partir de un punto específico en tejido sano de cerebro, Wood y

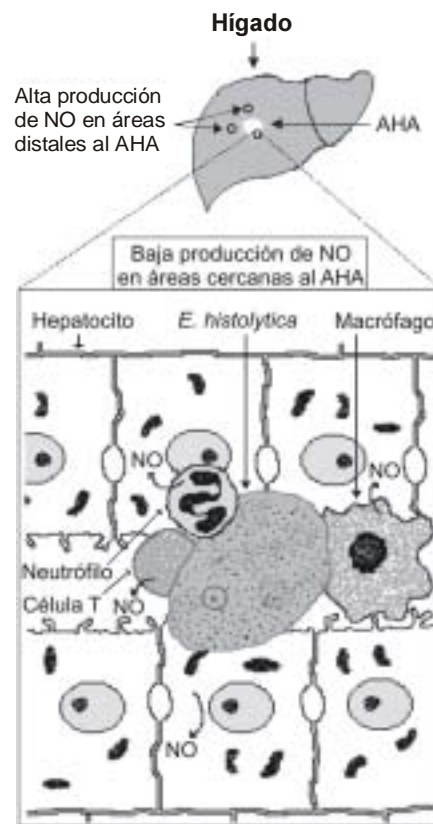


Fig. 2.— Modelo hipotético del daño causado por el NO durante la formación del AHA. Tanto en el humano como en el hámster, el NO causa mayor daño a las células del huésped que a la ameba, debido a que las células cercanas a la ameba producen bajos niveles de NO mientras que las que se encuentran alejadas producen altos niveles resultando en mayor daño al huésped que a la ameba. Ver texto para mayores detalles. AHA, absceso hepático amebiano; NO, óxido nítrico.

Garthwaite en 1994²⁰ desarrollaron un modelo teórico, donde propusieron que el NO se distribuye cubriendo un radio de 200 μm de diámetro; esto se dedujo tomando en cuenta que el $t_{1/2}$ del NO es de 1.8 ms a 5 s dependiendo del tipo celular¹⁹⁻²². Por lo tanto, en el AHA, para que el NO destruya a la ameba es necesario que sea sintetizado a una distancia preferentemente menor a los 200 μm . Las células del huésped tienen en promedio las siguientes dimensiones: los hepatocitos 25 μm , los M Φ s 28 μm , los neutrófilos 9 μm , las células T 13 μm , mientras que las amebas pueden medir de 10 a 40 μm ; esto significa que el NO debe ser sintetizado por las células inflamatorias que se encuentran en íntimo contacto con la ameba o a un máximo de 8 hepatocitos de distancia para que pueda destruir a la ameba. Es importante mencionar que la distancia que recorra el NO está en función de la cantidad que se produzca del mismo a partir de un punto determinado, pero también que esta distancia es limitada por las condiciones del microambiente celular. Es de esperarse que cerca del AHA haya un incremento de la extravasación, incrementándose la concentración de hemoglobina; así, no es de sorprender que la distancia que recorra el NO sea menor que en un tejido en condiciones normales. Por lo tanto, el NO puede ser inactivado más fácilmente en el área cercana al absceso y, en consecuencia, no destruiría al trofozoito amebiano. Sin embargo, esto no explica la causa de la deficiencia de la respuesta inmune en el hámster o en el humano contra el parásito *E. histolytica* en tanto la resistencia del ratón a la infección amebiana sea debida a la producción de NO. Lo anterior apoya nuestra hipótesis de que el hámster y el humano son más susceptibles al daño causado por el NO que el ratón, lo cual es aprovechado por la ameba para producir el AH (Fig. 1).

Discusión y perspectivas

Las evidencias experimentales indican que la *E. histolytica* es capaz de producir el AH tanto en el humano como en el hámster y en el jerbo, sin importar el incremento en la producción de NO. Además, estas evidencias sugieren que la producción del AHA es debida a un exceso en la producción del NO, el cual es más dañino para el hámster que para la ameba. Por lo tanto, es indispensable realizar más estudios dirigidos a determinar si el humano desarrolla el AHA debido a una alta producción de NO o por una insuficiente producción del mismo. Además, es necesario establecer cómo influyen otros mecanismos de defensa del huésped sobre la destrucción de la ameba.

Si en el humano el NO también facilita la invasión amebiana, es posible que la administración de un inhibidor de la síntesis de NO conjuntamente con el tratamiento para destruir a la ameba conduzca a un mejor

pronóstico para el paciente. Así, podrían ser útiles compuestos tales como la L-arginina metilester-nitro-NG (L-NAME) y la L-arginina-N-monometil (L-NNMA) que han sido utilizados satisfactoriamente en los humanos para inhibir el incremento en la producción de NO en infecciones causadas por otros patógenos.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado durante el apoyo otorgado a J. R-E en su estancia posdoctoral, donativo CONACYT 42721-N(JS), así como durante el apoyo otorgado por CONACYT a S. A-N.

Bibliografía

- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 637-46.
- Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 2001; 50: 315-21.
- Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: An emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol* 2004; 173: 5901-7.
- Nagy LE. Recent Insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med* 2003; 228: 882-90.
- Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in *Drosophila*: a family of molecules regulating development and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 63-79.
- Liew FY, Cox FE. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 1991; 12: A17-A21.
- Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett* 1994; 43: 87-94.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
- Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J Immunol* 1995; 155: 5306-13.
- Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 1997; 99: 110-6.
- Perez-Fuentes R, Sanchez-Guillen MC, Gonzalez-Alvarez C, Monteon VM, Reyes PA, Rosales-Encina JL. Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 715-20.
- Sasaki S, Miura T, Nishikawa S, Yamada K, Hirasue M, Nakane A. Protective role of nitric oxide in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 1017-22.
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13955-60.
- Packer MA, Porteous CM, Murphy MP. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40: 527-34.
- Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2424-9.
- Kanski J, Hong SJ, Schoneich C. Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification

- of nitrotyrosine-containing sequences in vivo by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Biol Chem* 2005; 280: 24261-6.
17. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
 18. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; 61: 866-79.
 19. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990; 66: 1561-75.
 20. Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1235-44.
 21. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster Jr JR. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 18709-13.
 22. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JRJ. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 355-60.
 23. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42.
 24. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
 25. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-30.
 26. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.
 27. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
 28. Lee S-J, Stull JT. Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1998; 273: 27430-37.
 29. Searles CD, Miwa Y, Harrison DG, Ramasamy S. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circ Res* 1999; 85: 588-95.
 30. Caillol M, Devinoy E, Lacroix MC, Schirar A. Endothelial and neuronal nitric oxide synthases are present in the suprachiasmatic nuclei of syrian hamsters and rats. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 649-61.
 31. Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-7.
 32. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
 33. Ishii K, Chang B, Kerwin JFJ, Wagenaar FL, Huang ZJ, Murad F. Formation of endothelium-derived relaxing factor in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells: an intra- and intercellular messenger for activation of soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 38-43.
 34. Shankar R, Zhu J-S, Ladd B, Henry D, Shen H-Q, Baron AD. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 1998; 102: 1403-12.
 35. Brown GC, Foxwell N, Moncada S. Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Lett* 1998; 439: 321-4.
 36. Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, et al. Control of mitochondrial respiration by NO. Effects of low oxygen and respiratory state. *J Biol Chem* 2003; 278: 31603-9.
 37. Saavedra-Molina A, Ramirez-Emiliano J, Clemente-Guerrero M, Perez-Vazquez V, Aguilera-Aguirre L, Gonzalez-Hernandez JC. Mitochondrial nitric oxide inhibits ATP synthesis. Effect of free calcium in rat heart. *Amino Acids* 2003; 24: 95-102.
 38. Schild L, Reinheckel T, Reiser M, Horn TFW, Wolf G, Augustin W. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J* 2003; 17: 2194-201.
 39. Manzo-Avalos S, Perez-Vazquez V, Ramirez J, et al. Regulation of the rate of synthesis of nitric oxide by Mg(2+) and hypoxia. Studies in rat heart mitochondria. *Amino Acids* 2002; 22: 381-9.
 40. Ari G, Vardi Y, Finberg JP. Nitric oxide and penile erection in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96: 365-71.
 41. Eve DJ, Nisbet AP, Kingsbury AE, et al. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 63: 62-71.
 42. Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life* 2003; 55: 329-35.
 43. Perez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Rios C, Segovia J. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* 2002; 951: 36-42.
 44. Gargiulo L, Bermejo M, Liras A. Reduced neuronal nitric oxide synthetase and c-protein kinase levels in Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 2000; 30: 301-3.
 45. Selley ML. Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 903-7.
 46. Acar G, Idiman F, Idiman E, Kirkali G, Cakmakci H, Ozakbas S. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250: 588-92.
 47. Ackers J, Mirelman D. Report on the 2nd EMBO Workshop on "Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease" held at Ein Gedi, Israel, November 16-20, 2004. *Exp Parasitol* 2005; 110: 170-2.
 48. Ramos F, Moran P, Gonzalez E, et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. *Exp Parasitol* 2005; 110: 327-30.
 49. Guvel S, Kilinc F, Kayaselcuk F, Tuncer I, Ozkardes H. *Emphysematous pyelonephritis* and renal amoebiasis in a patient with diabetes mellitus. *Int J Urol* 2003; 10: 404-6.
 50. Bredin C, Margery J, Bordier L, et al. Diabetes and Amoebiasis: a high risk encounter. *Diabetes Metab* 2004; 30: 99-102.
 51. Arias-Negrete S, Chadee K. Immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. In: LJ. Paradiisse, M. Bendinelli and H. Friedman (Eds). Enteric infections and immunity. New York: Plenum Press, 1996, p 207-26.
 52. Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 318-31.
 53. Montfort I, Olivos A, Perez Tamayo R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1992; 23: 177-9.
 54. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 228-38.
 55. Walsh JA. Amebiasis in the world. *Arch Invest Med (Mex)* 1986; 17: 385-9.
 56. Sundaram C, Prasad B, Bhaskar G, Lakshmi V, Murthy

- J. Brain abscess due to *Entamoeba histolytica*. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 251-2.
57. Lichtenstein A, Kondo AT, Visvesvara GS, et al. Pulmonary amoebiasis presenting as superior vena cava syndrome. *Thorax* 2005; 60: 350-2.
 58. Petri WAJ, Snodgrass TL, Jackson TF, et al. Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J Immunol* 1990; 144: 4803-9.
 59. Stanley SLJ, Zhang T, Rubin D, Li E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 1995; 63: 1587-90.
 60. Avila EE, Calderon J. *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Exp Parasitol* 1993; 76: 232-41.
 61. Araiza-Orozco LM, Avila EE, Munoz ML, Arias-Negrete S. *Entamoeba histolytica*: surface proteolytic activity and its relationship with in vitro virulence. *Folia Parasitol (Praha)* 1999; 46: 161-7.
 62. Rosales-Encina JL, Schlie-Guzman MA, Jimenez-Delgadill B, Talamas-Rohana P, Matluk MR. Purification and partial characterization of an hemolytic activity from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 1992; 23: 243-8.
 63. Rosales-Encina JL, Campos-Salazar MS, Rojkind Matluk M. *Entamoeba histolytica* collagen binding proteins. *Arch Med Res* 1992; 23: 109-13.
 64. Padilla-Vaca F, Martinez-Gallardo N, Blanco-Labra A, Shmueli H, Mirelman D. Novel thermo-stable serine-metallo proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 2000; 31: S221-S223.
 65. Barrios-Ceballos MP, Martinez-Gallardo NA, Anaya-Velazquez F, Mirelman D, Padilla-Vaca F. A novel protease from *Entamoeba histolytica* homologous to members of the family S28 of serine proteases. *Exp Parasitol* 2005; 110: 270-5.
 66. Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; 117: 81-91.
 67. Perez-Tamayo R, Martinez RD, Montfort I, Becker I, Tello E, Perez-Montfort R. Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *J Parasitol* 1991; 77: 982-8.
 68. Shibayama M, Campos-Rodriguez R, Ramirez-Rosales A, Martinez-Palomo A, Tsutsumi V. Morphological analysis of amebic liver abscess produced by intraperitoneal inoculation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in hamsters. *Arch Med Res* 1997; 28: 207-10.
 69. Ventura-Juarez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, et al. Human amebic hepatic abscess: *in situ* interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol* 2003; 25: 503-11.
 70. Yu Y, Chadee K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. *Gastroenterology* 1997; 112: 1536-47.
 71. Yu Y, Chadee K. Secreted *Entamoeba histolytica* proteins stimulate interleukin-8 mRNA expression and protein production in human colonic epithelial cells. *Arch Med Res* 1997; 28: 223-4.
 72. Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1992; 148: 3999-4005.
 73. Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun* 1994; 62: 1534-41.
 74. Jesch NK, Dorger M, Enders G, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and formation of nitric oxide by alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1297-300.
 75. Dorger M, Jesch NK, Rieder G, et al. Species differences in NO formation by rat and hamster alveolar macrophages *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 413-20.
 76. Jesch NK, Dorger M, Messmer K, Krombach F. Formation of nitric oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an interstrain and interspecies comparison. *Toxicol Lett* 1998; 96-97: 47-51.
 77. Ramírez-Emiliano J, González-Hernande A, Arias-Negrete S. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and nitric oxide production during the development of liver abscess in hamster inoculated with *Entamoeba histolytica*. *Curr Microbiol* 2005; 50: 299-308.
 78. Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SLJ. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 1997; 65: 1631-9.
 79. Seydel KB, Smith SJ, Stanley SLJ. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect Immun* 2000; 68: 400-2.
 80. Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp Parasitol* 2002; 101: 40-56.
 81. Wang W, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* 1994; 83: 601-10.
 82. Campbell D, Gaucher D, Chadee K. Serum from *Entamoeba histolytica*-infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. *J Infect Dis* 1999; 179: 1495-501.
 83. Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez JA, Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res* 2003; 90: 264-7.
 84. Sánchez-Ramírez B, Ramirez-Gil M, Vázquez-Moctezuma I, Ramos-Martinez E, Talamas-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol* 2004; 106: 119-25.
 85. Okamoto H, Roman RJ, Kampine JP, Hudetz AG. Endotoxin augments cerebral hyperemic response to halothane by inducing nitric oxide synthase and cyclooxygenase. *Anesth Analg* 2000; 91: 896-903.
 86. Rettori V, Lomniczi A, Elverdin JC, et al. Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmunomodulation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 258-67.
 87. Ghosh DK, Misukonis MA, Reich C, Pisetsky DS, Weinberg JB. Host response to infection: the role of CpG DNA in induction of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in murine macrophages. *Infect Immun* 2001; 69: 7703-10.
 88. Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ. Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G88-G95.
 89. Pacheco-Yepez J, Campos-Rodríguez R, Shibayama M, Ventura-Juárez J, Serrano-Luna J, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica*: production of nitric oxide and in situ

- activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol Res* 2001; 87: 49-56.
90. Sannella A, Gradoni L, Persichini T, Ongini E, Venturini G, Colasanti M. Intracellular release of nitric oxide by NCX 972, an NO-releasing metronidazole, enhances *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2303-6.
 91. Siman-Tov R, Ankri S. Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2003; 89: 146-9.
 92. Acevedo JA, Pacheco-Yepez J, Serrano-Luna J, Espinosa-Cantella M, Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amebic liver abscess: *in vivo* localization of TNF-alpha. *Arch Med Res* 2000; 31: S98-S100.
 93. Pérez-Fuentes R, del Carmen Sanche M, Velazquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Tala-mas-Rohana P. Increased nitric oxide levels in patients with acute intestinal amebiasis. *Arch Med Res* 2000; 31: S87-S8.
 94. Hernández-Campos ME, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V, et al. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. *Exp Parasitol* 2003; 104: 87-95.
 95. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis Calmette-Guerin bacillus* (BCG). Macrophages regulate the susceptibility through cytokine network and the induction of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1995; 155: 2057-66.
 96. Darrah PA, Hondalus MK, Chen Q, Ischiropoulos H, Mosser DM. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infect Immun* 2000; 68: 3587-93.
 97. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol* 2001; 23: 463-71.
 98. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol* 2005; 27: 37-43.
 99. Morán P, Rico G, Ramiro M, et al. Defective production of reactive oxygen intermediates (ROI) in a patient with recurrent amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 632-5.

- - - -

Anyone who has had the misfortune to go, needing immediate attention, to the emergency room of a modern hospital, will be familiar with the ugly face that high-technology medicine presents to the patient. The long wait before anything happens, the filling out of forms, the repetitive answering of questions, the battery of routine chemical and physical tests carried out by masked technicians, and finally the abbreviated contact with the physician. The thing the patient needs most, and the thing hardest to find, is personal attention.

Cualquiera que haya tenido la mala suerte de ir, necesitando atención inmediata, a la sala de emergencia de un hospital moderno, estará familiarizado con la fea cara que la medicina de alta tecnología presenta al paciente. La larga espera antes de que pase nada, el llenado de formularios, la respuesta repetitiva de preguntas, la batería de exámenes físicos y químicos de rutina hechos por técnicos enmascarados, y finalmente, el abreviado contacto con el médico. Lo que el paciente más necesita y lo más difícil de encontrar, es la atención personal.

Freeman J. Dyson

The sun, the genome, and the internet: tools of scientific revolutions.
Oxford: Oxford United Press, 1999, p 56