

11261  
1986  
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

EFEECTO DE LA INMUNIDAD CELULAR  
EN LA INTERACCION  
CELULA PERITONEAL-AMIBA IN VITRO

T E S I S .

Que para obtener el título de:  
Maestría en Ciencias Biomédicas,  
Area de Inmunología

Presenta:

JULIA ELVIRA MARTINEZ VILLEGAS

México, D.F., marzo de 1986

FALLA DE ORIGEN



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.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

INTRODUCCION 1

MATERIAL Y METODOS

Animales 5

Esquema de Inmunización 6

Obtención de Células Peritoneales 6

Demostración de la Inmunización 7

Técnica de la Co-Incubación In Vitro 7

Cuentas de Amibas y Células Peritoneales 8

Especificidad del Efecto de Células Peritoneales de Ratas Inmunes Sobre Amibas 9

Efecto del Suero de Rata Inmune Sobre la Acción de Células Peritoneales Obtenidas de Rata Normal Contra E. histolytica 9

Técnica Para Determinar Viabilidad por Exclusión de Azul Tripán 9

Fórmulas Aplicadas Para Obtener el Dato Real de las Poblaciones Celulares al Término de 4 horas 10

Análisis Estadístico de los Resultados 10

## RESULTADOS

Efecto del Medio TYI-S-33 Sobre las Células Peritoneales	11
Efecto de la Co-incubación de Células Peritoneales y Amibas Sobre las Células Peritoneales	11
Efecto de la Co-Incubación de Células Peritoneales y Amibas Sobre las Amibas	13
Efecto de la Naturaleza de la Cepa de Amibas en la Co-incubación con Células Peritoneales	15
Efecto del Tratamiento Previo con Suero Inmune de las Células Peritoneales en la Co-Incubación con Amibas	16
Prueba de Inmunización de las Ratas Inyectadas con Antígenos Amibianos	16

## DISCUSION

### Parte 1

Resumen de los Resultados	17
Naturaleza de la Población de Células Peritoneales	18
Acción de las Células Peritoneales Sobre las Amibas	19
Mecanismo de Destrucción de las Amibas por las Células Peritoneales	21
¿Existen Dos Poblaciones Diferentes de Amibas?	22
Acción de las Amibas Sobre las Células Peritoneales	23

### Parte 2

Estudios de la Interacción <u>In Vitro</u> de <u>E. histolytica</u> con Diferentes Células de Mamíferos	25
---	----

Parte 3

1. ¿Cuál es la Naturaleza de las CP?	30
2. ¿Qué Efecto Tiene la Incubación de las CP en el Medio TYI-S-33 Sobre su Capacidad Fagocítica?	31
3. ¿Cuál es la Cinética de la Interacción CP-amibas <u>In Vitro</u> en el Tiempo?	31
4. ¿Qué Efecto Tiene la Agitación Continua Sobre el Fenómeno?	32
5. ¿Cuál es el Efecto del Medio Condicionado de CP Inmunes Sobre la Interacción de CP Normales con Amibas?	32
6. ¿Cuál es la Ultraestructura del Fenómeno?	32
7. ¿Cuál es el Efecto de Inmunizar a las Ratas con <u>E. histolytica</u> HK-9 o <u>E. invadens</u> y Después Incubar sus CP con Amibas HM-1?	33
BIBLIOGRAFIA	34

## LISTA DE TABLAS

1. Efecto de la incubación de células peritoneales en medio de cultivo TYI-S-33 por 4 horas.
2. Porcentaje de células peritoneales vivas.
3. Porcentaje de células peritoneales muertas + desaparecidas.
4. Número total de células peritoneales desaparecidas.
5. Porcentaje de amibas vivas.
6. Porcentaje de amibas muertas + desaparecidas.
7. Número total de amibas desaparecidas.
8. Especificidad del fenómeno.
9. Efecto de la preincubación de células peritoneales de rata no inmune con suero de rata inmune en la incubación con amibas HM-1 en proporción 30:1.
10. Interacción in-vitro de E. histolytica con diferentes células de mamíferos.

## LISTA DE FIGURAS

1. Método para la incubación.
2. Células peritoneales vivas.
3. Células peritoneales muertas + desaparecidas.
4. Células peritoneales desaparecidas después de 4 horas de co-incubación con E. histolytica (HM-1) amibas: 50,000.
5. Amibas vivas.
6. Amibas muertas + desaparecidas.
7. Amibas (HM-1) desaparecidas después de 4 horas de co-incubación con macrófagos.
8. Prueba de doble inmunodifusión.

## RESUMEN

Con objeto de examinar el papel de la inmunidad celular en la amibiasis se estableció un sistema in vitro utilizando E. histolytica (cepa HM-1) conservada en cultivo axénico y células obtenidas de la cavidad peritoneal (CP) de la rata. Las CP se enriquecieron en macrófagos por adherencia al vidrio, de modo que contienen  $> 90\%$  macrófagos y  $< 10\%$  células linfoides. Las amibas se usaron a las 72 horas de crecimiento. El sistema consiste en la incubación de proporciones variables de CP y amibas (1:1; 10:1; 30:1), midiendo en el tiempo 0 y en períodos variables pero no mayores de 4 horas los cambios en los números totales y en la viabilidad de ambas poblaciones celulares por medio de la técnica de exclusión del azul tripano. Se estudiaron tres grupos de animales: normales, estimulados con adyuvante de Freund completo, e inmunizados con una emulsión de E. histolytica (cepa HM-1) en adyuvante de Freund completo. La sensibilización de los animales inmunizados se demostró por inmunodifusión de suero contra homogenado de E. histolytica (cepa HM-1). La magnitud de los cambios introducidos por la inmunidad en el resultado de la interacción CP-E. histolytica se midió variando las proporciones relativas de las dos células hasta obtener otra vez los datos de la proporción 1:1 con CP normales. La especificidad del



fenómeno se examinó usando dos cepas adicionales de amibas que muestran cruce antigénico parcial con HM-1: la cepa HK-9 y E. invadens. Finalmente, la participación de factores séricos en el fenómeno se exploró pre-incubando CP normales con suero de ratas inmunes antes de incubarlas con amibas. Los resultados indican que: 1) el modelo de la interacción CP-amibas in vitro es reproducible y cuantificable; 2) no hubo diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de las CP normales o estimuladas inespecíficamente; 3) usando CP normales o estimuladas inespecíficamente, cuando la proporción CP-amibas es 1:1 sucumben las CP, pero cuando la proporción se cambia a 30:1 sucumben las amibas; en proporciones intermedias los resultados son igualmente intermedios; 4) en cambio, usando CP inmunes en proporción 1:1 sucumben las amibas y es necesario cambiar la proporción a 1:10 para obtener el mismo resultado que con CP normales o estimuladas inespecíficamente en proporción 1:1; 5) el fenómeno sólo ocurre en forma parcial cuando las CP inmunes se incuban con HK-9 y no se observa cuando se incuban con E. invadens; 6) el suero de las ratas inmunes sí modifica el comportamiento de CP de ratas normales o estimuladas inespecíficamente.

## EFFECTO DE LA INMUNIDAD CELULAR

### EN LA INTERACCION CELULA PERITONEAL-AMIBA IN VITRO

#### Introducción

La enfermedad humana producida por Entamoeba histolytica (amibiasis) es una parasitosis endémica muy frecuente y de distribución mundial. Se calcula que afecta aproximadamente a 400 millones de personas en todo el mundo, aunque en ciertos países como la India y México la proporción de individuos infectados es mucho mayor que en otras localidades<sup>1,2</sup>. En México la tasa de frecuencia por 100,000 habitantes (en 1963) fue de 93.2 y como causa de muerte en sujetos de 15 a 75 años de edad alcanzó la misma cifra que todas las demás enfermedades infecciosas del tubo digestivo juntas<sup>3</sup>. Actualmente se calcula que el 27 por ciento de la población está infectado por amibas, pero existen estudios en grupos selectos (escuelas, cuarteles) donde la frecuencia ha sido mayor del 75 por ciento<sup>4</sup>.

E. histolytica es un parásito del grupo de los rizópodos y del género Entamoeba, que muestra dos formas principales en su ciclo biológico: el quiste y el trofozoito. En la forma quística el parásito mide entre 3.5 y 20 micras de diámetro y muestra de 1 a 8 núcleos, pero

lo frecuente es que sean 4, con cromatina adherida a la membrana nuclear y un endosoma, mientras en el citoplasma se observan los característicos cuerpos cromatoides fusiformes. Cuando el quiste se transforma en trofozoito mide de 10 a 60 micras de diámetro, tiene un solo núcleo grande con endosoma prominente, la membrana celular es fina y muestra formación activa de pseudópodos, fagocitosis de eritrocitos y un halo claro en el tejido que lo rodea<sup>5</sup>. Existen cepas patógenas y no patógenas de E. histolytica que son imposibles de distinguir morfológicamente; sin embargo, tal distinción es posible por medio de la determinación de patrones enzimáticos conocidos como zimodemos, de los que existen aproximadamente 16 diferentes; de ellos, 5 corresponden a cepas patógenas y el resto a no patógenas<sup>6,7</sup>.

La transmisión de la amibiasis se hace de hombre a hombre por contaminación fecal de aguas potables y de alimentos, lo que señala a las personas encargadas de la preparación de alimentos como la fuente principal de la enfermedad. Las dietas ricas en carbohidratos o deficientes en proteínas favorecen la penetración de la amiba en los tejidos; asimismo la presencia de bacterias (aunque no sean patógenas) es indispensable para el establecimiento del parásito<sup>8</sup>.

Debe distinguirse entre dos formas generales de ami

biasis, la invasora y la no invasora. La amibiasis no invasora ocurre cuando el individuo alberga E. histolytica patógena en el intestino pero no tiene lesiones anatómicas en la pared de ese órgano; en otras palabras, la amiba se comporta como un comensal simbiótico. Este tipo de amibiasis es importante por dos razones: en primer lugar, aunque el individuo asintomático no tiene la enfermedad, es una fuente de contagio tan activa como el enfermo; en segundo lugar, en cualquier momento la amibiasis no invasora puede transformarse en invasora y el sujeto portador presentar todos los síntomas del padecimiento. Los factores que determinan esta transformación se desconocen<sup>9</sup>. La amibiasis invasora puede ser intestinal y extraintestinal; la primera afecta principalmente al intestino grueso y la segunda al hígado. La invasión de otros órganos es muy rara<sup>10</sup>.

La amibiasis sólo afecta espontáneamente al hombre y a los reptiles; en estos últimos el parásito es diferente y se conoce como Entamoeba invadens. No existe infección espontánea por E. histolytica en ninguna otra especie animal<sup>11</sup>; además, la mayor parte de los animales de laboratorio son resistentes a E. histolytica y sólo es posible producir lesiones experimentales con amibiasis si se cumplen dos condiciones: 1) el animal debe estar inmunodeprimido, y 2) las amibas se introducen directa-

mente en los tejidos y en grandes cantidades<sup>12,13</sup>. La inmunodepresión se logra usando animales recién nacidos, o administrando esteroides, o bloqueando al sistema fagocítico mononuclear por distintos métodos, como la inyección intravenosa de sílice o de un anticuerpo anti-macrófago<sup>14-17</sup>. Las amibas se cultivan axénicamente como trofozoitos y en esa forma es como se inyectan, sea en el intestino o en el hígado. Aunque de esta manera se logran producir lesiones agudas, no existe en la actualidad ningún modelo experimental aceptable de amibiasis, no sólo por la resistencia natural ya mencionada al parásito sino porque se desconocen las condiciones que determinan la transformación del trofozoito en quiste. El modelo experimental debería cumplir con un mínimo de tres condiciones para ser aceptable: 1) la enfermedad debe ser adquirida por la ingestión de quistes de una cepa patógena de E. histolytica; 2) debe poderse establecer el estado de "portador sano", o sea que el animal albergue al parásito en el intestino y elimine quistes sin mostrar síntomas de la enfermedad; 3) al ocurrir la enfermedad, ésta debe tener lesiones intestinales y extraintestinales.

Existen varios estudios en que se ha logrado producir lesiones experimentales por medio de amibas en animales de laboratorio con resistencia natural al parásito, cuando se interfiere con las funciones del sistema fago-

cítico mononuclear<sup>14-17</sup>. También se ha demostrado por medio de incubaciones in vitro que aunque las amibas cultivadas axénicamente son capaces de destruir a diferentes tipos de células, los macrófagos también les producen daño a las amibas y este fenómeno es más aparente cuando las células provienen de un animal previamente inmunizado con antígenos amibianos<sup>18</sup>.

En vista de la participación del sistema fagocítico mononuclear en la resistencia natural a muchas infecciones, así como sus varias funciones en distintos aspectos de la respuesta inmune (presentación de antígenos, secreción de interleukinas y otros factores, célula efectora)<sup>19</sup>, se decidió estudiar su participación en la resistencia natural a la amibiasis. El primer paso en ese estudio es el objetivo de esta tesis, que consiste en examinar cuantitativamente la interacción in vitro de una cepa patógena de E. histolytica con macrófagos provenientes de animales naturalmente resistentes al parasito.

## MATERIAL Y METODOS

### Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 8 semanas de edad y de 150 g de peso promedio, alimentadas con purina y agua ad libitum y enjauladas en grupos de tres anima-

les. Se distribuyeron en tres grupos, cada uno de 12 ratas.

Esquema de Inmunización

Cada rata del grupo 1 recibió 0.3 ml del antígeno amibiano, emulsificado en un volumen igual de adyuvante de Freund completo, distribuidos en cuatro sitios intramusculares distintos. A los 15 y 22 días de la primera inmunización los animales fueron inyectados de igual manera pero sin el adyuvante de Freund, y a los 29 días recibieron la misma dosis de antígeno pero por vía intraperitoneal. Las ratas se sangraron del plexo venoso retro orbitario siete días después de la última administración del antígeno. El proceso de inmunización se repitió cada 30 días durante toda la duración del estudio.

El grupo 2 de animales recibió las mismas inyecciones (excepto la intraperitoneal) de adyuvante de Freund sin el antígeno de E. histolytica. El grupo 3 sirvió de control no estimulado.

Obtención de Células Peritoneales

Para obtener células peritoneales se inyectaron en esa cavidad 10 ml de proteosa peptona al 5% en suero fisiológico y cuatro días después se recuperaron las células por medio de dos o tres lavados de la cavidad peritoneal, cada uno de 20 ml, de medio TYI-S-33. Las células

obtenidas se lavaron dos veces con el mismo medio, centrifugándolas a 1,500 rpm por 5 min a 4°C, y se enriquecieron en macrófagos por medio de adherencia al vidrio, incubándolas en cajas de Petri durante 3 horas a 37°C; al término de este lapso los elementos no adheridos se eliminaron por decantación y lavado suave con 2 ml de medio TYI-S-33 y las células adherentes se recuperaron raspando el fondo de la caja de Petri con un "policía de goma". Las células se contaron en una cámara de Neubauer modificada y su viabilidad se determinó por medio de la técnica de exclusión del azul tripán.

#### Demostración de la Inmunización

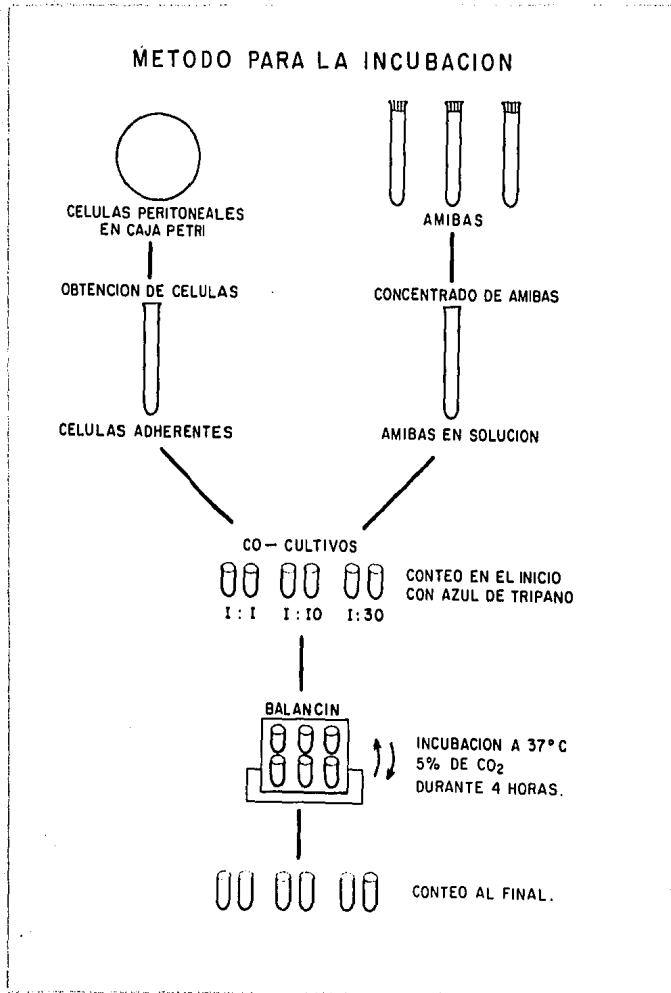
El suero de los animales inmunizados se probó por doble inmunodifusión en agar contra el antígeno amibiano, así como preparaciones semejantes hechas con amibas de la cepa HK-9 y con E. invadens.

#### Técnica de la Co-incubación In Vitro

Para co-incubar las amibas con las células peritoneales se procedió de la manera siguiente (Fig. 1): las amibas se desprendieron de las paredes del tubo de cultivo por medio de un baño de agua con hielo durante 5 min, seguido por centrifugación a 1,500 rpm por 5 min a 4°C, se suspendieron en 3.0 ml de medio TYI-S-33, se contaron en una cámara de Neubauer modificada y su viabilidad se



Figura 1



determinó por medio de la técnica de exclusión del azul tripán. Se ajustó la concentración de amibas a  $1 \times 10^6$ /ml y se tomó 0.05 ml de la suspensión, o sea  $5 \times 10^4$  amibas para cada tubo de co-incubación. Las células peritoneales se agregaron en tres diferentes números:  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^6$ , de manera que las proporciones de células peritoneales: amibas que se co-incubaron en los distintos experimentos fueron 1:1, 10:1 y 30:1. El volumen de incubación se aforó a 1.0 ml con el medio TYI-S-33; todas las co-incubaciones se hicieron por duplicado. Los tubos se colocaron en un mezclador o "balancín" con movimiento de  $24^\circ$  y frecuencia de 18 ciclos completos por minuto y este aparato se incubó a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  + 95 de  $\text{O}_2$  durante 4 horas.

#### Cuentas de Amibas y Células Peritoneales

Se hicieron cuentas por duplicado de cada tubo en el tiempo 0 y al término de la co-incubación, de modo de tener números totales de células peritoneales y amibas y proporción de elementos vivos y muertos de cada uno de los dos elementos. Además se calculó el número de células peritoneales y de amibas que desaparecieron durante la co-incubación y esta cifra se sumó a los muertos respectivos. El total resultante de muertos + desaparecidos se consideró para cada elemento como el efecto de su interacción con el otro.

Especificidad del Efecto de Células Peritoneales de Ratas Inmunes Sobre Amibas

Para explorar la especificidad del efecto de las células peritoneales provenientes de ratas inmunizadas con antígeno amibiano, sobre las amibas vivas, se hicieron co-incubaciones semejantes a las descritas pero usando amibas de la cepa HK-9 y E. invadens; con estas últimas las co-incubaciones se hicieron a temperatura ambiente.

Efecto del Suero de Rata Inmune Sobre la Acción de Células Peritoneales Obtenidas de Rata Normal Contra E. histolytica

Para probar si el suero de rata inmunizada con antígeno amibiano era capaz de modificar el efecto de células peritoneales obtenidas de ratas normales se preincubaron las células en 1.0 ml de suero de rata inmunizada por 1 hora a 37°C, se lavaron dos veces con medio TYI-S-33 y se procedió a co-incubarlas con las amibas como se describió arriba.

Técnica para Determinar Viabilidad por Exclusión de Azul Tripán

La solución de azul tripán se preparó fresca mezclando cuatro partes de azul tripán al 0.2% en agua destilada y una parte de NaCl al 4.25% en agua destilada. Para determinar la viabilidad de células peritoneales y

de amibas se agregaron dos gotas de la solución de azul tripán al contenido del tubo de incubación e inmediatamente se tomó una alícuota para contar en una cámara de Neubauer modificada; las células con el citoplasma teñido de azul se consideraron muertas.

Fórmulas aplicadas para obtener el dato real de las poblaciones celulares al término de 4 horas

CP vivas = CP vivas iniciales - [(CP muertas finales + CP desaparecidas) - CP muertas iniciales].

Amibas vivas = Amibas vivas iniciales - [(amibas muertas finales + amibas desaparecidas) - amibas muertas iniciales].

Análisis Estadístico de los Resultados

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de la prueba de  $t$  de Student, marcando el nivel de 0.01 como significativo. Las gráficas se trazaron por medio de una microcomputadora Apple IIe y el programa BIOSOFT de Elsevier.

RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación son los promedios de 11 animales del grupo 1, 9 animales del grupo 2 y 11 animales del grupo 3. Con objeto de simpli

Tabla 1

EFFECTO DE LA INCUBACION DE CELULAS PERITONEALES  
EN MEDIO DE CULTIVO TYI-S33 POR 4 HORAS

Número total	Tiempo 0 ( % )		Tiempo 4 horas ( % )	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
$5 \times 10^4$	82	18	82	18
$5 \times 10^5$	95	5	94	6
$1.5 \times 10^6$	90	10	90	10

ficar su presentación los datos se muestran en tablas, donde solamente se anotan los valores promedio, y en histogramas, que incluyen las desviaciones estándar calculadas para los promedios.

### Efecto del Medio TYI-S-33 Sobre las Células Peritoneales

Con objeto de determinar el efecto del medio de cultivo para amibas en las células peritoneales se incubaron por duplicado cada una de las tres cantidades de células utilizadas en los distintos experimentos, en las condiciones de agitación e incubación descritas en Material y Métodos pero en ausencia de amibas. El porcentaje de viabilidad y las cuentas totales de células peritoneales establecidas en el tiempo 0 no se modificaron de manera significativa al término de 4 horas de incubación (Tabla 1).

### Efecto de la Co-incubación de Células Peritoneales y Amibas Sobre las Células Peritoneales

Los resultados de la viabilidad de las células peritoneales al final de 4 horas de co-incubación con amibas se muestran en la Tabla 2. Es aparente que el porcentaje de células peritoneales vivas varía muy poco, a pesar de que el número inicial de estos elementos osciló entre  $5 \times 10^4$  y  $1.5 \times 10^6$ . También puede apreciarse que la

Tabla 2

PORCIENTO DE CELULAS PERITONEALES VIVAS

Proporción	Inmune	Adyuvante	Control
1:1	75	55	53
10:1	53	58	62
30:1	57	64	72

El por ciento de células peritoneales vivas al término de las 4 horas de incubación varía muy poco y es independiente del número inicial y de su estado inmune.

Figura 2

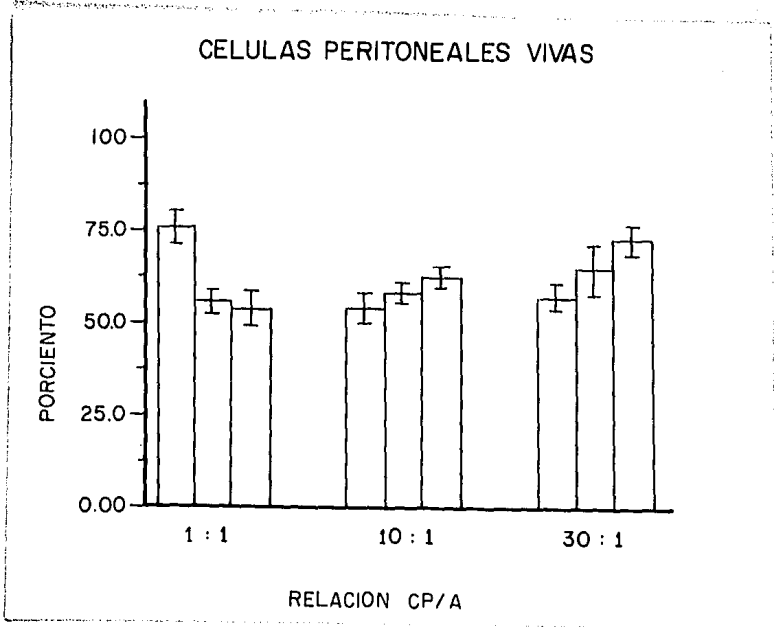




Tabla 3

PORCIENTO DE CELULAS PERITONEALES  
MUERTAS + DESAPARECIDAS

Proporción	Inmune	Adyuvante	Control
1:1	21	43	49
10:1	47	42	37
30:1	42	35	28

El por ciento de células peritoneales muertas + desaparecidas al término de las 4 horas de incubación varía muy poco y es independiente del número inicial y de su estado inmune.

Figura 3

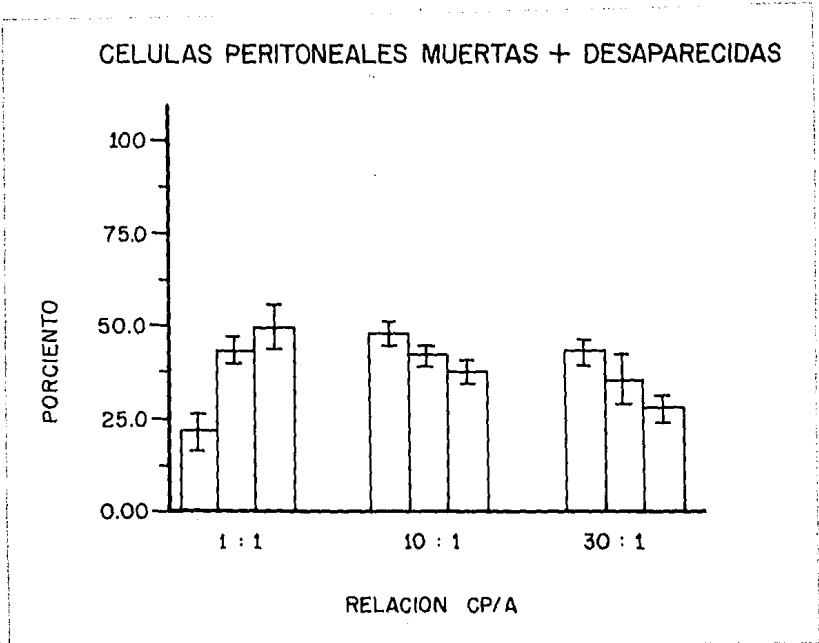


Tabla 4

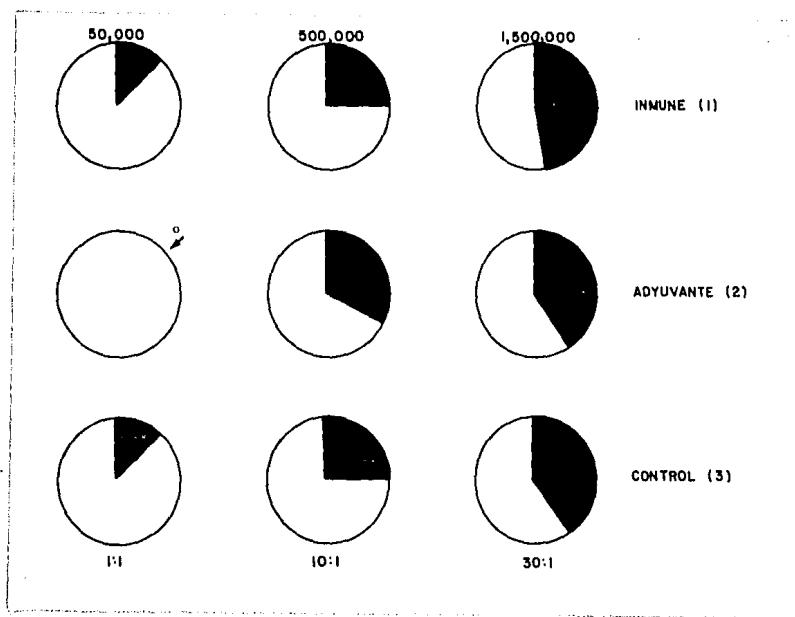
NUMERO TOTAL DE CELULAS PERITONEALES  
DESAPARECIDAS

<u>Número inicial</u>	<u>Control</u>	<u>Adyuvante</u>	<u>Inmune</u>
50,000	5,000	0	5,000
500,000	100,000	135,000	100,000
1,500,000	395,000	325,000	325,000

El número total de células peritoneales desaparecidas al término de las 4 horas de incubación depende del número inicial pero es independiente del estado inmune.

Figura 4

Células Peritoneales desaparecidas después de  
4 horas de co-incubación con E. histolytica (HM-1)  
Amibas: 50,000



viabilidad de las células peritoneales es muy semejante en los tres grupos de animales examinados, o sea controles, estimulados con adyuvante de Freund o inmunizados con antígenos amibianos. Los únicos promedios que parecen apartarse un poco de los demás son el de proporción 30:1 de células peritoneales normales contra amibas y el de proporción 1:1 de los mismos elementos; sin embargo, el análisis estadístico mostró que tales diferencias no son significativas (Fig. 2). Por lo tanto, puede concluirse que ni el número inicial (en un rango que va de 1 a 30) ni el estado inmune o estimulado de las células peritoneales influyen en el porcentaje de viabilidad observado al término de 4 horas de co-incubación con amibas, que en promedio osciló entre 58 y 66.

El porcentaje de células peritoneales muertas + desaparecidas aparece en la Tabla 3. De nuevo los promedios correspondientes a las tres concentraciones distintas de macrófagos y a los tres grupos de ratas examinados no muestran diferencias significativas, con la única posible excepción de células peritoneales obtenidas de animales del grupo 1 (inmunizados con antígeno amibiano) en proporción 1:1 con amibas. Sin embargo, otra vez el análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre los nueve promedios (Fig. 3).

Cuando se consideran los números totales de células

peritoneales desaparecidas al término de 4 horas de co-incubación con amibas (Tabla 4), los datos sugieren que dependen de la cantidad inicialmente agregada y que el estado inmune, estimulado o normal, de las células peritoneales, no tiene ninguna influencia en los resultados (Fig. 4).

En resumen, ni el número ni el estado inmune o estimulado de las células peritoneales co-incubadas con el mismo número de amibas patógenas, en las condiciones experimentales descritas en Material y Métodos, parecen influir en el porcentaje de viabilidad o de destrucción celular observado al cabo de 4 horas de co-incubación con amibas patógenas. El único parámetro que genera diferencias cuantitativas estadísticamente significativas en este contexto es el número inicial de células peritoneales, cuando se compara con el número terminal de las mismas células. En cambio, llama la atención que las amibas no parecen distinguir entre células peritoneales obtenidas de ratas inmunes, estimuladas o normales.

#### Efecto de la Co-incubación de Células Peritoneales y Amibas Sobre las Amibas

Los datos cuantitativos sobre la viabilidad de las amibas al término de 4 horas de co-incubación con células peritoneales obtenidas de ratas normales, estimuladas o inmunes, se encuentran en la Tabla 5. Puede verse

Tabla 5

PORCIENTO DE AMIBAS VIVAS

Proporción	Inmune	Adyuvante	Control
1:1	39	65	76
10:1	36	62	57
30:1	21	44	39

El por ciento de amibas vivas al término de las 4 horas de incubación depende directamente del número inicial de células peritoneales y de su estado inmune.

Figura 5

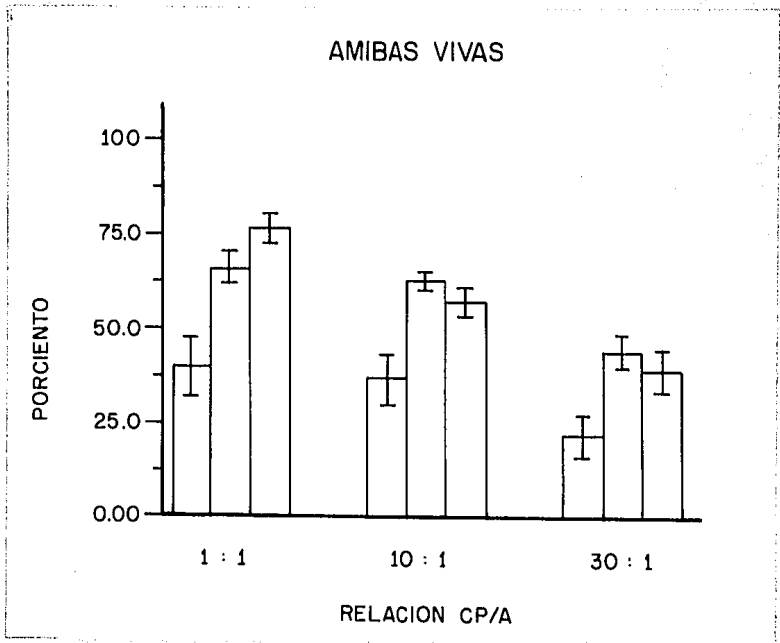




Tabla 6

PORCIENTO DE AMIBAS MUERTAS + DESAPARECIDAS

Proporción	Inmune	Adyuvante	Control
1:1	56	34	26
10:1	59	37	43
30:1	77	56	57

El por ciento de amibas muertas + desaparecidas al término de las 4 horas de incubación depende solamente del número inicial de células peritoneales en las proporciones 1:1 y 10:1 con elementos no inmunes o estimulados inespecíficamente. En cambio, con células inmunes no depende del número inicial, es mayor que en los otros dos grupos y se mantiene constante.

Figura 6

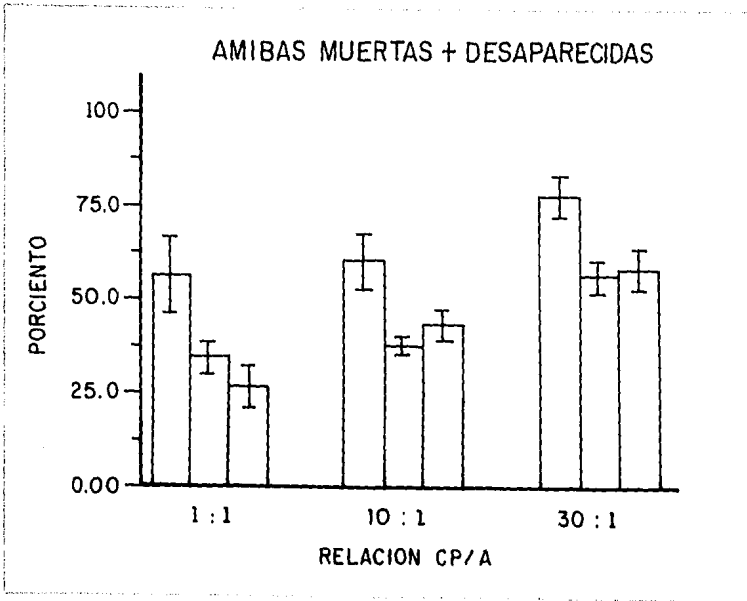


Tabla 7

NUMERO TOTAL DE AMIBAS DESAPARECIDAS

Proporción	Control	Adyuvante	Inmune
1:1	5,000	10,000	5,000
10:1	5,000	10,000	0
30:1	5,000	5,000	10,000

El número total de amibas desaparecidas varió muy poco y fue independiente del número inicial de células peritoneales y de su estado inmune.

Figura 7

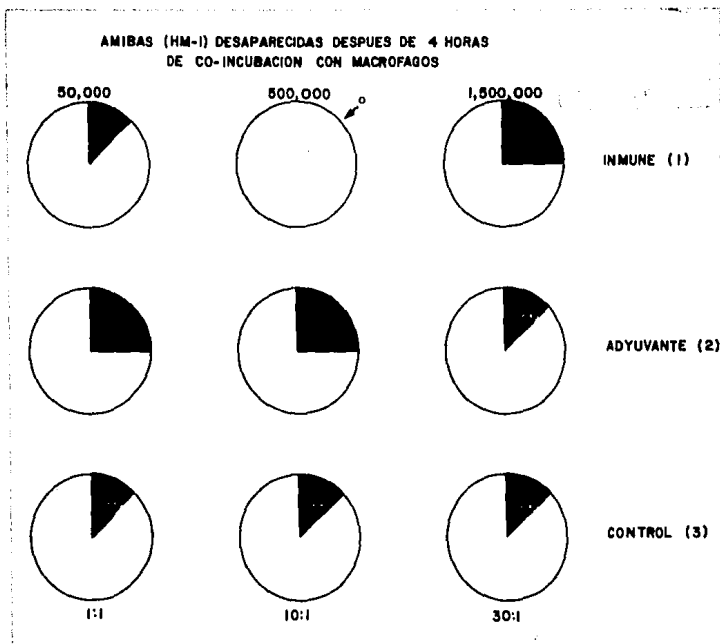


Tabla 8

ESPECIFICIDAD DEL FENOMENO

	Proporción	Control	Adyuvante	Inmune
HM-1	1:1	65	89	24
	10:1	56	60	25
	30:1	42	56	15
HK-9	1:1	70	64	74
	10:1	39	54	33
	30:1	32	40	24
<u>E. invadens</u>	1:1	50	62	67
	10:1	48	65	70
	30:1	58	62	67

El por ciento de amibas vivas al término de las 4 horas de incubación depende de la cepa de amiba usada: para HM-1 desde la proporción 1:1 depende del estado inmune; para HK-9 desde la proporción 10:1 depende del estado inmune, y éste no influye para E. invadens.

El total de amibas desaparecidas al término de 4 horas de co-incubación con células peritoneales (Tabla 7) varió muy poco (entre 0 y 5,000, o sea el 10 porciento) y fue independiente del número inicial de células peritoneales y del estado inmune del animal de donde provenían (Fig. 7).

Efecto de la Naturaleza de la Cepa de Amibas en la Co-incubación con Células Peritoneales

Con objeto de explorar la especificidad del aumento en la capacidad amebicida observado en las células peritoneales obtenidas de ratas inmunes cuando se co-incuban con la misma cepa de amibas que sirvió para inmunizarlas (HM-1), el experimento se repitió usando ahora otras dos cepas diferentes de amibas, una también de E. histolytica, la HK-9, y otra de especie distinta, E. invadens. El porcentaje de viabilidad de las amibas de las tres cepas al término de las 4 horas de incubación depende de la naturaleza de la cepa de amiba usada: cuando se trata de HM-1 depende del estado inmune de las células peritoneales desde la proporción 1:1, para la cepa HK-9 también depende del estado inmune de las células peritoneales pero sólo a partir de la concentración 10:1, y en el caso de E. invadens el resultado es independiente del estado inmune de las células peritoneales (Tabla 8).

Tabla 9

EFFECTO DE LA PREINCUBACION DE CELULAS PERITONEALES  
DE RATA NO INMUNE CON SUERO DE RATA INMUNE  
EN LA INCUBACION CON AMIBAS HM-1  
EN PROPORCION 30:1

	Tiempo 0 ( % )		Tiempo 4 horas ( % )	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
Células peritoneales	92	8	80	20
Amibas	84	16	25	75

Efecto del Tratamiento Previo con Suero Inmune de  
Las Células Peritoneales en la Co-incubación con  
Amibas

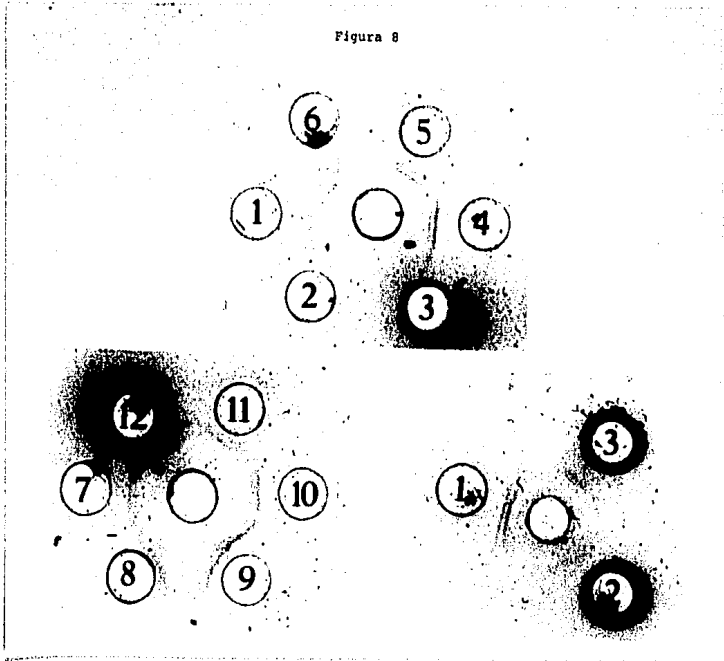
Para examinar el efecto del suero inmune en el comportamiento de células peritoneales obtenidas de animales normales o estimulados inespecíficamente, después de haber sido enriquecidas en macrófagos por adherencia al vidrio, las células mencionadas se preincubaron durante 1 hora a 37°C con una mezcla de sueros de ratas inmunizadas contra E. histolytica cepa HM-1, en las que se había demostrado la presencia de anticuerpos inmunoprecipitantes contra los antígenos de esa misma cepa. Al término de esa hora se lavaron las células peritoneales y se co-incubaron con amibas en las proporciones y condiciones ya mencionadas. Los resultados de este experimento aparecen en la Tabla 9, donde puede verse que la pre-incubación de células peritoneales obtenidas de ratas normales o estimuladas con adyuvante de Freund con suero de rata inmune sí influye en su comportamiento frente a las amibas de cepa HM-1.

Prueba de Inmunización de las Ratas Inyectadas con  
Antígenos Amibianos

Los sueros de los animales inmunizados con amibas de la cepa HM-1 se probaron por doble inmunodifusión en agar; los 12 animales revelaron una o dos bandas de pre-



Figura 8



cipitación con identidad. El suero de una rata inmunizada también se probó contra antígenos de HM-1, de HK-9 y de E. invadens. Se observaron dos bandas de precipitación contra HM-1, una sola banda contra HK-9 y una banda contra E. invadens (Fig. 8).

## DISCUSION

Esta Discusión consta de tres partes: en la primera se comentan los resultados y se ofrecen distintas hipótesis para explicarlos, en la segunda se comparan con otros datos relevantes de la literatura, y en la tercera se señalan algunos experimentos que podrían contribuir a resolver varias de las preguntas surgidas de esta tesis.

### Parte 1

#### Resumen de los Resultados

Los datos anteriores pueden resumirse señalando que las células peritoneales obtenidas de ratas previamente inmunizadas con antígenos de E. histolytica (cepa HM-1) y enriquecidas en macrófagos por adherencia al vidrio, poseen en forma estadísticamente significativa mayor capacidad para matar amibas cuando se co-incuban in vitro con ellas, en comparación con células peritoneales provenientes de ratas normales o estimuladas inespecíficamente. Tal aumento en capacidad amebicida es independiente del número de células peritoneales agregadas,

muestra cierta especificidad y sí parece depender de com  
ponentes séricos.

#### Naturaleza de la Población de Células Peritoneales

La población de células peritoneales obtenida con el procedimiento descrito en Material y Métodos consiste de > 90 por ciento de macrófagos. Con el microscopio de luz estas células miden de 20 a 50 u de diámetro, muestran citoplasma abundante con ondulaciones en la membrana plasmática, numerosas vacuolas y otros organelos, especialmente lisosomas, mayor concentración de varias hidrolasas y aumento en su capacidad fagocítica; en otras palabras, se trata de macrófagos "activados" (20-22). El resto de las células presentes está constituido por elementos más pequeños, redondeados y con escaso citoplasma, que generalmente se identifican como linfocitos. Sin em  
bargo, cuando la población de células peritoneales se examina histoquímicamente o por microscopía electrónica resulta que entre los elementos más pequeños también hay macrófagos, mientras que algunas de las células mayores son claramente de estirpe linfoide. Por lo tanto, aunque se trata de una población celular enriquecida en macrófa  
gos, es realmente heterogénea y contiene una proporción < del 10 por ciento de elementos linfoides.

La comparación de las células peritoneales obtenidas de cada uno de los tres grupos de animales usados en

3. La diferencia en la resistencia de las células peritoneales inmunes a la destrucción por amibas, en comparación con células normales o estimuladas inespecíficamente, sólo es estadísticamente significativa en la proporción 1:1; cuando se aumenta el número de células peritoneales a 10:1 y a 30:1 esa diferencia desaparece.

Otra forma de inmunidad celular es la mediada por anticuerpo<sup>25</sup>; el mecanismo postulado es que el anticuerpo se fija al elemento portador del antígeno y sirve de marcador, ya que es reconocido por las células efectoras (células K, que poseen receptores de Fc); sin embargo, tal mecanismo puede excluirse en experimentos in vitro, como los incluidos en esta tesis, en los que no se usó suero de rata. Otra variedad de este tipo de inmunidad celular es la mediada por anticuerpos citofílicos, que se fijan por el fragmento Fc a los receptores específicos que poseen los macrófagos para ese fragmento de la IgG, confiriéndole a esas células especificidad en su capacidad destructiva<sup>26,27</sup>. En un experimento se intentó explorar esta posibilidad preincubando células peritoneales normales con suero de rata inmune antes de co-incubarlas con amibas y el resultado fue positivo. De todos modos, la interpretación del fenómeno como debido a inmunidad celular mediada por anticuerpos no explica la fal-

ta de aumento en el número de amibas muertas + desaparecidas al incrementar la proporción de células peritoneales inmunes co-incubadas de 1:1 a 10:1 y a 30:1.

### Mecanismo de Destrucción de las Amibas por las Células Peritoneales

Aunque en esta tesis no se exploraron los posibles mecanismos de destrucción de las amibas por las células peritoneales, es posible señalar tres puntos de interés:

1) En primer lugar, las células peritoneales normales y las estimuladas inespecíficamente también destruyen amibas, aunque en proporción menor que las inmunes; por lo tanto, hay dos posibilidades para explicar el aumento en la capacidad amebicida de las células inmunes: o se trata del mismo mecanismo que poseen las células no inmunizadas, incrementado sólo cuantitativamente, o la inmunidad agrega un mecanismo nuevo y diferente de destruir amibas. Esta segunda posibilidad quizá contribuirá a explicar uno de los resultados más interesantes de estos experimentos, que es la falta de relación entre el aumento en el número de células peritoneales inmunes y su acción amebicida, relación que sí se observó con células peritoneales normales y estimuladas inespecíficamente.

2) En segundo lugar, el efecto amebicida de las células peritoneales requiere tiempo y es acumulativo, como pudo demostrarse en los experimentos de sólo 2 horas

de incubación, que arrojaron cifras intermedias de destrucción de amibas entre el tiempo 0 y las 4 horas de incubación.

3) En tercer lugar, el mecanismo de destrucción de amibas por células peritoneales no incluye a la fagocitosis, por simples razones de tamaño, aunque no puede excluirse que una vez muertas las amibas puedan ser fagocitadas en fragmentos por los macrófagos. Esta consideración se apoya en el hecho de que las amibas desaparecidas siempre fueron una proporción mucho menor que las células peritoneales desaparecidas.

#### ¿Existen Dos Poblaciones Diferentes de Amibas?

Una posible explicación al hecho de que el número total de amibas destruidas por células peritoneales inmunes al cabo de 4 horas de co-incubación sea independiente de la proporción de células agregadas (1:1, 10:1 ó 30:1) y siempre el mismo (con variaciones no significativas estadísticamente) pudiera ser que existan dos poblaciones diferentes de amibas: las susceptibles al mecanismo inmune de destrucción y las no susceptibles a tal mecanismo. Si esto fuera cierto, bastaría con postular que las amibas destruidas en la co-incubación con células inmunes en la proporción 1:1 son todas las susceptibles (o sea que el efecto es el máximo posible), para explicar satisfactoriamente que al aumentar el número de

células inmunes ya no se incremente el número de amibas destruidas.

#### Acción de las Amibas Sobre las Células Peritoneales

La capacidad de las amibas para destruir células peritoneales es formidable y puede apreciarse cuando se consideran los números totales de células desaparecidas al término de la co-incubación de 4 horas con amibas: cuando se agregaron 50,000 células peritoneales a 50,000 amibas, la destrucción no pasó del 10 por ciento, o sea que desaparecieron entre 0 y 5,000 células; en cambio, cuando se agregaron 500,000 células desaparecieron entre el 20 y el 25 por ciento, o sea entre 100,000 y 135,000 células, por lo que cada amiba debe haber destruido entre 2 y 3 células; finalmente, cuando el número de células agregadas fue de 1,500,000 desaparecieron entre el 25 y el 30 por ciento, o sea entre 325,000 y 390,000 células, por lo que cada amiba debe haber destruido entre 6 y 7 células.

El examen en fresco de las amibas y las células peritoneales al término de las 4 horas de co-incubación, así como de los frotis fijados y teñidos de las mismas muestras, mostró con mucha frecuencia amibas viables con 4 o más núcleos de células peritoneales en el citoplasma; la cuenta máxima fue de 11 núcleos, pero estas observaciones no fueron sistemáticas sino ocasionales. De to-

dos modos, permiten sugerir que, en abierto contraste con la acción de los macrófagos sobre las amibas, donde la fagocitosis no parece contribuir en forma preponderante, al considerar el mecanismo de la acción de las amibas sobre los macrófagos la fagocitosis deberá desempeñar un papel central aunque desde luego no el único; en vista de que también se observaron células peritoneales muertas y no fagocitadas.

Otro resultado que también llama la atención es que las amibas destruyeron los mismos números de células peritoneales, independientemente de que provinieran de animales normales, estimulados inespecíficamente, o inmunizados, excepto cuando se co-incubaron células inmunes y amibas en proporción 1:1, en que el número de células peritoneales vivas fue significativamente mayor desde un punto de vista estadístico que el número de células normales o estimuladas inespecíficamente que sobrevivieron cuando se incubaron con amibas en la misma proporción 1:1. La explicación de este hecho no es fácil, pero puede sugerirse que es el resultado de tres factores actuando en forma simultánea: 1) las acciones mutuamente nocivas ejercidas por amibas y células peritoneales se ejecutan sólo cuando ambos elementos se ponen en contacto; 2) la célula peritoneal inmune posee mayor capacidad de prevalecer sobre la amiba en el primer contacto, pero si los contactos se repiten la oportunidad de que la célula pe-



ritoneal inmune se encuentre con una amiba no susceptible irán en aumento, como consecuencia de la merma inicial de las amibas susceptibles; 3) en proporciones de co-incubación de 1:1, el número de encuentros entre células peritoneales y amibas debe ser mucho menor que en proporciones 10:1 y 30:1, por lo que podría esperarse que al final hubiera un número mayor de células peritoneales vivas; en cambio, con la disminución progresiva de amibas susceptibles y el consecuente aumento en la probabilidad del encuentro de células peritoneales inmunes con amibas no susceptibles, el resultado final debería tender a igualarse con los datos de la co-incubación de células peritoneales normales o estimuladas inespecíficamente en proporciones 10:1 y 30:1. Esto fue precisamente lo que se observó.

## Parte 2

### Estudios de la Interacción In-Vitro de E. Histolytica con Diferentes Células de Mamíferos

La Tabla 10 es un resumen ordenado cronológicamente de los principales estudios publicados hasta la fecha en la literatura internacional sobre la interacción de diferentes cepas de E. histolytica sobre distintos tipos de células de mamíferos<sup>28-50</sup>.

Los objetivos de estos estudios han sido diferentes:

mientras unos autores han descrito la morfología de la interacción, incluyendo la fagocitosis de las células por las amibas<sup>29-38,40,50</sup>, otros han examinado los mecanismos del daño producido por las amibas en las células, incluyendo adherencia y muerte<sup>39,41-49</sup>. Los tipos de células utilizadas han sido variables: eritrocitos<sup>30-32,42</sup>, leucocitos polimorfonucleares<sup>28,29,33,46</sup>, linfocitos<sup>18,35,47</sup>, monocitos<sup>49</sup>, células peritoneales<sup>18</sup>, células de riñón (RK-13<sup>34,40</sup>; MDCK<sup>41,45,50</sup>), células hepáticas (Chang)<sup>37,39</sup>, células ováricas (CHO)<sup>44</sup>, células epiteliales intestinales<sup>36</sup>, y otras<sup>38,43</sup>. También las especies animales de donde se han obtenido estas células han sido numerosas: humana, carnero, conejo, pollo, cobayo, rata, mono, hamster, rana, tortuga, paloma, gallo, gato, perro. Las cepas de amibas usadas por los distintos autores incluyen E. histolytica (HM-1, HM-2, HM-3, HM-19, HM-22, HM-27, HK-9, PNH-5, PNH-6, SFL-3, IP-106-L2, AX-200, SF, Moore, Evans, SVL, Laredo), E. moshkowskyi, E. invadens, E. coli, y Acanthamoeba sp. La gran mayoría de los autores han hecho las incubaciones con cultivos axénicos de amibas; sólo hay cuatro publicaciones que señalan haber usado cultivos monoxénicos<sup>35,36,42,48</sup>.

Las condiciones de incubación han sido también variables: los tiempos han oscilado desde 1 minuto hasta 72 horas<sup>28,30</sup>, pero un buen número de trabajos se han reali

Tabla 10

INTERACCION IN-VITRO DE E. HISTOLYTICA CON DIFERENTESCELULAS DE MAMIFEROS

CEPAS USADAS			CELULAS		TECNICA DE ESTUDIO		RESULTADOS	REF.
HM1	HK9	Otras	Especie	Tipo	Tiempo de incubación			
		E.histolytica: SF y Moore E. coli Acantamoeba sp.	Humanos Carnero Conejo Cobayo Pollo	Leucocitos	1 min.	Mezcla de leucocitos y amibas, se observaron con microscopio de con- traste de fase	La movilidad y actividad de superficie leucocitaria disminuyó gradualmen- te por la toxicidad de E. histolytica	28
		SLV E.moshkovski	Humanos	P.M.N.	2 hr.	Se agregan trofozoitos a los leucocitos, se observaron con micros- copio de luz	El trofozoito móvil cau- sa la alteración, de na- turales enzimática	29
	+		Humanos	Eritrocitos	6, 12, 24, 48, 72 hr.	Trofozoitos y eritrocí- tos en suspensión, co- locados en lámina para observación en micros- copio de luz	La capacidad eritrofági- ca es extraordinaria, sin modificar otras fun- ciones celulares	36
	+		Humanos	Eritrocitos	5 min.	Trofozoitos y eritrocí- tos en suspensión, co- locados en lámina para observación en micros- copio de luz	La eritrofagia es un fe- nómeno dinámico	32
		HM-2 IMSS	Rana Gato Tortuga Gallo Paloma Perro Conejo Mono Cobayo	Leucocitos	30 min. a 4 hr.	Trofozoitos y eritrocí- tos en suspensión, co- locados en lámina para observación en micros- copio de luz	La amiba se desplaza ha- cia el eritrocito y exhi- be citopatogenicidad y fagocitosis. Los leucoci- tos sólo atacan cuando la amiba está dañada	33

HM-2'	Humanos : G1 control G2 inicial G3 enfermo G4 curado	Linfocitos		Trofozoitos y células en suspensión, se usa la técnica de la exclusión del azul tripano y el microscopio de luz	G1 y 2 son fagocitados por las amibas. G3 contienen factor citotóxico que mata trofozoitos. G4 efecto citotóxico. 1 hora 33% muerte. 24 horas 100% muerte. El fenómeno es de inmunidad celular	35
HM-19	Hamster	Células aisladas de <u>mu</u> cosa de <u>cie</u> go y colon	5 min. 3, 12, 48 hr.	Mezcla de ambas poblaciones, se observaron en microscopio (C.F.)	Agresión rápida de los trofozoitos sobre las células: citolisis y fagocitosis	36
HM-19	Hamster	Células hepáticas aisladas	1, 3, 12, 48 hr.	Mezcla de ambas poblaciones, se observaron en microscopio (C.F.)	La acción citopática, de integración y lisis fue en 15 a 20 min, luego fueron fagocitadas por las amibas	37
Evans	Rata Mono	BD-VI hígado CV-1 riñón	15-30 min.	Inoculación de amibas en monocapas celulares; se usó microscopio electrónico para observación	La fagocitosis ocurre con células que tienen su membrana intacta; es necesario el contacto	38
Evans	Conejo	RK-13 riñón	15-45 min.	Inoculación de amibas en monocapas celulares; se usó microscopio electrónico para observación	El cambio osmótico progresivo, lleva al daño membranar de las células. La acción tóxica de la amiba es bloqueada por un inhibidor de la fosfolipasa A	40
HM-2	Cobayo	Láminas de epitelio cecal	30, 60, 90 min.	Se agregaron las amibas a las láminas; se observaron por microscopía electrónica	En el proceso citopático; primero entra en contacto con la membrana lateral de las células y luego fagocita porciones de la célula dañada. Penetran por la región luminal del epitelio	51

+	HM2 IMSS HM3 IMSS E.histolytica tipo Laredo	Mono	MDCK Morfología y fisiología semejante a epitelios simples	1 hr.	Mezcla de las amibas con las células, en lámina se midió el paso de la luz a través de la preparación	El efecto citopático dependió de la cepa E. histolytica empleada. HM1 100% daño. HM2 44% daño. HM3 19% daño. E. histolytica Laredo no fue dañina	41
+	HK 9 H4 PN H5 PN H6	Hamster	Monocapas de células de riñón			La citotoxicidad de la amiba requiere contacto amiba-célula blanco; se debe a toxinas liberadas al desintegrarse la amiba	42
+		Hamster Humanos	CHO células de ovario Eritrocitos	2 hr.	Trofozoitos y células en suspensión, se utiliza la técnica de la exclusión del azul tripano para observar en microscopio de luz	La adherencia de la amiba a la célula blanco, requiere de una función de microfilamento, tiene un receptor específico GAINAC y es requerido para lisar células	43
+	+	Humanos	Línea celular epitelial intestinal	15 min.	Los trofozoitos se colocaron en la monocapa celular, pero se les adicionó movimiento rotacional	La adhesión de E. histolytica a células huéspedes, es mediada por una lectina en la membrana de la amiba	44
+	303	Humanos	P.M.N.	22 hr.	Ambas poblaciones fueron centrifugadas juntas, se les permitió tener contacto célula-célula, se observaron por la técnica de exclusión del azul tripano en microscopio de luz	Es importante el contacto, el metabolismo oxidativo no parece ser esencial. > 200 PMN/amiba: los PMN matan a la amiba menos virulenta. 3000 PMN/amiba: no reduce a la cepa virulenta. 100 PMN/amiba: HM1 destruyó todos los PMN	45
	IP-106-L2 E.histolytica	Hamster	C. esplénicas Linfocitos C. peritoneales	24 hr.	Los trofozoitos en suspensión se mezclaron con las células; técnica de la exclusión del azul tripano; microscopio de luz	Los trofozoitos de E. histolytica en cultivo, son destruidos por linfocitos sensibilizados y por macrófagos	18

+	SF L3	K 562 Eritroleucemia	10 min.	Las amibas y células blanco se centrifugaron juntas y midieron lisis por liberación de $^{51}\text{Cr}$	Es necesario un contacto estable entre amibas y célula blanco para la citotoxicidad. Hay menos lisis, cuando las células están en suspensión	48
+		Humanos P.M.N. Monocitos Mononucleares Macrófagos	3 hr.	Incubación de trofozoitos y célula en suspensión, luego resuspendidos y mezclados y por medio de la técnica del azul tripano se observaron al microscopio de luz. Indium Oxine	Los macrófagos mataron a los trofozoitos de E. histolytica a través de un mecanismo dependiente de contacto e independiente de anticuerpos	49
+	+	Ratón Linfocitos de bazo	4 hr.	Los linfocitos se marcaron con $^{51}\text{Cr}$ y se mezclaron con amibas, se determinó el porcentaje de lisis específica	La actividad citotóxica es dependiente de la cepa utilizada, de la fase de crecimiento y de la proporción de amiba por célula blanco probada	47

zado entre 30 minutos y 4 horas; las co-incubaciones se han hecho en suspensión<sup>18,32,35,39,49</sup> o después de haber centrifugado los tubos a bajas velocidades y por corto tiempo<sup>44,46</sup>, aunque varias descripciones de la fagocitosis de células por amibas se hicieron en preparaciones selladas con parafina<sup>28,29,33,36,37</sup>. Las proporciones de los elementos incubados con las amibas casi siempre son de un gran exceso de células (100:1-2,000:1). Dependiendo del objetivo del estudio, los resultados se examinaron con microscopio de luz (contraste de fase)<sup>28,29,35,36,37</sup>, microscopio electrónico<sup>31,32,34,40,50</sup>, liberación de Cr radioactivo<sup>39,47,48</sup>, o exclusión del azul tripán<sup>18,35,42,44,49</sup>.

En sólo dos artículos se incluyó un examen del efecto de la inmunidad en la interacción célula:amiba. Los primeros en estudiarlo fueron Guerrero, Ríos y Landa<sup>35</sup>, quienes en 1975 incubaron cultivos monoxénicos de E. histolytica cepa HM-2 con linfocitos obtenidos de sangre periférica de cuatro grupos humanos:

- G1, controles no amibianos (sanos)
- G2, amibiasis inicial (1-5 días)
- G3, amibiasis establecida (6-30 días)
- G4, amibiasis curada

Las proporciones de la incubación fueron de 200:1 (linfocitos:amiba) y se observaron durante 24 horas con contra

te de fase y la técnica de exclusión del azul tripán. En los grupos G1 y G2 los linfocitos fueron fagocitados y destruidos por las amibas; en el grupo G3 también hubo fagocitosis de linfocitos pero las destruidas fueron las amibas, sugiriendo que los linfocitos inmunes tienen un factor tóxico para ellas; en cambio, en el grupo G4 no hubo fagocitosis y se observó que a 1 hora de incubación el 33% de las amibas ya habían muerto mientras que a las 24 horas el 100% de las amibas estaban muertas. Los autores concluyeron que el fenómeno se debe a inmunidad celular.

El otro trabajo que explora la influencia de la inmunidad en la interacción célula:amiba es de Ghadirian y Meerovitch<sup>18</sup>, quienes en 1982 usaron linfocitos, células esplénicas y células peritoneales de hamsters normales e inmunizados contra E. histolytica cepa IP-106-L2; las incubaciones se hicieron por 24 horas en proporción 5:1 (células:amiba) y por medio de la exclusión del azul tripán se demostró que las células inmunes destruyen a las amibas mientras las células normales son destruidas por ellas.

Ninguno de estos dos trabajos contiene información que permita resolver algunos de los problemas mencionados en la Parte 1 de esta Discusión; en cambio, los datos son paralelos en general a los descritos en este te-



sis. Un hecho interesante es que tanto Guerrero et al<sup>35</sup> como Ghadirian y Meerovitch<sup>18</sup> observaron que las células provenientes de sujetos curados de amibiasis o de hamsters inmunizados no sólo destruyen a las amibas sino que además son más resistentes a ellas, lo que también se observó en los experimentos realizados con CP de ratas inmunes pero sólo en la proporción 1:1. Es posible que la explicación de esta diferencia sea (aparte de que los autores mencionados sólo usaron una proporción de células: amibas en sus experimentos) el hecho de que conservaron sus incubaciones en suspensión, mientras que en los experimentos con CP de ratas normales, estimuladas inespecíficamente o inmunes las incubaciones se hicieron con movimiento continuo. Si, como se ha señalado por otros autores, el efecto de las células sobre las amibas y viceversa depende del contacto directo, es obvio que el movimiento continuo de los tubos con células suspendidas disminuirá la duración de los contactos por debajo de la determinada por la pura suspensión. El número de contactos será mayor mientras mayor sea el número de células en suspensión, lo que multiplica las oportunidades de que las amibas se encuentren con células y las fagociten y/o destruyan, aunque tales células sean más resistentes.

Salata et al<sup>49</sup> encontraron en 1985 que los macrófagos humanos "activados" son capaces de matar amibas in

vitro en una proporción significativamente mayor que los macrófagos no "activados"; en cambio, en los experimentos con CP de rata, no se observaron diferencias entre los elementos obtenidos de animales normales y los estimulados inespecíficamente con adyuvante de Freund. La explicación más probable de esta discrepancia es que tanto las CP normales como las estimuladas inespecíficamente son igualmente "activadas", en vista de que ambas fueron obtenidas cuatro días después de la inyección de proteosa peptona en la cavidad peritoneal. Como las ratas inmunes fueron inyectadas con amibas emulsificadas en adyuvante de Freund, el uso de un grupo control de animales inyectado sólo con adyuvante de Freund era mandatorio, pero no debe sorprender que los datos obtenidos con CP de este grupo no difieran de los observados con CP derivadas de ratas normales, en vista de que ambas están "activadas".

### Parte 3

Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren las siguientes preguntas, que deberán contestarse experimentalmente para explorar más a fondo el fenómeno descrito:

- 1) ¿Cuál es la naturaleza de las CP?

La caracterización de las CP sólo se ha hecho morfo

lógicamente y con el microscopio de luz, tanto en fresco como en frotis fijados y teñidos. Debe hacerse también por medio de reacciones histoquímicas específicas para macrófagos (esterasas) y con el microscopio electrónico. Para examinar los subtipos de linfocitos presentes en la preparación de CP de rata no se cuenta (como sí ocurre con el ratón) con anticuerpos monoclonales.

2) ¿Qué efecto tiene la incubación de las CP en el medio TYI-S-33 sobre su capacidad fagocítica?

Aunque la incubación de CP por 4 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> no tiene ninguna influencia sobre su viabilidad, no se ha examinado su actividad de fagocitosis, que sería una medida de su integridad funcional. Este estudio debe hacerse en forma comparativa, con CP normales, estimuladas inespecíficamente e inmunes, tanto en medio TYI-S-33 como en medio RPM-1, que es el medio estándar para CP.

3) ¿Cuál es la cinética de la interacción CP-amibas in vitro en el tiempo?

Aunque se hicieron unos experimentos incubando 2 horas en lugar de 4 y los resultados fueron intermedios entre el tiempo 0 y las 4 horas, debe hacerse una curva con varios puntos más (15 y 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 24 horas) con las tres proporciones CP: amibas (1:1, 10:1 y 30:1) para establecer si las 4 horas

son el tiempo óptimo. Esta curva también permitirá apreciar la duración del efecto de las amibas sobre las células y de las células sobre las amibas, que probablemente sea diferente.

4) ¿Qué efecto tiene la agitación continua sobre el fenómeno?

Una de las hipótesis postulada arriba es que la agitación continua disminuye la duración de los contactos entre CP y amibas y por lo tanto amplifica el fenómeno, permitiendo detectarlo en proporciones muy bajas de CP. Esta hipótesis puede ponerse a prueba haciendo experimentos paralelos con y sin agitación, e incluyendo tubos con centrifugación, para comparar el efecto de empacar CP y amibas.

5) ¿Cuál es el efecto del medio condicionado de CP inmunes sobre la interacción de CP normales con amibas?

Para explorar si las CP inmunes cuando se ponen en contacto con amibas, liberan al medio factores capaces de modificar el comportamiento de CP normales o estimulan inespecíficamente.

6) ¿Cuál es la ultraestructura del fenómeno?

Aunque existen muchos estudios sobre la ultraestructura de la interacción de amibas con diferentes tipos de células, no se ha examinado tal interacción con células

inmunes, especialmente en circunstancias en que las amibas no destruyen y fagocitan a las células (1:1).

7) ¿Cuál es el efecto de inmunizar a las ratas con E. histolytica HK-9 o E. invadens y después incubar sus CP con amibas HM-1?

Aunque la especificidad del fenómeno se examinó incubando CP de ratas inmunizadas con E. histolytica cepa HM-1, con amibas de la cepa HK-9 y con E. invadens, el experimento inverso no se ha hecho y podría revelar alguna diferencia con el resultado obtenido.

Desde luego, una de las preguntas más interesantes es si las CP normales y estimuladas matan a las amibas por el o los mismos mecanismos que las CP inmunes, que entonces simplemente estarían amplificadas, o si el estado inmune agrega nuevos mecanismos de agresión a las CP. Sin embargo, los mecanismos de agresión de las CP contra las amibas apenas si se están empezando a examinar; lo único que se sabe hasta ahora es que es necesario el contacto con la amiba, y que hay mecanismos dependientes e independientes de oxígeno.

## REFERENCIAS

1. Walsh, J.A. y Warren, K.S.: Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing countries. *New Eng. J. Med.* 301: 967-974, 1979.
2. Martínez Palomo, A., y Martínez Bñez, M.: Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 5: 1093-1102, 1983.
3. Sepúlveda, B., y Martínez-Palomo, A.: Amebiasis, en Warren, K.S. y Mahmoud, A.A.F. (eds): Tropical and Geographical Medicine. McGraw-Hill Book Company, New York, 1984, pp. 305-318.
4. Pérez Tamayo, R., y Brandt, H.: Amebiasis, en Marcial Rojas, R.A. (ed): Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1971, pp. 145-187.
5. Martínez Palomo, A.: The Biology of Entamoeba histolytica. Baffins Lane: Research Studies Press/John Wiley and Sons, New York, 1982.
6. Sargeunt, P.G., Williams, J.E., y Greene, J.D.: The differentiation of invasive and non-invasive E. histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 519-521, 1978.

7. Sargeunt, P.G., Williams, J.E., Bhojnani, R., Kumate, J., y Jiménez, E.: A review of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13: (Suppl. 3) 89-94, 1982.
8. Sepúlveda, B.: Amebiasis: host-pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4: 1247-1253, 1982.
9. Elsdon-Dew, R.: The epidemiology of amebiasis. Adv. Parasitol. 6: 1-62, 1968.
10. Brandt, H., y Pérez Tamayo, R.: Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana, México, 1970.
11. Thompson, P.E.: Experimental amebiasis and chemotherapy. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2: 245-254, 1971.
12. Mattern, C.F.T., y Keister, D.B.: Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 402-411, 1977.
13. Diamond, L.S., Tanimoto Weki, M., y Martínez Palomo, A.: Production of cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9: (Suppl. 1) 223-228, 1978.
14. Ghadirian, E., y Meerovitch, E.: Macrophage requirement for host defence against experimental hepatic

- amoebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 4: 219-225, 1982.
15. Ghadirian, E., Meerovitch, E., y Kongshavn, P.A.L.: Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect. Immun.* 42: 1017-1019, 1983.
16. Stern, J.J., Graybill, J.R., y Drutza, D.J.: Murine amebiasis: the role of the macrophages in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 372-380, 1984.
17. Ghadirian, E., y Kongshavn, P.A.L.: Effect of silica on resistance of mice to Entamoeba histolytica infection. *Infect. Immun.* 45: 399-402, 1984.
18. Ghadirian, E., y Meerovitch, E.: In vitro amoebicidal activity of immune cells. *Infect. Immun.* 36: 243-246, 1982.
19. van Furth, R. (ed): Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology. Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1975.
20. Cohn, Z.A.: The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J. Immunol.* 121: 813-816, 1978.
21. Karnovsky, M.L., y Lazdins, J.K.: Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* 121: 809-813, 1978.



22. North, R.J.: The concept of the activated macrophage.  
J. Immunol. 121: 806-809, 1978.
23. Nathan, C.F., Murray, H.W., y Cohn, Z.A.: The macrophage as an effector cell. New Eng. J. Med. 303: 622-626, 1980.
24. Mackaness, G.B.: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. J. Exp. Med. 129: 973-992, 1969.
25. Simon, H.B., y Sheagren, J.N.: Cellular immunity in vitro. I. Immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity. J. Exp. Med. 133: 1377-1389, 1971.
26. Henney, C.S., y Gillis, S.: Cell-mediated cytotoxicity, en Paul, W.E. (ed): Fundamental Immunology. Raven Press, New York, 1984, pp. 669-684.
27. Silverstein, S.C., Steinman, R.M. y Cohn, Z.A.: Endocytosis. Ann. Rev. Biochem. 46: 669-772, 1977.
28. Jarumilinta, R., y Kradolfer, F.: The toxic effect of Entamoeba histolytica on leukocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58: 385-371, 1964.
29. Artigas, J., Otto, I., y Kawada, M.E.: Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chileno Parasitol. 21: 114-118, 1966.

30. Chévez, A., Iturbe-Alessio, I., Segura, M., y Corona, D.: Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3(Supl. 2): 275-286, 1972.
31. Eaton, R.D.P., Meerovitch, E., y Costerton, J.W.: The functional morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64: 299, 1970.
32. Treviño-García, N.M., Feria-Velazco, A., y de Chávez, I.R.: Eritrofagocitosis por Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 3(Supl. 2): 295-302, 1972.
33. Chévez, A., y Segura, M.: Interacción entre los trofozoitos de E. histolytica y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5(Supl. 2): 373-382, 1974.
34. Knight, R., Bird, R.G., y McCaul, T.F.: Fine structural changes at Entamoeba histolytica rabbit kidney cell (RK13) interface. Ann. Trop. Med. Parasitol. 69: 197-202, 1975.
35. Guerrero, M., Ríos, D., y Landa, L.: Interacción entre trofozoitos de Entamoeba histolytica y linfocitos de pacientes con amibiasis invasora, en Sepúlveda, B., y Diamond, L. (eds). Amibiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1976, pp. 518-528.

36. Chévez, A., Sepúlveda, B., Segura, M., Corona, D., y Díaz, J.: Fases iniciales de la acción patógena de E. histolytica sobre el colon del hamster. I. Confrontación de trofozoitos con células aisladas de la mucosa del colon, en Sepúlveda, B., y Diamond, L. (eds): Amibiiasis. IMSS, México, 1976, pp. 422-427.
37. Chévez, A., Sepúlveda, B., Segura, M., Corona, D., y Díaz, J.: Fases iniciales de la actividad patógena de Entamoeba histolytica sobre el hígado del hamster. I. Confrontración de trofozoitos con células hepáticas aisladas, en Sepúlveda, B., y Diamond, L. (eds): Amibiiasis, IMSS, México, 1976, pp. 471-476.
38. McCaul, T.F.: Transmission electron microscopy observations of phagocytosis in trophozoites of Entamoeba histolytica in contact with tissue culture cells. Zeit. Parasitenk. 52: 203-211, 1977.
39. McCaul, T.F., Poston, R.N., y Bird, R.G. Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens: chromium release from labeled human liver cells in culture. Exp. Parasitol. 43: 342-352, 1977.
40. McCaul, T.F., y Bird, R.G.: Surface features of Entamoeba histolytica and rabbit kidney (RK13) cell surface changes after trophozoite contact -

observations by scanning electron microscopy.

Internat. J. Parasitol. 7: 383-388, 1977.

41. Orozco, E., Martínez-Palomo, A., y López-Revilla, R.:  
Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de  
la virulencia de E. histolytica. Arch. Invest. Méd.  
(Méx.): 9(Supl. 1): 257-260, 1978.
42. Trissl, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de  
la Hoz, R., y Pérez Suárez, E.: Surface properties  
of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte  
phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med.  
148: 1137-1145, 1978.
43. Bos, H.J., Leijendekker, W.J., y van den Eijk, A.A.:  
Entamoeba histolytica: cytopathogenicity, including  
serum effects on contact-dependent and toxin-  
induced lysis of hamster kidney cell monolayers.  
Exp. Parasitol. 50: 342-348, 1980.
44. Ravdin, J.I., y Guerrant, R.L.: Role of adherence in  
cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica.  
J. Clin. Invest. 68: 1305-1313, 1981.
45. Kobiler, D., y Mirelman, D.: Adhesion of Entamoeba  
histolytica trophozoites to monolayers of human  
cells. J. Infect. Dis. 144: 539-546, 1981.
46. Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.  
A., Mandell, G.L.: Interaction between Entamoeba

histolytica and human polymorphonuclear neutrophilis.

J. Infect. Dis. 143: 83-93, 1981.

47. Arias-Negrete, S., y Calderón, J.: Actividad citotóxica de Entamoeba histolytica sobre células linfoides de bazo de ratón. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13: (Supl. 3): 217-222, 1982.
48. Hudler, H., Stemberger, H., Scheiner, O., Kollaritsch, H., y Wiedermann, G.: Entamoeba histolytica: I. Mechanismus der zytotoxischen Aktion. Tropenmed. Parasit. 34: 248-252, 1983.
49. Salata, R.A., Oearson, R.D., y Ravdin, J.I.: Interaction of human leucocytes and Entamoeba histolytica. J. Clin. Invest. 76: 491-499, 1985.
50. Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E., Fernández-Castelo, S., y Cervantes, A.: Structural bases of the cytolytic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32: 166-175, 1985.
51. Mora Galindo, J., Martínez-Palomo, A., y Chávez, B.: Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 261-274, 1978.