



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Estudios Superiores  
‘CUAUTITLAN’**

**RESPUESTA INMUNE HUMORAL LOCAL EN  
INTESTINO DE RATA CONTRA ANTIGENO  
SOLUBLE DE Entamoeba histolytica CEPA HK9**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**PATRICIA EUGENIA ANDRADE HERNANDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## I N D I C E

I.	I N T R O D U C C I O N . . . . .	1
II.	P L A N T E A M I E N T O D E L P R O B L E M A . . . . .	6
III.	O B J E T I V O S . . . . .	8
IV.	M A T E R I A L Y M E T O D O S . . . . .	9
V.	P R O T O C O L O D E I N O C U L A C I O N . . . . .	16
VI.	R E S U L T A D O S . . . . .	18
VII.	D I S C U S I O N . . . . .	33
VIII.	C O N C L U S I O N E S . . . . .	36
IX.	B I B L I O G R A F I A . . . . .	39

## ABREVIATURAS

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
rpm	Revoluciones por minuto.
SSB	Solución salina balanceada.
M	Molar.
mM	Milimolar.
CPA	Células productoras de anticuerpos.
lt	Litro .
ml	Mililitro.
gr	Gramos.
mg	Miligramos.
ug	Microgramos.
ul	Microlitros.
PP	Placas de Peyer.
GLN	Ganglio linfático mesentérico.
AgC	Extracto crudo de amiba.
LPS	Lipopolisacárido de amiba.
PMN	Células polimorfonucleares.

## I. INTRODUCCION.

La amibiasis es una enfermedad producida por infección del protozoario Entamoeba histolytica. Es uno de los problemas mayores de salud en muchos países subdesarrollados. Esta infección afecta principalmente poblaciones que viven en malas condiciones de sanidad y falta de una adecuada educación en higiene (1).

Un gran número de individuos son portadores de quistes de E. histolytica sin que presenten una sintomatología atribuible a éste parásito. Por otra parte, la amibiasis intestinal puede ser benigna o severa. En la forma benigna, existe diarrea y disentería aguda, mientras que la forma severa comprende colitis amibiana, ameboma del colon y apendicitis amibiana. En México, esta forma de amibiasis que afecta el colon tiene una tasa de mortalidad que varía desde un 20 por ciento hasta un 54 por ciento y es 10 veces menos frecuente que los abscesos hepáticos amibianos.

Diversos estudios han mostrado que la amibiasis es endémica en México ya que los anticuerpos contra E. histolytica se presentan en personas de todas las edades, con una predominancia en niños. En áreas donde la frecuencia de la amibiasis es alta, existen individuos aparentemente sanos con títulos de anticuerpos similares a los de pacientes con amibiasis invasiva (2).

Entamoeba histolytica es un parásito de distribución mundial. Se pueden encontrar dos formas del parásito en las evacuaciones humanas: a) quistes, a través de los cuales se puede transmitir la infección por la vía oral-fecal y b) trofozoitos, que se encuentran en las heces líquidas durante la disentería amibiana. La multiplicación de los trofozoitos ocurre por fisión binaria. Se derivan de 4 a 8 trofozoitos de cada quiste después de que su cápsula de quitina ha sido digerida. Los trofozoitos móviles residen en el fluido de las criptas del ciego e intestino delgado, de dónde

pueden invadir la mucosa intestinal y eventualmente alcanzar el torrente sanguíneo y causar lesiones extraintestinales (3).

La característica más notable de E. histolytica es su capacidad de invadir y lesionar tejidos. La primera etapa de invasión es la adherencia de los trofozoitos a las células epiteliales, la cual está mediada en parte por una lectina presente en la membrana de la amiba, cuyo receptor en la célula epitelial puede contener residuos de N-acetilglucosamina (4,5). El efecto citotóxico ejercido por los trofozoitos viables adheridos a las células blanco, se puede explicar tanto por la producción de enzimas con actividad colagenolítica (6,7), como por la producción de toxinas (8). La segunda etapa es la fagocitosis activa y digestión de las células ingeridas, dando por resultado final la destrucción del tejido (9).

Estos fenómenos de invasión de la amiba sobre las células intestinales contrasta con la aparente falta de respuesta defensiva de la células del hospedero. En general debe ser asumido que en el intestino del hombre una respuesta protectora de anticuerpos puede ser inducida como resultado de la exposición de largos lapsos de tiempo con el parásito (10).

La mucosa gastrointestinal es la primer línea de defensa contra muchos microorganismos tanto protozoarios como bacterias así como otros antígenos. El estudio de la inmunidad de la mucosa ha alcanzado importancia en años recientes con la identificación de un sistema inmune local en las superficies mucosas (11).

Las células inmunocompetentes del tracto gastrointestinal: macrófagos y linfocitos; responsables de la respuesta inmune local, se distribuyen a lo largo de toda la pared intestinal a nivel de mucosa: linfocitos intraepiteliales y de lámina propia; y en forma de agregados linfoides cubiertos por un linfoepitelio especializado denominados placas de Peyer. Las placas de Peyer son capaces de iniciar una respuesta inmune; a su vez, los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia son capaces de producir anticuerpos y proporcionar inmunidad mediada por células (12,13).

Utilizando diferentes métodos para la obtención, purificación e identificación de linfocitos de mucosa intestinal, se han llegado a conocer las características morfológicas y funcionales de algunas poblaciones celulares linfoides localizadas en la mucosa; como son los linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales (NK), macrófagos, células basófilas y eosinófilos.

Los linfocitos B constituyen el 32 por ciento de las células mononucleares. Los precursores de linfocitos B se encuentran principalmente en placas de Peyer, dónde se lleva a cabo la estimulación de estos linfocitos que migran después a ganglio linfático mesentérico de ahí a conducto torácico, a sangre y posteriormente a lámina propia de mucosa intestinal, dónde se establecen como células productoras de anticuerpos. No está bien establecido la fase en la cual los linfocitos precursores maduran. Las placas de Peyer contienen todos los elementos celulares necesarios para una respuesta inmune: células B, T y células accesorias (macrófagos y células dendríticas), pero no son sitios importantes de síntesis de inmunoglobulinas (14,15).

Por otra parte, los linfocitos T se encuentran en un 55 por ciento en la mucosa intestinal, siendo más abundantes en el epitelio del intestino. Los estudios de movimiento linfocitario han mostrado, que como en el caso de las células B, los linfocitos T de los ganglios linfáticos mesentéricos se distribuyen finalmente en la mucosa intestinal. Se ha confirmado que la vía de tránsito de las células T es a partir de placas de Peyer ó ganglio linfático mesentérico pasando por conducto torácico, circulación sistémica y finalmente regresan a sitios intraepiteliales en la mucosa del intestino (16,17,18). Los linfocitos T tienen como función intervenir en la regulación de la síntesis de anticuerpos, es decir, interaccionan con la célula B. La inmunoregulación en la producción de anticuerpos en mucosa intestinal esta dada por los linfocitos T supresores y

y linfocitos T cooperadores. Otra subpoblación de los linfocitos T corres-  
ponden a los linfocitos granulosos, los cuales se caracterizan por ejercer  
citotoxicidad espontánea ó natural contra células tumorales (19). La activi-  
dad citotóxica espontánea de estos linfocitos es aumentada en presencia de  
interferón. En base a esto se propone que estos linfocitos intervienen en -  
la defensa contra infecciones virales que dañan las células epiteliales del  
individuo (20,21), además de que parecen tener un papel importante en la -  
actividad antibacteriana (22). En infecciones por helmintos podrían tener -  
un papel importante en la destrucción y rechazo de los mismos, pues se en-  
cuentran aumentados considerablemente ocho días después del estímulo anti -  
génico.

Se ha mostrado también la presencia de macrófagos en la mucosa intesti-  
nal de cobayo, rata, ratón y humano. Se localizan principalmente en lámina-  
propia y placas de Peyer, y constituyen del 7 al 10 por ciento de la pobla-  
ción (14,24,25). En placas de Peyer procesan el antígeno, en cambio a nivel  
de lámina propia absorben nutrientes. Presentan varias funciones: secreción  
de enzimas, mediadores químicos y factores de actividad diversa. Se propone  
que podrían actuar localmente modulando la producción de inmunoglobulinas -  
en respuesta a un antígeno determinado. Durante la infestación por parási -  
tos, los macrófagos producen prostaglandina E, que interviene en la elimina-  
ción de los mismos. Durante las infecciones por virus producen interferón.  
A nivel de intestino delgado intervienen ingiriendo sustancias carcinogéni-  
cas, por lo que se ha postulado como factor que disminuye la frecuencia de  
tumores a éste nivel en comparación con el intestino grueso (26).

Entre los otros tipos de células localizadas en la mucosa intestinal-  
se encuentran los mastocitos ó células basófilas y los eosinófilos. Los -  
mastocitos de mucosa intestinal difieren histológicamente de otros sitios-  
por su contenido en mucopolisacáridos, además contienen IgE dentro y en su  
superficie. Dependen de la actividad de células T para su diferenciación y



proliferación in vitro. No se ha identificado bien el origen de los mastocitos intestinales. Se sabe que los mastocitos de mucosa intestinal pasan a ganglio linfático mesentérico (dónde adquieren receptores para IgE), posteriormente pasan a conducto torácico y después por vía sanguínea regresan a mucosa intestinal (28). En ratas infestadas con nemátodos el aumento de mastocitos en intestino se relaciona con la presencia de linfocitos T específicos a los helmintos circulando en linfa de conducto torácico (27). Se sugiere la existencia de un mecanismo local en mucosa intestinal para el rechazo de helmintos. El contacto directo del parásito con linfocitos--T produce la liberación de factores químicos, que a su vez estimulan la maduración de los mastocitos. Cuando ocurre el rechazo de parásitos se inhibe la producción de estos factores y por lo tanto la maduración de mastocitos (28,29).

Por último, los eosinófilos se encuentran en un 3 a 8 por ciento en la mucosa intestinal. Se originan en médula ósea, dónde se han descrito dos poblaciones precursoras, una que al estimularse origina eosinófilos circulantes maduros y otra que da lugar a células precursoras que se dividen poco y llegan a tejidos para diferenciarse en células maduras, esto ocurre principalmente en mucosas (30). Los eosinófilos contienen depósitos de: peroxidasa, proteínas básicas ricas en arginina, arilsulfatasa, histaminasa y otras proteínas con actividad tóxica a parásitos (31). Estudios in vivo demuestran que los eosinófilos se concentran en los sitios de infestación. Los eosinófilos presentan receptores para la fracción Fc y complemento. Se ha descrito también una acción citotóxica de sus gránulos sobre bacterias y células tumorales (32).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los mecanismos de defensa inmune contra la infección por Entamoeba histolytica no han sido completamente caracterizados, principalmente la respuesta inmune local. Los mecanismos que más se han estudiado son las respuestas inmunes sistémicas (33). Debido a que la mucosa intestinal es una barrera de defensa muy importante contra el parásito, el estudio de la respuesta inmune local contra Entamoeba histolytica es de gran relevancia.

Recientes investigaciones han sugerido la existencia de una reacción inmunológica local en la amibiasis invasora como los coproanticuerpos anti-amiba establecidos en el 80 por ciento de los casos con disentería amibiana (34).

Por otra parte, la presencia de anticuerpos de la clase IgA secretoria anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas intracecalmente con trofozoitos ha sido reportada (35). Quizá la secreción intestinal de IgA pudiese contribuir en la defensa local contra E. histolytica ya que ésta inmoglobulina inhibe la adsorción intestinal de antígenos lumbinales y su papel en la defensa local contra enterobacterias, particularmente contra Vibrio cholerae y Escherichia coli enterotóxica ha sido observada (36,37,38).

A pesar de que la inmoglobulina IgA predomina en secreciones externas, las inmoglobulinas de la clase IgM, IgG e IgE también están presentes en la mucosa gastrointestinal y juegan un papel muy importante en términos de producción local de anticuerpos (39). Algunos investigadores han mostrado elegantemente que la IgG intestinal de rata también es efectiva en la prevención de antígenos lumbinales. Se sabe que el ganglio linfático mesentérico es una fuente de células precursoras de IgG e IgM, las cuales se localizan en lámina propia intestinal. La IgM es transportada a través de las células epiteliales intestinales de la misma manera que la IgA dimerica (40,41,42).

## H I P O T E S I S:

En base a evidencias de un sistema inmunológico en la mucosa gastrointestinal y a la presencia de anticuerpos en las secreciones intestinales, es posible obtener una respuesta inmune local contra antígenos ambientales mediante la inoculación de los mismos en el intestino.

### III. OBJETIVOS.

1. Establecer la presencia de células productoras de anticuerpos en mucosa intestinal de ratas inmunizadas por vía local e intraperitoneal con antígenos amibianos.
2. Comparación de la respuesta inmune contra antígenos amibianos en ratas inmunizadas por vía intraperitoneal y por vía local.
3. Estudiar la cinética de aparición de células productoras de anticuerpos contra antígenos amibianos en mucosa intestinal, bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer.

#### IV. MATERIAL Y METODOS.

##### 1. ANIMALES.

Se utilizan ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de dos a tres meses de edad.

##### 2. PREPARACION DE ANTIGENO DE AMIBA.

Las amibas son crecidas en cultivo axénico por la técnica de Diamond- (43). Después de 72 horas los organismos se resuspenden y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos para concentrarlos. El sobrenadante es descartado y el paquete se resuspende en solución salina 0.15 M. Las amibas se lavan seis veces por centrifugación a 1200 rpm, 5 minutos. Se resuspenden y se determina el número de células por conteo hemocitométrico. Una suspensión de aproximadamente  $2 \times 10^7$  células/ml es sonicada en baño frío durante dos minutos a 150 watts en un sonicador Ultratip Labsonic System. La suspensión sonicada se centrifuga durante 30 minutos a 2500 rpm, 4°C. El sobrenadante se dializa contra solución amortiguadora de fosfatos pH: 7.2 (PBS) por 16 horas a 4 °C. Este dializado se centrifuga durante 30 minutos a 2500 rpm a 4°C y el sedimento es descartado.

Se realiza un determinación de proteínas al extracto, por el método de Lowry (44). El extracto crudo se coloca en alícuotas de 1 ml y se guarda en congelación.

Un segundo antígeno utilizado, más puro, fué un lipopolisacárido amibiano de la misma cepa de trofozoitos, utilizando el método de fenol-agua (45).

##### 3. OBTENCION DE LINFOCITOS.

Las ratas son anestesiadas con eter-etílico y el intestino delgado, bazo, placas de peyer y ganglios linfáticos mesentéricos son removidos y colocados por separado en frascos estériles que contienen solución salina balanceada con antibióticos (SSB).

### 3.1 OBTENCION DE LINFOCITOS DE INTESTINO

Los linfocitos de intestino se obtienen de acuerdo a la técnica de Babette (46). El intestino se extrae y coloca en una caja petri procediendo a lavarlo con PBS para remover su contenido. La luz intestinal se llena con PBS que contiene Dithiotreitol 1 mM (Sigma), se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación leve, para eliminar el moco adherente. El tejido se lava tres veces con PBS frío y se incuba a 37°C 10 minutos con solución de citrato de sodio pH: 7.4 con agitación leve. Este proceso de incubación con la solución de citratos se repite dos veces más para eliminar las células epiteliales. Posteriormente se lava el lumen intestinal con SSB fría y se anuda el intestino por los extremos procediendo a frotarlo manualmente, para obtener las células linfoides. La suspensión intestinal es colectada, repitiéndose tres veces este procedimiento. Las suspensiones totales se decantan para eliminar los fragmentos gruesos y se concentran por centrifugación a 2500 rpm, 10 minutos, 4°C. Las células se lavan tres veces por centrifugación a 2500 rpm, 10 minutos, 4°C y se resuspenden en SSB que contiene metronidazol (solución inyectable Vertisal) incubando la suspensión a 37°C, 30 minutos para eliminar los parásitos existentes. Las células se lavan tres veces con SSB fría.

Para determinar si el metronidazol no afecta la función de las células obtenidas de intestino, se realizan ensayos de células productoras de anticuerpos (CPA), utilizando células de bazo de ratas inmunizadas con eritrocitos de carnero e incubadas con diferentes concentraciones del fármaco como se muestra en la gráfica No. 1. Las ratas se mantienen (ocho días antes de sacrificarlas) con ingestión de una suspensión oral de metronidazol (flagyl) colocada en el agua, para disminuir el número de parásitos contaminantes.

### 3.2 OBTENCION DE LINFOCITOS DE BAZO.

Los linfocitos de bazo se obtienen por el procedimiento descrito por Ford W. (47). El bazo se corta en pequeños trozos de aproximadamente 2-3 mm con tijeras afiladas. Estos fragmentos son pasados a través de una malla de plástico (12 x 0.3 mm alambres/cm) con ayuda de un émbolo de jeringa, y la suspensión se colecta en una caja petri que contiene 10 ml de SSB. La suspensión se coloca en tubos y se deja decantar por tres minutos. El sobrenadante se centrifuga a 2500 rpm para colectar las células. Posteriormente se lavan las células centrifugando a 2500 rpm, 10 minutos, 4°C; tres veces con SSB fría.

### 3.3 OBTENCION DE LINFOCITOS DE PLACAS DE PEYER.

Una vez extraído el intestino se lava con PBS frío. Cuidadosamente se cortan las placas de Peyer y se colocan en SSB fría. Después se cortan en trozos más pequeños y se hacen pasar a través de una malla de plástico (12 x 0.3 mm alambres/cm) con ayuda de un émbolo de jeringa. La suspensión obtenida se centrifuga a 2500 rpm, 10 minutos a 4°C. Se resuspenden las células en SSB con ditioneitol mM, incubando a temperatura ambiente 5 minutos, con agitación leve para eliminar el moco adherente. Las células se lavan tres veces centrifugando a 2500 rpm, 10 minutos a 4°C y se resuspenden en SSB.

### 4. CONTEO CELULAR Y DIFERENCIAL.

El número de linfocitos de intestino, bazo, placas de Peyer y ganglio linfático mesentérico se determina por conteo hemocitométrico en cámara de Neubauer, utilizando colorante cristal violeta al 0.1%.

Por otra parte, se preparan frotis de las diferentes suspensiones y se tifican con colorante de Wright para hacer un conteo diferencial de las células obtenidas, utilizando las técnicas de tinción habituales (48).

## 5. ESTIMACION DE LA VIABILIDAD CELULAR.

La viabilidad de las diferentes suspensiones obtenidas se estima de acuerdo al método descrito por Ford W. (47). Se prepara una solución al 2% de azul tripan en agua destilada y se filtra. Una parte de ésta solución se mezcla con nueve partes de la suspensión celular quedando una dilución de 0.2%. Se deja incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se llena una cámara de Neubauer con la suspensión y se procede a contar. Las células viables no se tiñen con el colorante mientras que las células no viables se tiñen de azul.

## 6. PREPARACION DE CELULAS BLANCO.

Se utilizan como células blanco eritrocitos de carnero recubiertos con el extracto crudo de amiba y el lipopolisacárido.

### a) RECUBRIMIENTO DE ERITROCITOS CON EXTRACTO CRUDO DE AMIBA.

El recubrimiento de los eritrocitos de carnero con extracto crudo de amiba se realiza de acuerdo al método descrito por Dresser (47). Los eritrocitos de carnero de Alserver se lavan tres veces con solución salina 0.15 M centrifugando a 1800 rpm, 5 minutos, 4°C. Se toman 400 ul de paquete de eritrocitos lavados y se resuspenden en 2 ml de solución salina 0.15M. Se adiciona 1ml de extracto crudo de amiba que tiene una concentración de 20 mg/ml de proteína. Por otra parte, se disuelven rápidamente 20 mg de 1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil) cloruro de carbodiimida (Merck) en 1ml de solución salina 0.15M e inmediatamente se adiciona a la mezcla de eritrocitos y proteína amibiana. Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente 40 minutos con agitación ocasional. Posteriormente se lavan los eritrocitos con solución salina 0.15M y se resuspenden en diluyente ( solución salina 0.15 M con 1% de albúmina sérica bovina ).

### b) RECUBRIMIENTO DE ERITROCITOS CON LIPOPOLISACARIDO DE AMIBA.

A 200 ul de eritrocitos de carnero previamente lavados se adicionan 4 ml de solución salina 0.15M y 300 ul de lipopolisacárido con una concen -



-tracción de 3mg/ml. Se mezcla e incuba a 37°C una hora, con agitación ocasional. Los eritrocitos se lavan tres veces con solución salina 0.15M y se resuspenden en solución salina con 1% de albúmina sérica bovina.

#### 6.1 HEMAGLUTINACION.

Una vez recubiertos los eritrocitos, se determina el grado de sensibilización ó recubrimiento por hemaglutinación. Se utilizan placas de microtitulación de plástico (microtiter system). En cada pozo (de una línea de 12 pozos) se colocan 25 ul de diluyente (solución salina 0.15M con ASB-1%). En el primer pozo se colocan 25 ul de suero heterólogo anti-amiba (ICN Diagnostic Products), se mezcla y se transfieren 25 ul al segundo pozo se mezcla y se transfieren 25 ul al tercer pozo y así sucesivamente hasta el pozo 12; quedando de esta forma diluciones dobles: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, y 1:4096 para el pozo 1, 2, 3.. hasta el número 12 respectivamente. Una vez realizadas las diluciones del suero, se adicionan 25 ul de eritrocitos al 0.5% previamente sensibilizados. Se incuba a temperatura ambiente por 1 hora. El título obtenido se reporta como la recíproca de la máxima dilución en la cual se observa aglutinación de los eritrocitos.

#### 7. OBTENCION DE ANTISUEROS

Se utilizan dos tipos de sueros anti-IgG y anti-IgA para el ensayo de células productoras de anticuerpos.

#### 7.1 INMUNIZACION DE CONEJOS.

Para obtener el antisuero anti-IgG de rata, se inmuniza un conejo de acuerdo al siguiente protocolo de inmunización. Se administra una primera dosis de inmunoglobulina IgG de rata en una concentración de 4mg/ml de proteína en adyuvante completo de Freund. Quince días después se administra una segunda dosis de 4mg/ml en adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente en los días 30,31,32 se administran dosis de 250, 500 y 1000 ug/ml de proteína en solución salina por vía intramuscular. El sangrado del conejo

se realiza por punción cardíaca en el día 40, para obtener el suero.

El suero anti-IgA es donado por la división de Inmunquímica del Instituto Mexicano del Seguro Social, por técnicas ya reportadas (49).

## 7.2 PREPARACION DE SUERO ANTI-IgG.

Una vez obtenido el suero de conejo anti-IgG de rata se adsorbe en una columna de IgG de rata Sepharosa 4B. Se colocan 5 ml del suero en la columna y se deja adsorber por 30 minutos. Los anticuerpos anti-IgG quedan pegados a la columna. Después se lava con PBS cinco veces para retirar todo aquello que no se pega a la columna y se eluye con amortiguador glicina-HCl (Sigma) con aproximadamente 25 ml, obteniéndose el anticuerpo anti-IgG. Las fracciones eluidas se colectan en tubos que contienen Trizma.Base (Sigma). La homogeneidad del suero anti-IgG de rata se determina por inmunoelectroforesis.

## 8. ENSAYO DE CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS.

Este ensayo se realiza por el método de Cunningham (47), mediante el cual se detectan células productoras de anticuerpos (CPA).

### 8.1 TITULACION DE SUEROS ANTI-IgG y ANTI-IgA.

Para revelar las células que producen anticuerpos de la clase IgG e IgA se utilizan los sueros anti-IgG y anti-IgA en una dilución óptima. Para encontrar esta dilución, se inmunizan ratas con eritrocitos de carnero al 50 por ciento por vía intraperitoneal. Después de 7 días post-inmunización se sacrifican las ratas y se utilizan las células de bazo. Se realiza la prueba de Cunningham utilizando los linfocitos de bazo, eritrocitos de carnero como células blanco y diferentes diluciones de antisuero anti-IgG y anti-IgA como se muestra en las gráficas No. 2 y No. 3.

### 8.2 PREPARACION DE CAMARAS PARA LA PRUEBA DE CUNNINGHAM.

Las cámaras de incubación se preparan con portaobjetos de 75x25mm, previamente desgrasados con mezcla crómica y perfectamente enjuagados. Sobre -

los portaobjetos se colocan tres tiras delgadas (aproximadamente 5mm de ancho) de cinta adhesiva de ambas caras (Tesafix No. 963) que dividen dos áreas de aproximadamente igual superficie. Un segundo portaobjetos se coloca sobre el primero quedando unidos por las cintas. Cada cámara tiene un volumen de aproximadamente 100 ul.

Por otra parte, se hace una mezcla en placas de microtitulación que contiene lo siguiente:

- a) 50 ul de SSB.
- b) 100 ul de suspensión celular de aproximadamente  $4-5 \times 10^5$  células en cada pozo (tres pozos para cada inmunoglobulina IgM, IgG e IgA)
- c) 20 ul de una suspensión de eritrocitos de carnero al 20% recubiertos con el extracto crudo de amiba y con el lipopolisacárido.
- d) 20 ul de suero de cobayo (como fuente de complemento) diluido 1:2 en SSB y previamente adsorbido con eritrocitos de carnero.
- e) 20 ul de suero anti-IgG y anti-IgA a la dilución óptima.

La mezcla se coloca con una pipeta de 100 ul en cada cámara y éstas — se sellan con parafina. Las cámaras se incuban horizontalmente a 37°C por 60 minutos. Después de una hora de incubación se cuentan las placas hemolíticas formadas.

## V. PROTOCOLO DE INOCULACION

### 1. INOCULACION EN PLACAS DE PEYER.

Se inoculan tres grupos de ratas cada quince días con un total de tres inoculaciones. El inóculo es de extracto de amiba 0.2ml/rata, con una concentración de proteína amibiana conocida, como se muestra en la tabla -

No. 1.

GRUPO	No. DE RATAS	INOCULACION	PROTEINA AMIBIANA (ng/ml)
I	15	PRIMERA	5.0
		SEGUNDA	2.5
		TERCERA	1.5
II	15	PRIMERA	10.0
		SEGUNDA	5.0
		TERCERA	3.0
III	20	PRIMERA	30.0
		SEGUNDA	10.0
		TERCERA	5.0
GRUPO CONTROL	20	PRIMERA	SOLUCION SALINA
		SEGUNDA	SOLUCION SALINA

TABLA 1. Protocolo de inoculación de ratas en placas de peyer con extracto crudo de amibas.

## 2. INOCULACION POR VIA INTRAPERITONEAL.

Se inoculara un grupo de ratas con extracto crudo de amiba en una con -  
centración protéica de 5mg/ml durante cuatro meses como se muestra en la -  
tabla No. 2.

INOCULACION	DIA	PROTEINA AMIBIANA 5mg/ml (ml)
PRIMERA	0	0.3 ml
SEGUNDA	7	0.3 ml
TERCERA	15	0.3 ml
CUARTA	30	0.2 ml
QUINTA	60	0.2 ml
SEXTA	90	0.2 ml
SEPTIMA	120	0.2 ml

TABLA 2. Protocolo de inoculación de ratas por vía intraperitoneal  
con extracto crudo de amiba.

## VI. RESULTADOS.

### 1. OBTENCION DE LINFOCITOS.

a) La tabla No. 3 muestra los resultados de la viabilidad y el número de linfocitos para cada tipo de compartimento: intestino, placas de Peyer, ganglio linfático mesentérico y bazo.

TIPO DE CELULAS	VIABILIDAD	LINFOCITOS/ml	
INTESTINO:	89± 5.6%	1.9X10 <sup>5</sup>	9.8 X10 <sup>4</sup>
PP	90 2.1%	2.1X10 <sup>6</sup>	1.3 X10 <sup>5</sup>
GLM	99 1.5%	6.0X10 <sup>6</sup>	3.2 X10 <sup>5</sup>
BAZO	96 2.7%	1.1X10 <sup>6</sup>	1.2 X10 <sup>5</sup>

TABLA No. 3. Viabilidad y número de linfocitos obtenidos para cada compartimento.

b) La tabla No. 4 muestra los resultados del conteo diferencial realizado a las suspensiones celulares obtenidas de cada compartimento: intestino, placas de Peyer, ganglio linfático mesentérico y bazo.

	TIPO DE CELULAS							
	INTESTINO		PP		GLM		BAZO	
LINFOCITOS	94	2.9%	97	1.1%	98	2.3%	85	1.7%
MONOCITOS	1.8	1.2%	2.2	1.0%	1.5	1.2%	5.5	1.6%
PMN	2.0	1.4%	-		-		4.5	2.2%
CELULAS PLASMATICAS	-		-		-		4.3	2.5%
CELULAS EPITELIALES	3%		2%					

**TABLA No.4.** Conteo diferencial de las suspensiones celulares obtenidas para cada compartimento.

La gráfica 1, muestra que no existe ninguna alteración en la función de las células cuando éstas se incuban en SSB con metronidazol. Las células se obtienen de ratas inmunizadas con eritrocitos de carnero al 50%. Como células control se utiliza el mismo sistema, pero en este caso las células son incubadas con SSB sin metronidazol.

## **2. HEMAGLUTINACION.**

Las eritrocitos de carnero sensibilizados con extracto crudo de amiba y lipopolisacárido dan un título de 128 y 512 respectivamente.

## **3. TITULACION DE ANTISUEROS**

La dilución óptima que muestran los antisueros para revelar las inmunoglobulinas de las clases IgG e IgA se observan en las gráficas No. 2 y No. 3.

#### 4. CELULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS.

Los ensayos de células productoras de anticuerpos (CPA) se realizan antes de inocular a las ratas y después de la primera, segunda y tercera inoculación en placas de Peyer en los días señalados en las gráficas para cada experimento. Cada ensayo se realiza por duplicado. Las lecturas de las placas hemolíticas se hace por quintuplicado para cada clase de inmunoglobulina.

4.1 La gráfica No. 4, muestra el primer grupo de ratas en el cual las células linfoides de intestino y bazo son presentadas a eritrocitos de carnero sensibilizados con extracto crudo de amiba.

4.2 La gráfica No. 5, muestra el segundo grupo de ratas. En éste caso las células linfoides de intestino y bazo son presentadas a eritrocitos de carnero recubiertos con lipopolisacárido amibiano.

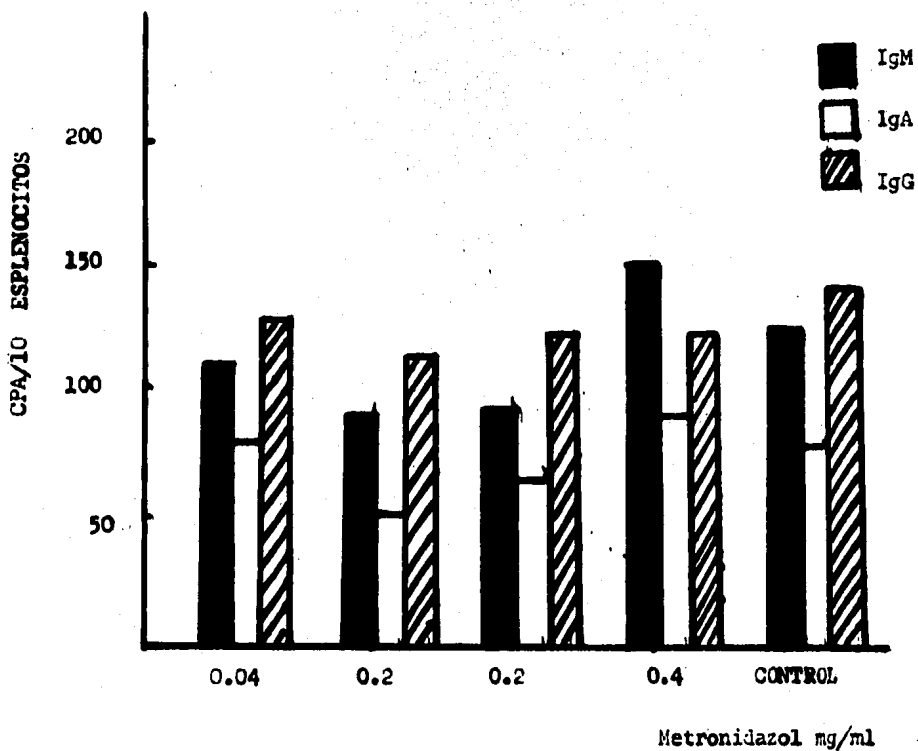
4.3 El tercer grupo de ratas que se maneja involucra la utilización de los dos tipos de antígenos, sensibilización con extracto crudo y lipopolisacárido amibiano, como se observa en las gráficas No. 6,7,8,9.

4.4 Las tablas No. 5 y No. 6 muestran los resultados de CPA realizados en placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos

4.5 En las tablas No. 7 y No. 8 se observan los resultados del grupo de ratas inmunizadas por vía intraperitoneal. Las células de intestino y bazo son presentadas a eritrocitos de carnero recubiertos con extracto crudo y lipopolisacárido de amiba.

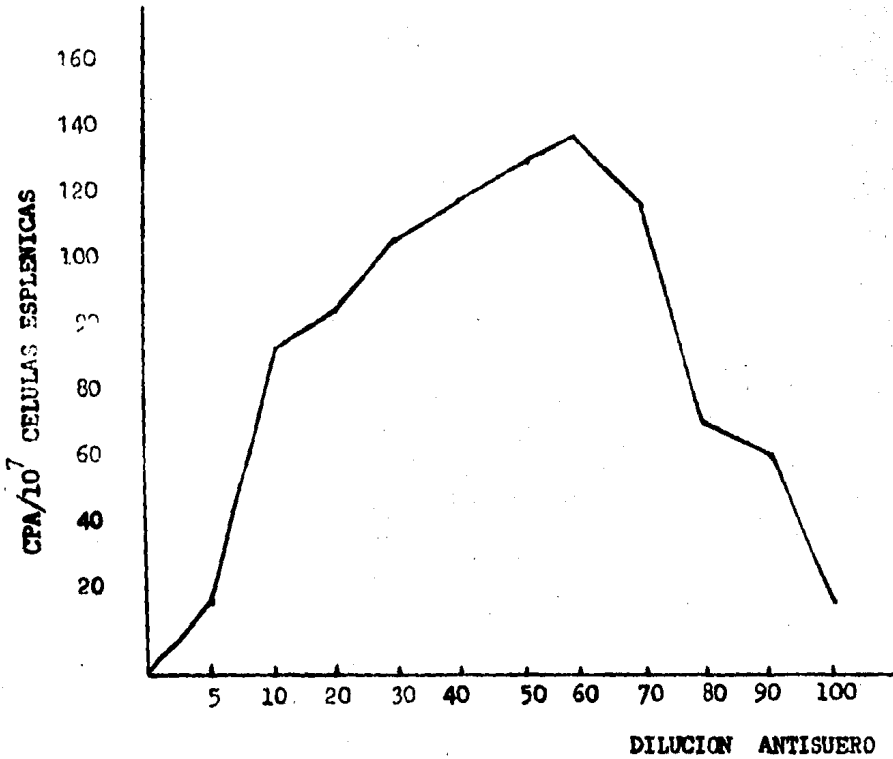
4.6 El grupo de ratas control fué trabajado en las mismas condiciones que las ratas problema. En éste caso se inoculó solución salina estéril e en las placas de Peyer y se siguió el mismo procedimiento que para las ratas problema. Los resultados del grupo control se muestran en las tablas No. 9 y No. 10.





**GRAFICA 1. Células incubadas a 37°C durante 1 hr. con diferentes concentraciones de metronidazol. Para la concentración de 0.2 mg/ml se incuba por 30 min. y 1 hr. respectivamente.**

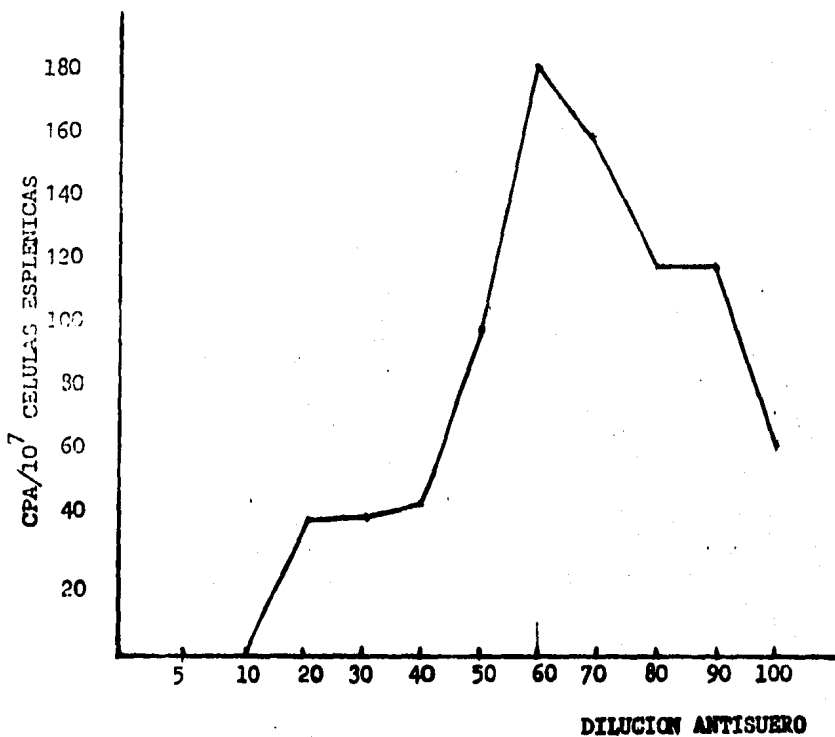
GRAFICA No. 2  
TITULACION DE SUERO ANTI-IgG



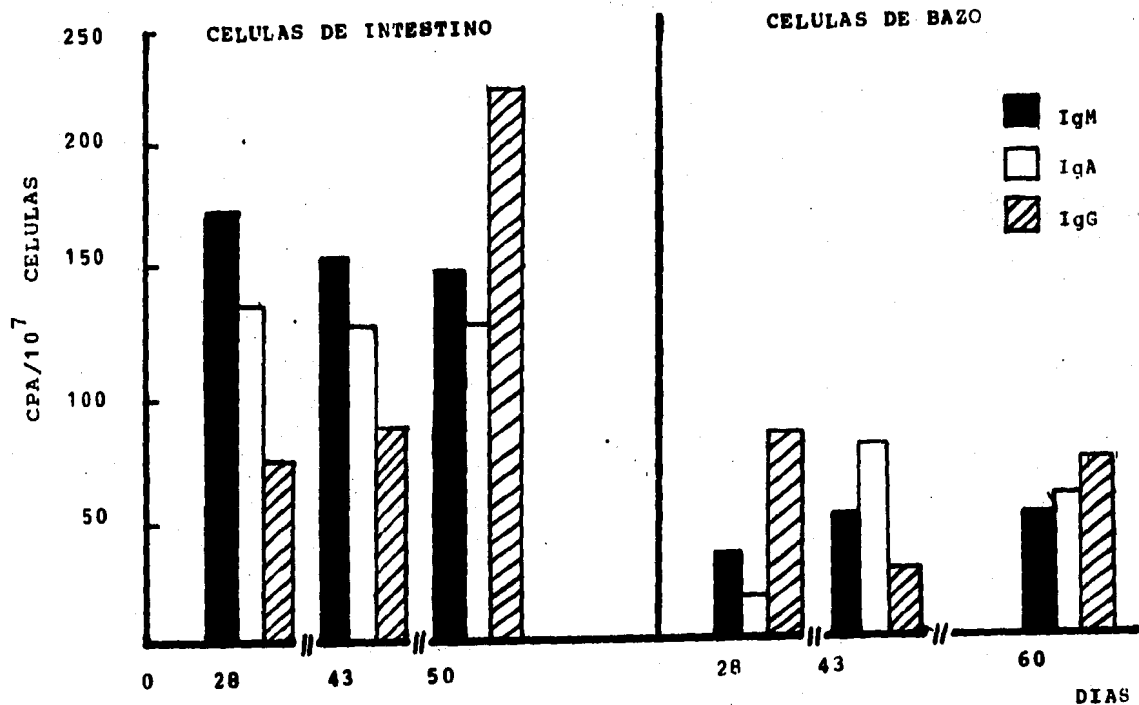
Nota: se utilizan como células blanco eritrocitos de carnero y células de bazo de ratas inmunizadas con eritrocitos. Cada punto representa el promedio de tres ensayos.

En las abscisas se pone la recíproca de la dilución del an tisuelo.

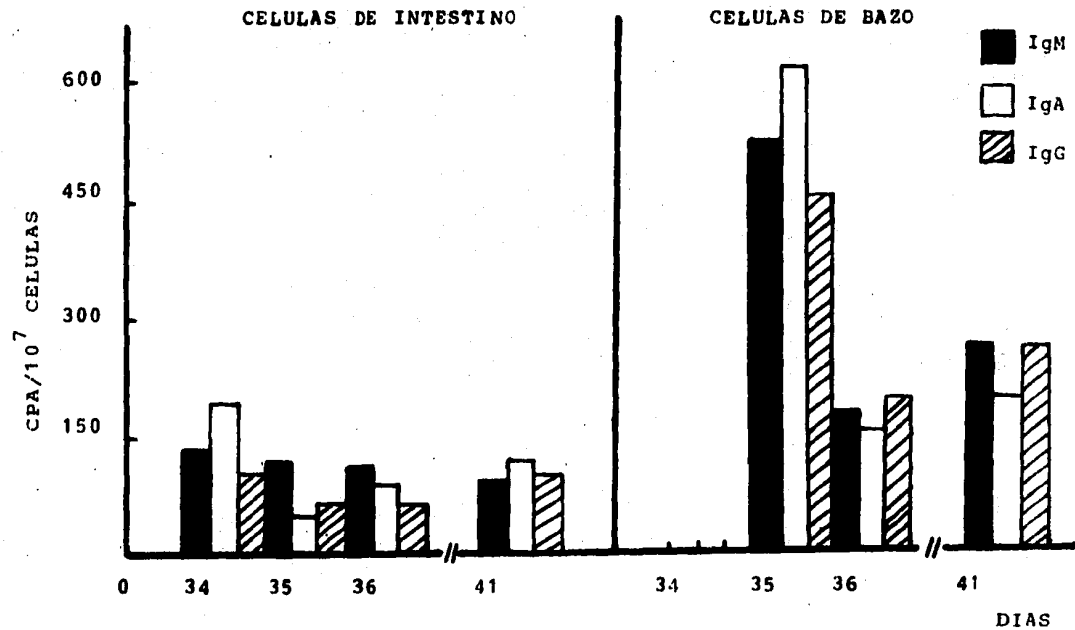
GRAFICA No. 3  
TITULACION DE SUERO ANTI-IgA



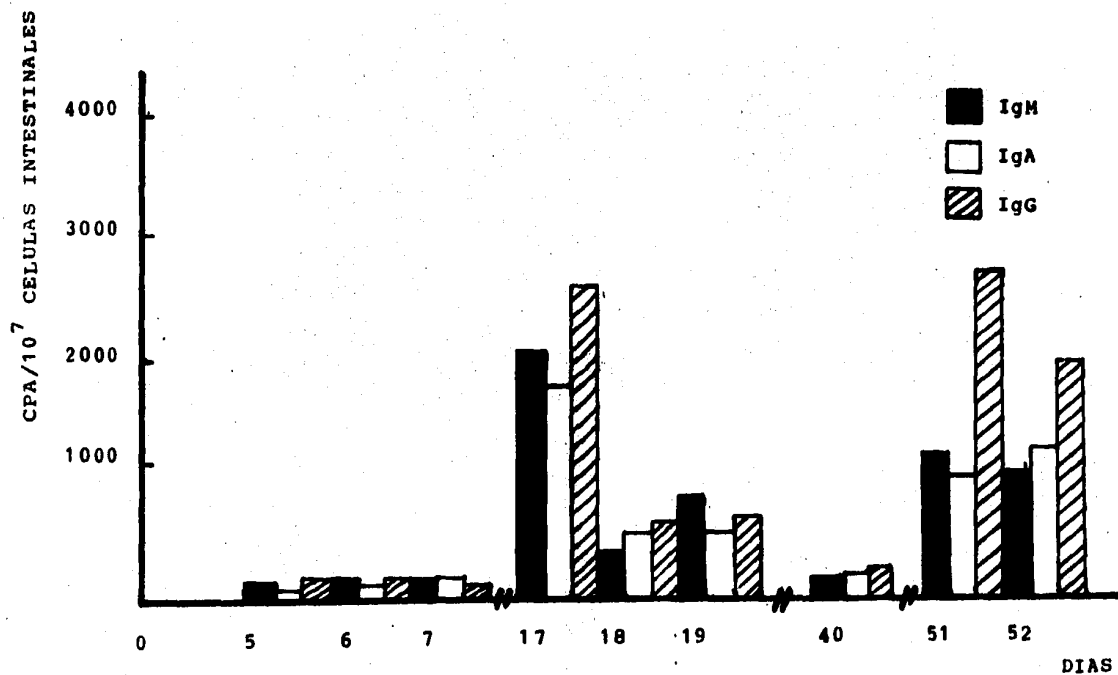
Nota: Se utilizan como células blanco eritrocitos de carnero y células de base de ratas inmunizadas con eritrocitos. Cada punto representa el promedio de tres ensayos.  
En las abscisas se pone la recíproca de la dilución del anti-suero.



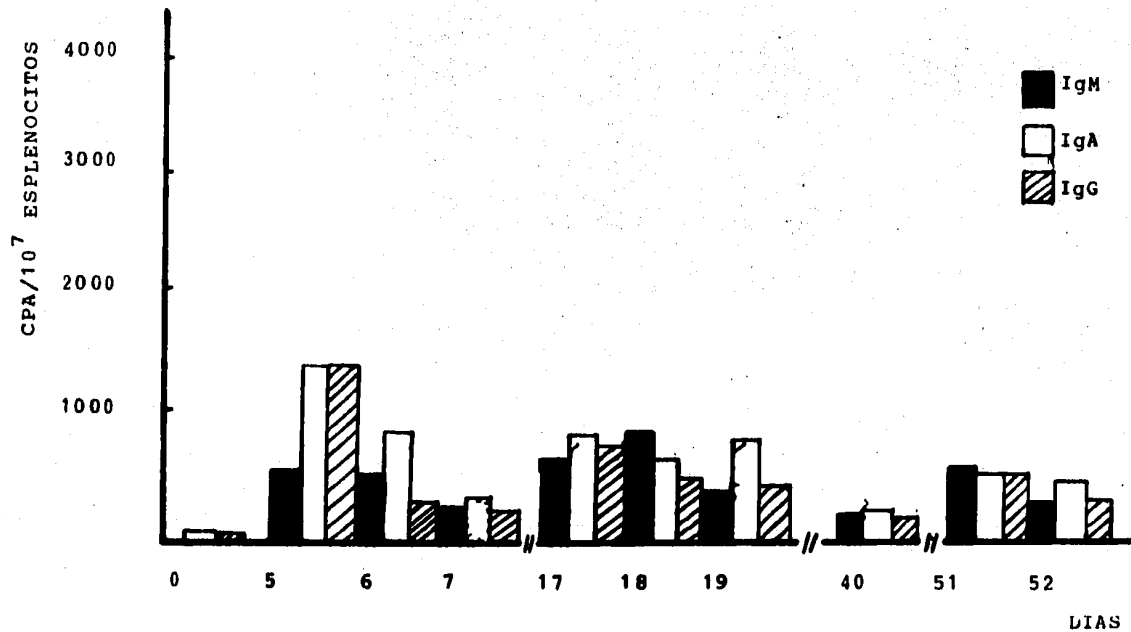
GRAFICA 4. Respuesta inmune contra extracto total de amiba. Primera inoculación, día 0; segunda inoculación, día 22; tercera inoculación, día 38.



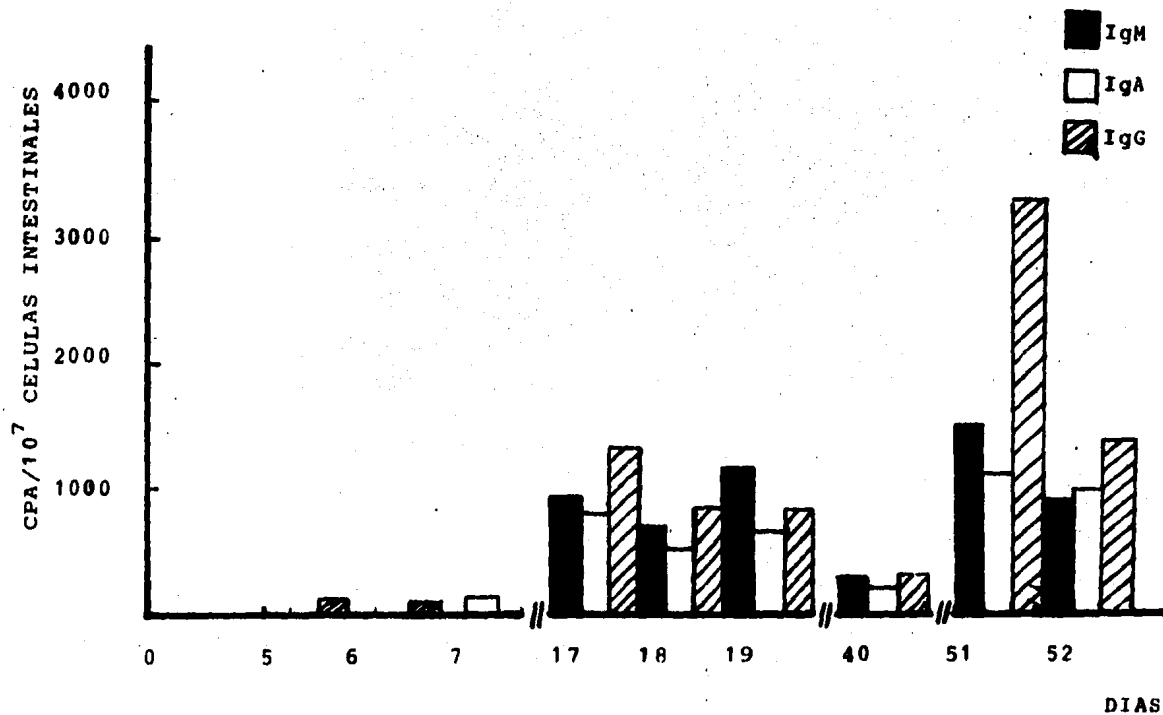
GRAFICA 5. Respuesta inmune contra lipopolisacárido de amiba.  
Primera inoculación, día 0; segunda inoculación,  
día 13, tercera inoculación, día 27.



GRAFICA 6. Respuesta inmune contra lipopolisacrido de amiba. Primera inoculación día 0; segunda inoculación día 13; tercera inoculación día 47.

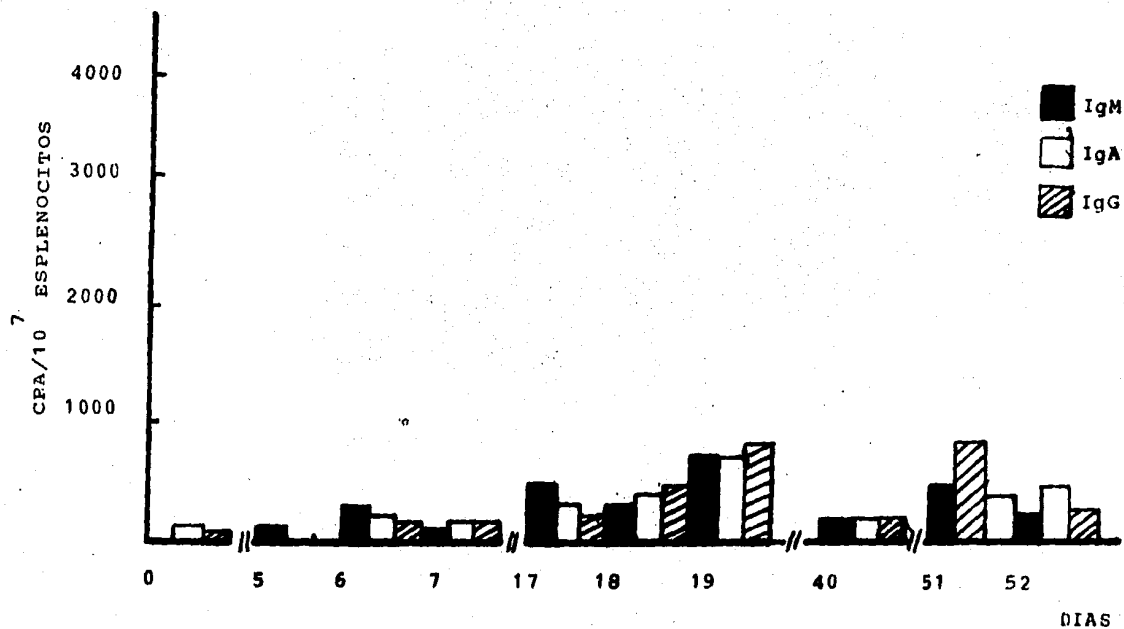


GRAFICA 7. Respuesta inmune contra lipopolisacárido deamiba. Primera inoculación día 0; segunda inoculación día 13; tercera inoculación día 47.



GRAFICA 8. Respuesta inmune contra extracto total de amiba. Primera inoculación, día 0; segunda inoculación, día 13; tercera inoculación, día 47.





GRAFICA 9. Respuesta inmune contra extracto total de amiba. Primera inoculación, día 0; segunda inoculación, día 13; tercera inoculación, día 47.

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/10 <sup>7</sup> CELULAS			
		ENSAYO DIA POST-INOCULACION			
		7	18	40	52
AgC	IgM	0	0	0	0
	IgA	0	33	0	0
	IgG	0	30	0	0
LPS	IgM	0	0	0	0
	IgA	10	0	0	0
	IgG	0	0	0	0

**TABLA No. 5. Grupo de ratas inoculadas en placas de Peyer. Respuesta inmune medida en células de placas de Peyer.**

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/ 10 <sup>7</sup> CELULAS			
		ENSAYO DIA POST INOCULACION			
		7	18	40	52
AgC	IgM	0	0	0	0
	IgA	0	0	0	0
	IgG	15	0	0	0
LPS	IgM	0	0	0	0
	IgA	0	0	0	0
	IgG	0	20	0	0

**TABLA No. 6. Grupo de ratas inoculadas en placas de Peyer. Respuesta inmune medida en células de ganglio linfático mesentérico.**

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/ 10 <sup>7</sup> CELULAS		
		(1)	(2)	(3)
AgC	IgM	53	563	570
	IgA	71	512	286
	IgG	62	544	490
LPS	IgM	71	294	285
	IgA	129	448	372
	IgG	123	993	405

**TABLA No. 7. Resultados de ratas inmunizadas por vía intraperitoneal. Respuesta inmune medida en células de intestino.**

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/ 10 <sup>7</sup> CELULAS		
		(1)	(2)	(3)
AgC	IgM	752	69	77
	IgA	587	57	133
	IgG	606	43	58
LPS	IgM	658	208	218
	IgA	737	308	219
	IgG	503	154	122

**TABLA No. 8. Resultados de ratas inmunizadas por vía intraperitoneal. Respuesta inmune medida en células de bazo.**

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/ 10 <sup>7</sup> CELULAS			
		ENSAYO DIA POST-INOCULACION			
		PRIMERA		SEGUNDA	
		5	12	26	27
AgC	IgM	0	0	0	0 <sub>0</sub>
	IgA	0	0	0	0
	IgG	0	0	0	40
LPS	IgM	0	0	0	0
	IgA	0	0	0	0
	IgG	0	0	0	30

TABLA No. 9. Grupo de ratas control, inoculadas en placas de Peyer con solución salina. Ensayo con células de intestino.

ANTIGENO	CLASE DE ANTICUERPO	CPA/ 10 <sup>7</sup> CELULAS			
		ENSAYO DIA POST-INOCULACION			
		PRIMERA		SEGUNDA	
		5	12	26	27
AgC	IgM	12	21	20	60
	IgA	10	10	0	10
	IgG	6	0	0	20
LPS	IgM	19	60	0	23
	IgA	18	60	0	29
	IgG	13	0	0	25

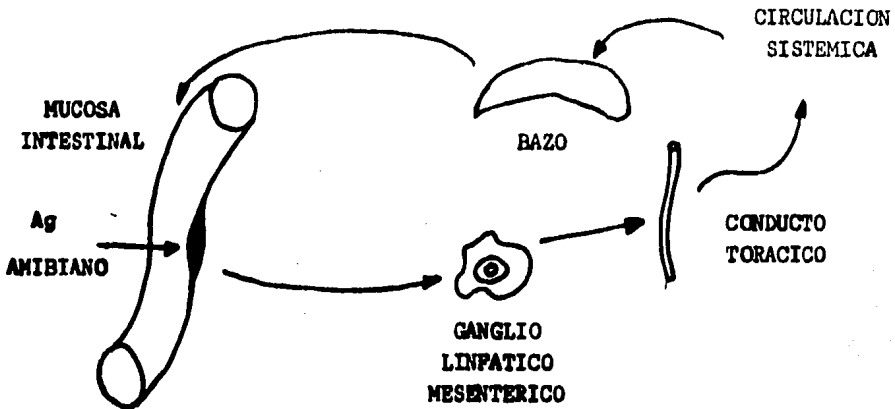
TABLA No. 10. Grupo de ratas control. Ensayo con células de bazo.

## VII. DISCUSION.

Se detectó la respuesta inmune humoral local contra antígenos amibianos en intestino de ratas inoculadas en placas de Peyer. Esta respuesta es proporcional a la dosis de antígeno administrado. Como se observa en los resultados (gráficas 4,5,6 y 8), una concentración del antígeno de 30 mg/ml provoca una mejor respuesta comparada con la inoculación de concentraciones de 5 mg/ml y 10 mg/ml.

No se detectan células productoras de anticuerpos en linfocitos de placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos; lo cual coincide con estudios realizados por distintos investigadores (10,50,51,52). En estos estudios se muestra que las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos no son regiones de células productoras de anticuerpos. La aparición de células productoras de anticuerpos se da en el bazo en los primeros días después de la primera inoculación, pero no sucede lo mismo en la mucosa intestinal en dónde aparecen hasta después (día 17) de la segunda inoculación. La disminución de las células productoras de anticuerpos en bazo y el aumento paralelo en intestino puede explicarse de acuerdo al modelo de migración celular descrito por Tseng (53); quien en sus estudios de transferencia de células linfoides de placas de Peyer muestra que la mayoría de las células precursoras de IgA migran directamente al bazo, residiendo por lo menos cinco días y después migran hacia el intestino. No obstante, el bazo no es órgano estructuralmente obligatorio en la ruta de migración ya que la repoblación de células se reduce parcialmente cuando se realiza la transferencia a receptores esplenotemizados. De ésta forma el antígeno inoculado en placas de Peyer, desencadena una respuesta inmune local que en su conjunto puede explicarse en base a los modelos de migración celular de respuesta inmune local, mostrados por diversos estu -

-dios sobre la inmunología de las mucosas (10,42,52,54,55,56). Las células de placas de Peyer sensibilizadas ante el antígeno amibiano presentado, migran hacia el ganglio linfático mesentérico de donde pasan al conducto torácico, de ahí a la circulación sistémica al bazo y finalmente retornan a la mucosa intestinal; como se describe en el siguiente esquema:



Aparentemente parece que existe una respuesta mayor hacia el lipopolisacárido amibiano en comparación con el extracto crudo. No obstante, se debe considerar la sensibilización de los eritrocitos con los dos tipos de antígenos, en la cual es mayor la sensibilización con el lipopolisacárido con un título de 512; que la sensibilización con el extracto crudo con un título de 128.

Los anticuerpos detectados tanto en bazo como en mucosa intestinal son de la clase IgM, IgA e IgG. La respuesta de anticuerpos intestinales ha sido demostrada durante diversas infecciones agudas como las causadas por E. coli, Shigella y por V. cholerae (57). Los resultados muestran una tendencia hacia la elevación de células productoras de anticuerpos de intestino, después de la tercera inoculación. Lo anterior ocurre para los -

dos tipos de antígenos: lipopolisacárido y extracto crudo de amiba, gráficas No. 6 y No. 8,. Esto nos da evidencias de una respuesta de memoria por parte del sistema inmunológico intestinal. El sistema inmune de las mucosas exhibe una respuesta de memoria en ambos sistemas celulares tanto T como B. La respuesta local de memoria puede ser generada siguiendo la aplicación sistemática del antígeno. Por otra parte, algunos estudios han mostrado evidencias de que la respuesta inmune humoral y celular es mejor inducida por inmunización local (58).

Las ratas inoculadas por vía intraperitoneal muestran una respuesta mucho menor que las ratas inoculadas en placas de Peyer. Es generalmente aceptado que la inmunidad en el intestino es mejor inducida por vía tracto gastrointestinal que por vía parenteral (53). Dependiendo de la dosis la inmunización parenteral puede conducir a la aparición de anticuerpos locales en el intestino, presumiblemente debido a la diseminación de cantidades suficientes de antígeno para alcanzar el sistema linfoide intestinal (57). Este concepto es concordante con los resultados obtenidos, puesto que se detecta una respuesta de células productoras de anticuerpos en intestino de ratas inoculadas por vía intraperitoneal.

El estudio de la respuesta inmune por parte del tejido intestinal en la amebiasis es importante, debido a que la primera fase de invasión por el patógeno Entamoeba histolytica es su adherencia a las células epiteliales intestinales. Se conoce que anticuerpos IgG específicos para la lectina (59), los cuales inhiben in vitro la adhesión de las amibas a las células epiteliales humanas (60), así también, la IgA parece interferir en la adhesión de la amiba a las células epiteliales (61,62).

## VIII. CONCLUSIONES.

Se obtuvo una respuesta inmune de tipo humoral local contra antígenos de Entamoeba histolytica en ratas inoculadas en placas de Peyer, - mediante la detección de células productoras de anticuerpos a nivel intestinal.

La magnitud de ésta respuesta inmune local va relacionada con la concentración, dosis y de la vía de administración del antígeno. Una mayor respuesta local contra los antígenos ambientales es mejor inducida por la inoculación de cantidades suficientes del antígeno en placas de Peyer - que por inoculación por vía intraperitoneal.

Se detectaron células productoras de anticuerpos en mucosa intestinal y bazo, pero no así en placas de Peyer y Ganglios linfáticos mesentéricos. Se considera que éste tipo de respuesta es secundaria, ya - que con la tercera inoculación la magnitud de la respuesta es mayor y más rápida comparada con la respuesta inicial.

Resulta de gran importancia considerar la respuesta inmune local en la amebiasis, ya que el interés que se tiene en el desarrollo y control de la respuesta inmune local en el humano va relacionado con la estrategia de la inmunización oral, con el propósito de inducir protección - contra Entamoeba histolytica.



A P E N D I C E.

1. Solución amortiguadora de fosfatos pH:7.2, 0.15M (PBS).

NaCl	8.0	gr
KCl	0.2	gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	gr
Agua destilada	1000	ml

2. Solución salina balanceada (SSB)

a) Glucosa	10.0	gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O)	7.6	gr
Rojo de fenol	0.1	gr
Agua destilada	1000	ml

b) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.86	gr
KCl	4.0	gr
NaCl	80.0	gr
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.0	gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0	gr
Agua destilada	1000	ml

Esterilizar ambas soluciones a 121°C, 15 libras, 10 minutos.

Para usar: 100 ml de a y 100 ml de b se mezclan y se aforan a

1000 ml. Se adiciona 0.1% de albúmina sérica bovina.

3. Solución de Citrato de Sodio pH: 7.2

NaCl	5.61	gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.088	gr
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.94	gr
KCl	0.111	gr
Agua destilada	1000	ml

4. Solución salina 0.15 M

NaCl	8.7	gr
Agua destilada	1000	ml

5. Solución Glicina-HCl pH:2

Glicina	15.0	gr/lt.
---------	------	--------

Ajustar el pH a 2 con ácido clorhídrico 1 M.

IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Trissl D. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal - hosts. Rev. Inf. Dis. 4(6): 1154-1184. 1982.
2. Sepúlveda B. Amebiasis: Host-pathogen biology. Rev. Inf. Dis. 4(6):- 1247-1253. 1984.
3. Kretschmer R.R. Immune phenomena in amebiasis. Surv. Immunol. Res. - 3: 1-10. 1984.
4. Kobiler D. and Mirelman D. Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Inf. Immun. 29: 221. 1980.
5. Orozco M.A., Martínez P.A., González R.A. Las interacciones entre - lectina y receptor median la adherencia de E. histolytica a células - epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (Mex)13(Sup1.3):159-167.1982.
6. Chávez A., Sepúlveda B., Segura M., Coronado D.J. Fases iniciales - de la acción patógena de E. histolytica sobre el colon del hamster. Sepúlveda y Diamond. Amibiasis. 422-458. I.M.S.S., México D.F. 1976.
7. Muñoz M.L., Calderón J. y Rojkind M. Presencia de actividad colage- nolítica en trofozoitos de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex) 13(Sup1.3): 191-202. 1982.
8. Lush B.W.B., Kairalla A.B., Cantey J.R., Hofbauer A.F. and Pitman F.- E. Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica J. Inf. Dis. 139: 9. 1979.
9. Orozco M.E., Martínez P.A., Fernández C.S. Protección del daño celu- lar temprano producido por E. histolytica sobre epitelios. Arch. - Invest. Med. (Mex) 13 (Sup1.3): 169-175. 1982.

10. Bienenstock J. The physiology of the local immune response. *Immunology of the Gastrointestinal Tract*. Asquit and Gell P.G.H. Churchill - Livingston. Edimburgo. P: 3. 1979.
11. Rudzik O., P.H.D., Bienenstock MR.C.P. Isolation and characteristics of gut mucosal lymphocytes. *Lab. Invest.* 30(3):260-266. 1974.
12. Waksman B.H. The homing pattern of thymus-derived lymphocytes in calf and neonatal mouse Peyer's patches. *J. Immun.* 111:878-884. 1973.
13. Walker W.A. Antigen uptake in the gut: immunologic implications. *Immunology Today*. 2(2):30-34. 1981.
14. Bull M.D. and Bookman A.M. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J. of Clin. Invest.* 59: 966-974. 1977.
15. Selby W.S., Jamossy G.T., Boffil M. and Jewell D.P. Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 52:219-228. 1983.
16. Wright R. *Inmunología de la enfermedad del sistema digestivo y del hígado. El manual moderno.* México 1978, p:1-15.
17. Mowat A., Ferguson A. Migration inhibition of lymph node lymphocytes antigen as in vitro assay for cell mediated immunity in the draining lymph nodes of parenterally immunized mice. *Immunol.* 47:357-364. 1982.
18. Ferguson A., Mowat A., Strobel S. Abrogation of tolerance to fed antigen and induction of cell-mediated immunity in the gut-associated lymphoreticular tissues. *Ann.N.Y.Sci.* 409:486-496. 1983.
19. Tagliabue A., Befus A.D., Clark D.A. and Bienenstock J. Characteristics natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *J.Exp.Med* 155:1785-1796. 1982.

20. Tagliabue A., Luini W. and Bienenstock J. Natural Killer activity - of gut mucosal lymphoid cells in mice. *Eur. J. Immunol.* 11:919-922. 1981.
21. Mowat A.M., Tait R. C. and Parrot D.M.V. Analysis of natural Ki - ller effector and suppressor activity by intraepithelial lymphocyte from mouse small intestine. *Clin. Exp. Immunol.* 52:191-198. 1983.
22. Nenciony L., Villa L., Bocashi D. Natural and antibody-dependent - cell-mediated activity against Salmonella typhimurium by periph - eral and intestinal lymphoid cells in mice. *J. Immunol.* 130(2):903. 1983.
23. Carrol S.M., Mayroter G.,. Kinetics of intestinal lamina propial - mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes and - eosinophils in murine strongyloidiasis. *Int. Arch. Allergy Appl. - Immun.* 74:311-317. 1984.
24. Bartnik W., Remine S.G., Chiba M., Thayer W.R. and Shorter R.G. - Isolation and characterization of colonic intraepithelial and lami - na propial lymphocytes. *Gastroenterology.* 78:976.1980.
25. Lyscom N. and Brueton M.J. Intraepithelial lamina propial and Pe - yer's patches lymphocytes of the rat small intestine: Isolation - and characterization in terms of immunoglobulin markers and recep - tors for monoclonal antibodies. *Immunol.* 45:775. 1982.
26. Lefevre M.I., Hammor R. Review macrophages of the mammalian small - intestine. *J. Reticuloendoth. Soc.* 26(5):553. 1979.
27. Guy, Grand D., Luttan G. and Vassalli P. Gut mucosal mast cells: - origin traffic and differentiation. *J. Exp. Med.* 160; 12-28. 1984.
28. Gillon J. Where do mucosal mast cells acquire IgE?. *Immunology To - day.* 2(5):80-81. 1981.

29. Schrader J.W., Scollay R. and Battye F. Intramucosal lymphocytes of the gut: Lyt-2 and Thy-1 phenotype of the granulated cells and evidence for the presence of both T cells and mast cell precursors. *J. Immunol.* 130(2):558-564. 1983.
30. Thompson R. Edited by recent advance in clinical immunology 2. P:113-143. 1980.
31. Brown S.J. and Askenese P.W. Immune rejection of ectoparasites ( Ticks) by T cell and IgG1. Antibody recontment of basophils and eosinophils. *Fed. Proc.* 42:1744. 1983.
32. Mahmond A.A.I., Warren K.S. A role for the eosinophil in acquired resistance to Shistosoma mansoni infection as determined by anti-eosinophil serum *J. Exp. Med.* 142:805. 1975.
33. Sepúlveda B. Comentarios en la clausura del noveno seminario sobre amebiasis. *Arch. Invest. Med.(Méx)*13(Supl.3):9. 1982.
34. Martínez C.C.S., Gorab A., Muñoz O. Coproanticuerpos en amebiasis intestinal. *Arch. Invest. Med. (Méx)*10:121. 1979.
35. Acosta A.G., Campos R.R., Barranco T.C., Isibasi A. and Kumate J. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of E. histolytica. *Ann.N.Y.Sci.* 409:760-765. 1983.
36. Walker W.A., Isselbacher K.J., Bloch K.J. Intestinal uptake of macromolecules: effecto of oral immunization. *Science.* 177:608-610. 1972.
37. Kipstein F.A., Engert R.F. Protective effect of active immunization with purified E. coli heat-labile enterotoxin in rats. *Inf. Immun.* - 23:592-599. 1979.
38. Stokes C.R., Soothill J.F. Immune exclusion is a function of IgA. - *Nature.* 255:745-746. 1975.

39. Bienenstock J. The physiology of the local immune response. Immunology of the gastrointestinal tract. Asquith and Gell P.H.G. Churchill Livingstone. Edimburgo. P:3. 1980.
40. Walker W.A., Isselbacher K.J. and Bloch K.J. Intestinal uptake macromolecules. II effects of parenteral immunization. J. Immunol. 111: 221-226. 1973.
41. Bienenstock J. and Befus A.D. Review mucosal immunology. Immunol. - 41:249. 1980.
42. McDermott M.R. and Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. J. Immunol. 122:1892. 1979.
43. Diamond L.S., Harlow D.R. and Cunnick C.C. A new medium for axenic cultivation of E. histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431. 1978.
44. Garvey S.J. and Cremer N.E. Methods in immunology. Tercera edición. 1971.
45. Isibasi A., Cruz M.S., Ramirez A. and Kumate J. Immunochemistry of an antigen; lipopeptide phosphoglycan. A phenol water extraction from trophozoites of E. histolytica cultured axenically. Arch. Inv. Med. (Mex)12(4)(Supl. 2):63. 1981.
46. Babbette K.S., Wesley E.J. Active transport of glucose by suspensions of isolated rat intestinal epithelial cells. Nature 209(5025) 789-790. 1966.
47. Dresser D.W. Assays for immunoglobulin secreting cells. Handbook of experimental immunology. Ed. D.M. Weir. Tercera edición. Blackwell-Sci. P:28.13. 1978.

48. Mathew J.L., Stanley S.R. Métodos de Laboratorio. Interamericana—  
Segunda edición. 1972.
49. Campos R.R. Control genético de la respuesta de anticuerpos IgA es-  
pecíficos en la rata. Tesis doctoral E.N.C.B. I.P.N. P: 27-31.  
1984.
50. Carter P.B. and Collins F.M. The route of enteric infection in nor-  
mal mice. J. Exp. Med. 139:1189-1203. 1974.
51. Spalding D.M. and Koopman W.J. Identification of a nonadherent acce-  
ssory cell in murine Peyer's patches. Ann. N. Y. Acad. Sci. 409: -  
880-881. 1983.
52. Cebra J. J., Emons R., Gearhart J. P. Cellular parameters of the  
IgA response. Secretory immunity and infection. Plenum Press N. Y.  
and London. P:19-28. 1978.
53. Tseng J. Transfer of lymphocytes of Peyer's patches between immu-  
globulin allotype congenic mice: repopulation of the IgA plasma -  
cells in the gut lamina propria. J. Immunol. 127(5):2039-2043.  
1981.
54. Craig S.W. and Cebra J. J. Peyer's patches: An enriched source of-  
precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. J. Exp. -  
Med. 134:188-200. 1971.
55. Husband A.J., Cripps A.W. and Clancy R.L. Generation and migration  
patterns of intestinal T and B-lymphocytes in response to local -  
antigen. Ann. N. Y. Acad. Sci. 409:882-884. 1983.
56. Parrott D.M.V. and Rose M.L. Migration pathways of T lymphocytes -  
in the small intestine. Plenum Press N. Y. and London. P:67-74.  
1978.



57. Shearman D.J.C., Parkin D.M. and McClelland D.B.L. The demonstration and function of antibodies in the gastrointestinal tract. *Gut*, 13: 483-499. 1972.
58. Ganguly R. and Waldman R. H. T- and B-cell memory on mucosal surface. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 409:603-611. 1983.
59. Kobilier D., Mirelman D., Mattern C.F. Lectin and Toxin like activities of Entamoeba histolytica: Comparison of properties. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1981.
60. Kobilier D., Mirelman D. Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. *J. Inf. Dis.* 144:539. 1981.
61. Heremans J.F. The IgA system in connection with local and systemic immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 45:3. 1974.
62. Hall J. E., Orleans E., Peppard J., Reynolds J. Lymphatic physiology and secretory immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107:29. 1978.
63. Ortiz O. L. y Avella M.L. L. Respuesta inmune en infecciones por Entamoeba histolytica. *Inmunologia*. 3(1). 1984.
64. Clancy R., Cripps A. Restrictions on mucosal B-lymphocyte function in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 409:745-749. 1983.