



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE SOBRE
LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN
UN MODELO DE AMIBIASIS
EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PASCUAL FLORES MARTINEZ

LOS REYES IZTACALA, MEXICO.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Sitio donde se desarrolló el tema:

DIVISION DE INVESTIGACION.
LABORATORIO DE INMUNOQUIMICA
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
"FEDERICO GOMEZ" S.S.

Asesor del Tema: M. en C. John Santiago Mejia Tabon.

Sustentante: Biol. Pascual Flores Martínez.

A MIS PADRES:

JOSE Y MARIA DE LA LUZ

A MIS HERMANOS:

Por su apoyo, confianza y cariño.

A MIS AMIGAS Y AMIGOS;

Por su amistad y motivación.

AL DR. JOSE IGNACIO SANTOS P.

Por su apoyo en todo momento, interviniendo importantemente en mi desarrollo académico.

AL DR. JOHN SANTIAGO MEJIA TOBON.

Por su valiosa asesoría e influencia en mi formación profesional.

AL DR. JESUS CASASOLA FLORES.

Por su apoyo y motivación.

AL DR. ANTONIO RAMIREZ VIDAL.

Por sus valiosas enseñanzas.

AL DR. PEDRO VALENCIA MAYORAL.

Por todas las facilidades que se me dieron en su laboratorio de Anatomía Patológica.

AL PERSONAL DE LABORATORIO DE:

INMUNOQUIMICA

Anatomía Patológica del Hospital Infantil de México

Federico Gómez S.S.

INTERBIOL. S.A.

Por su amistad y colaboración.

Al. Q.B.P. RODOLFO GOMEZ DOMINGUEZ

Por su gran asesoría en la revisión del manuscrito

y todas las facilidades que se me dieron.

C O N T E N I D O

I.	INTRODUCCION.....	6
II.	HIPOTESIS.....	17
III.	OBJETIVOS.....	18
IV.	MATERIAL Y METODOS.....	19
	1. Cultivo axénico de trofozoítos de -----	
	<u>E. histolytica</u>	19
	2. Animales.....	21
	3. Formación de coágulos conteniendo trofozoí tos viables de <u>E. histolytica</u>	21
	4. Esquema de inoculación e implante.....	22
	5. Cuantificación de la Quimioluminiscencia..	23
	6. Hemaglutinación indirecta. (HAI).....	25
	7. Histopatología.....	29
V.	RESULTADOS	33
VI.	DISCUSION.....	52
VII.	CONCLUSIONES.....	59
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	60

I. INTRODUCCION.

Entamoeba histolytica, es un protozoario con pseudópodos que pertenece al filum Sarcodina, clase Rhizopodea, subclase Lobosia, orden Amoebida, familia Endomoebidae, género Entamoeba (1).

El trofozoíto de este organismo mide 7 y 60 μ m (promedio 25 μ m) de diámetro (1). En el citoplasma (generalmente bien diferenciado) ocurre la formación de lobopodos digitiformes en forma eruptiva, con movimientos unidireccionales y progresivos. El núcleo vesicular aparece como un anillo fácil de identificar mediante microscopía de contraste de fases (2,3,4).

El endoplasma de E.histolytica contiene en alto complejo vacuolar y sistema tubular relacionado a los procesos pinocíticos (3).

Estudios realizados de la estructura ultramicroscópica de E.histolytica, han revelado el escaso desarrollo de los organillos citoplasmáticos de células eucarióticas p.e. mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtubulos (5,6,7). El retículo endoplásmico hasta poco desarrollado, y los ribosomas generalmen

te se encuentran libres en el citoplasma. En cambio, otra clase de organelos, las vacuolas, son muy numerosas en el citoplasma, la mayor parte de ellas son vacuolas digestivas; otras probablemente son lisosomas (7). La motilidad celular en amibas ha sido relacionada con proteínas contráctiles del tipo de la actinmiosina (8). El núcleo tiene un diámetro de 4-7 μm y la membrana nuclear muestra una doble membrana interrumpida por numerosos poros nucleares de aproximadamente 65 nanómetros de diámetro con una densidad media de 35 poros por micrómetro cuadrado (5). El núcleo teñido muestra una membrana, inmediatamente adosada a ella gránulos periféricos, un endosoma relativamente pequeño localizado centralmente sobre una matriz difusa conteniendo granulos dispersos de cromatina (9).

La multiplicación, tanto de las formas comensal e invasora es por división binaria. El enquistamiento se realiza siempre en el interior del intestino grueso. Los quistes son generalmente esféricos, pero pueden tomar la forma ovoide o ligeramente asimétrica. Su diámetro varía según pertenezcan a una o a otra de las diferentes capas de E. histolytica que se conocen; generalmente son de 5 a 20 micras de diámetro (9,10).

El ciclo biológico de E.histolytica consta de las fases de trofozoïto, prequiste, metaquiste y quiste. La primera es la infectiva, las dos siguientes son intermedias y el quiste es la forma resistente e infectante (II). En el proceso de exquistamiento, la amiba tetranucleada emerge de un quiste a través de un poro pequeño de la pared del quiste. La amiba metaquística tetranucleada produce una generación nueva de trofozoïtos mediante una serie diversa de divisiones nucleares y citoplásmicas generalmente ocho amébulas uninucleadas (9).

E.histolytica es esencialmente anaeróbica y en cultivo requiere de un bajo potencial de óxido reducción para crecer. Sin embargo, son capaces de consumir oxígeno aún careciendo de mitocondrias (12,13) y crecer en una atmósfera conteniendo oxígeno arriba del 5% (14).

El cultivo de E.histolytica en medios artificiales se ha logrado cronológicamente en tres etapas: Los cultivos polixénicos donde el cultivo del parásito se realiza en asociación con la flora bacteriana intestinal (15). Los cultivos monoxénicos, se logran en asociación con una especie bacteriana como la Bacteroides

symbiosus (16) o con el protozoario Trypanosoma cruzi (17). Los cultivos axénicos de E.histolytica se realizan sin la asociación con otros microorganismos y se iniciaron en 1961 (18). El cultivo axénico amibiano ha sido importante para realizar estudios bioquímicos e inmunológicos sobre E. histolytica (19).

Los medios de cultivo más usados con éxito son los monofásicos TP - S - I (tripticosa Panmede suero-vitaminas) y el TYI - S - 33 (Trypticosa - Extracto de levadura - Hierro - Suero). (20,21,22).

Los mecanismos de virulencia de E.histolytica incluyen la producción de enzimas u otros productos citotóxicos: hialuronidasa, colagenasa, hemolisina, fosfatasa ácida, fosfolipasa, tripsina, amilasa, maltasa, glutaminasa, estearasa y deshidrogenasa succínica, deshidrogenasa málica, diaforasa alcalina, ribonucleasa (23,24,25), una actividad fagocítica extraordinaria (4); citotoxicidad mediada por contacto (26); altos indicios de recambio en la membrana (27); aglutinación con concavalina (28); aumento de virulencia al cultivar en presencia de bacterias o colesterol (29); mimetismo antigénico (30); composición lipídica del parásito (11) inducción de respuesta humoral policlonal (31); actividad de colagenasa inhibible por suero (32).

E. histolytica tiene propiedades citotóxicas y puede causar la lisis de leucocitos dependientes de contacto. También se ha demostrado que el neutrófilo tiene propiedades citotóxicas y puede a su vez lisar los trofozoitos amibianos (33). Los trofozoitos son inmovilizados por suero inmune, sin embargo cuando se tratan por segunda vez con un mismo suero anti-amibiano, no presentan el fenómeno de inmovilización. Lo anterior puede deberse a cambios de los antígenos de superficie, la cual se encuentra relacionado con cierta capacidad para evadir la respuesta del sistema inmune (27).

La respuesta inmune del huésped hacia la amiba puede considerarse desde tres diferentes enfoques; como papel protector, como la capacidad para producir lesiones y el diagnóstico serológico de la enfermedad (34).

La expresión de la patogenicidad (virulencia) parece depender de factores del parásito y huésped.

Los factores significativos del huésped son los siguientes: Raza; los negros son infectados más frecuentemente que los blancos en Africa (35); Sexo; los abscesos hepáticos amibianos son tres veces más frecuentes en los hombres que en las mujeres (36); Dieta; la deficiencia en proteínas, altas dietas en

carbohidratos, incrementan la colonización amibiana en ratas (37).

Una ingesta excesiva diaria de leche tiene un efecto protector en humanos (38). Así también un exceso de colesterol incrementa la virulencia amibiana (11,29); Embarazo., Estudios en Nigeria han demostrado que es un factor predisponente para la amibiasis colónica (39); Stress., Su presencia en ratas las hace más susceptibles a la amibiasis (4); Estado inmunológico., mal nutrición y una terapia inmunosupresora provoca un decremento en la inmunidad mediada por células (41); Habitat., lugares en donde predomina la baja cultura de los habitantes, el hacinamiento, la promiscuidad y el fecalismo incrementan la frecuencia de pacientes en amibiasis (42); se ha visto que en países donde la enfermedad es endémica, ésta tiende a tener curso clínico mucho más leve en individuos nativos del país, no así en visitantes provenientes de áreas donde la amibiasis es muy rara. El efecto puede deberse a causas únicas o combinadas. La inmunidad adquirida puede ser un factor muy importante (43).

La Organización Mundial de la Salud define la amibiasis como la prevalencia de E.histolytica en

el interior de un huésped, la amibiasis puede ser asintomática en la mayoría de los casos o bien sintomática.

Martínez Baéz (44) divide la amibiasis de los humanos en invasiva y no invasiva. La amibiasis no invasiva, es la de aquellos individuos que tienen E.histolytica en el intestino grueso, sin presentar cuadro clínico y por lo mismo son llamados portadores sanos. En estos casos, los protozoarios viven como comensales en la luz del intestino, y los quistes son eliminados con las heces y son una fuente de contagio - tan importante como los enfermos con amibiasis invasora. La amibiasis invasora que designa todos los procesos patológicos causados por la penetración de amibas patógenas en los tejidos del hombre, puede presentarse con una localización intestinal y extraintestinal. La primera es la más frecuente y lesiona principalmente el colón descendente y el ciego. La amibiasis extraintestinal es una enfermedad más grave, poco frecuente, las lesiones generalmente son hepáticas, pulmonares, cerebrales y cutáneas (45).

La agresividad de E.histolytica sobre las células de la mucosa intestinal y leucocitos se basa en un mecanismo de acción doble; uno, la poderosa acti-

vidad citolítica ejercida por medio de sustancias que actúan al contacto directo con la célula blanca a cierta distancia. El otro mecanismo lo constituye la fagocitosis y la digestión rápida en las células ingeridas (19).

Estudios sobre las fases iniciales de la interacción entre trofozoítos de E. histolytica y la mucosa intestinal de cobayo, sugieren que los trofozoítos penetran la barrera epitelial del intestino exclusivamente en las zonas de menor resistencia mecánica representadas por las regiones interglandulares de descamación (46).

Algunas de las pruebas serológicas utilizadas para confirmar el diagnóstico de amibiasis extraintestinal son la inmunodifusión en gel agarosa, fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, aglutinación de látex, contrainmunoelectroforesis, ensayo inmunológico específico con enzimas ligada a anticuerpos (ELISA) y hemaglutinación pasiva (47).

La hemaglutinación pasiva e indirecta (HAI) es muy sensible ya que permite detectar pequeñas cantidades de anticuerpo, los eritrocitos de carnero al tratarse con una solución diluida de ácido tánico adque--

ren la propiedad de absorber proteínas antigénicas y una vez revestidos con ella son aglutinables por el antisuero específico dirigido contra la proteína absorbida (47).

Tanimoto y Cols (48) demostraron la formación de abscesos hepáticos en el hamster con inoculación directa con trofozoítos provenientes de cultivos axénicos, Tsutsumi y Cols (49) perfeccionaron el modelo al emplear la inoculación vía portal, logrando la reproducción constante de lesiones, que evolucionaron hacia abscesos en similares a los encontrados en las fases finales de la amibiasis hepática en el humano. Ambos modelos han servido de evidencia para demostrar la presencia de reacción inflamatoria en la amibiasis invasora, y según sus observaciones, esta reacción no sólo está presente en los estados iniciales de la lesión hepática, sino que la misma lisis de las células inflamatorias es lo que provoca la extensa destrucción del hígado. Seis horas después de instalarse las amibas al hígado, la reacción inflamatoria alrededor de los trofozoítos es notable y empieza a observarse lisis de las células inflamatorias, acentuándose rápidamente en el transcurso de las horas. Los leucocitos muertos

son substituidos por macrófagos, que finalmente son lisados. Esta inflamación granulomatosa evoluciona rápidamente hacia la necrosis; donde áreas cada vez más grandes del hígado se necrosan, las lesiones confluyen entre sí y producen al cabo de una semana uno o varios abscesos.

En 1971 Chévez y cols, representaron la actividad fibrinogénica y fibrinolítica de trofozoítos de E. histolytica sobre plasma humano (50).

En la amibiasis invasora existe un estadio de migración intravascular que le permite instalarse en tejidos extraintestinales principalmente en el hígado. También se ha visto de la existencia de mallas de fibrina alrededor de los trofozoítos en los estudios avanzados de la lesión intestinal (51). Así como la presencia de trombosis en la microvasculatura de la lámina propia intestinal (52, 53).

En el hombre como en otros seres vivos incluyendo los animales de experimentación, el papel del sistema de coagulación en la inflamación es notable; sirve como un detector de daño tisular, con capacidad para instalar rápidamente una barrera mecánica, terminando su activación en la formación de una malla de fibrina y plaquetas. Tal sistema brinda un soporte estructural sobre el cual pueden movilizarse las células

encargadas de la reparación tisular (54).

En procesos infecciosos, el sistema de coagulación permite además dirigir las defensas Celulares del huésped al foco de invasión (55).

Investigaciones previas en nuestro laboratorio, han permitido definir que trofozoítos viables de E. histolytica logran sobrevivir incluidos en coágulos de fibrina, siendo éste un modelo útil para caracterizar in vivo la dinámica inflamatoria específica como respuesta a E. histolytica.

II. HIPOTESIS

Durante la formación de abscesos hepáticos en hamsters inoculados intraportalmente existe una inflamación aguda. Entonces trofozoítos viables de E.histolytica incluidos en un coágulo de fibrina implantado subcutáneamente provocarán una respuesta inflamatoria específica hacia el protozoario.

PREGUNTAS.

Cómo es la dinámica inflamatoria y cómo influye la inmunidad humoral en hamsters previamente inoculados con trofozoítos viables de E. histolytica.

III. O B J E T I V O S.

Caracterizar la respuesta inflamatoria en un modelo de amibiasis experimental mediante la implantación de coágulos con trofozoítos amibianos viables incluidos.

Evaluar la influencia de la inoculación previa sobre las características del infiltrado inflamatorio en un modelo de amibiasis experimental.

IV. MATERIAL Y METODOS.

1. Cultivo axénico de trofozoítos de E.histolytica
E. histolytica cepa HM-I:IMSS se cultivó axénicamente en medio TYI-S-33 de acuerdo a la metodología descrita por Diamond (21).

1.1 Preparación del medio de cultivo.

Los constituyentes del medio de cultivo TYI-S-33 son:

Biosate peptone (BBI Microbiology Systems)	30 gr.
Dextrosa (Baker-México S.A.)	5 gr.
Cloruro de Sodio (Merck-México S.A.)	2 gr.
Fosfato Monobásico de Potasio (Baker-México SA)	0.6 gr.
Fosfato Dibásico de Potasio (Baker-México S.A.)	1 gr.
Cisteína (Merck)	1 gr.
Acido Ascórbico (Sigma-México S.A.)	0.2 gr.
Citrato Férrico de Amonio (Fisher Scientific)	0.0228 gr.

En un matrâz Erlenmeyer de 1000 ml verter 870 ml. de agua recién desionizada, agregar y disolver - cada uno de los reactivos.

Ajustar el pH a 6.8 con hidróxido de sodio IN.

Filtrar con papel whatman No. 1

Verter aproximadamente 75 ml. del medio en 10 frascos de vidrio de 125 ml. previamente lavados con extran líquido (Merck-México).

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Inactivar suero bovino (Microlab) por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. En condiciones de esterilidad agregar al medio 15 ml de suero bovino inactivado y 3 ml de mezcla vitamínica NCTC-107 (Microlab) en cada frasco.

1.2 Siembra y cosecha de los trofozoítos.

Tomar los tubos 13x100 (Pyrex) de cultivo de amibas que se encuentran en la fase logarítmica de su desarrollo y sumergirlos durante 5 min. en baño de hielo, con lo cual se favorece el desprendimiento de los trofozoítos de las paredes.

En 9 tubos 13x100 (Pyrex) agregar aproximadamente 10 ml. de medio de cultivo, inocular cada uno de los tubos con 150,000 amibas. Para obtener grandes cantidades de trofozoítos, se siembra en frascos de 75 ml los cuales sembrados con 300,000 amibas. Para cultivos de 250 ml se utilizan recipientes de 500 ml (COSTAR) se siembra en ellos la pastilla conteniendo aproximadamente 2,000,000 de amibas, obtenida del tubo de cultivo de amibas en crecimiento logarítmico y centrifugado a 2,000 rpm durante 5 min a 4°C.

En cualquiera de los casos, el inóculo se mezcla suavemente para homeneizar. Se incuban a 37°C durante 72 a 96 horas hasta que alcancen la fase logarítmica de crecimiento.

Para cosechar los cultivos, los recipientes se sumergen en baño de hielo durante 5 min. Las amibas se concentran mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min a 5°C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el paquete amibiano en 10 ml de solución salina 0.85% ó en amortiguador de fosfatos salino pH 7.2

2. Animales.

Se utilizaron en el estudio 30 hamster machos dorados (Mesocricetus auratus) de 8-10 semanas de edad, con un peso promedio de 80gr, mantenidos en el Bioterio del Hospital Infantil de México con productos purina (Purina, S.A.) y agua "ad libitum".

3. Formación de coágulos conteniendo trofozoítos viables de E.histolytica.

Los coágulos se obtuvieron mezclando 0.5 ml de una solución de fibrinógeno de cerdo (Sigma) a una concentración de 5 mg/ml en solución salina 0.85%, 0.5 ml de una suspensión de 1×10^6 trofozoítos vi-

vos de E. histolytica en solución salina 0.85% y 0.1 ml de trombina humana (Lafon) a una concentración de 1 u/ml.

4. Esquema de inoculación e implante (Ver esquema 1)

Los hamster en estudio se dividieron aleatoriamente en 6 grupos de 5 animales cada uno. Tres grupos fueron inoculados por vía intraperitoneal con una suspensión de 1×10^6 trofozoítos viables de E. histolytica. Los tres restantes sirvieron de testigo. De los grupos inoculados, el primero recibió una dosis de inoculación, el segundo dos dosis y el tercero tres dosis, con intervalos de 7 días entre los mismos. Ocho días después del último inóculo, previa anestesia con tiopental sódico (20 th. Century Chemical de México), se implantó en cada animal un coágulo de fibrina previa abertura de la cavidad abdominal subcutánea por medio de una incisión longitudinal aproximada de 2 cm. conteniendo en su matriz 1×10^6 trofozoítos viables de E. histolytica - cepa HM-I; IMS cultivados axénicamente en medio formulado por Diamond TYI-S-33.

Las incisiones subcutáneas fueron cerradas con sutura quirúrgica absorbible esterilizada (Ethicon). -

Una semana post-implantación, los animales fueron sacrificados previa anestesia en cámara de eter dietético (Merck-México), procediéndose a retirar los coágulos colocándose inmediatamente en viales de centelleo conteniendo 0.5 ml de solución de Hank's pH 7.2 y 0.1 ml de luminol 5-amino-2,3-dinitro 1,4-f talazinadiona ($C_8H_7O_2$) (Eastman Kodak Co). Se registró la quimioluminiscencia durante una hora en un contador de centelleo líquido (Packard-TRI-CARB-300C and 300CD).

Las unidades de quimioluminiscencia, cuentas por minuto (cpm) se calcularon determinando el área bajo la curva.

De cada uno de los hamsters se obtuvieron muestras de suero para determinar los niveles de anticuerpos antiamibianos por la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI).

5. Cuantificación de la quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia puede ser leída en un contador de centelleo líquido para partículas beta o en un luminómetro, este último es un equipo especialmente diseñado para pruebas de quimioluminiscencia (56).

Se utilizó un contador de centelleo líquido (Packard TRI-CARB-300C and 300 CD).

La detección de la emisión de fotones durante la fagocitosis (reportada por el contador como cuentas por minuto (CPM) se comporta con una cinética, la cual llega a un tope máximo para posteriormente ---- descender hasta su punto de partida, pudiéndose graficar como una curva.

Los resultados pueden expresarse como altura de un pico o como área baja la curva, siendo por ello necesario realizar cinéticas de producción de luz en cada experimento.

El contador de centelleo líquido Packard que se empleó, es un equipo que cuenta con programas definidos especialmente diseñado para la lectura de radiactividad. La energía de los fotones emitidos durante la fagocitosis coincidió con la producida por el H^3 y por ello es conveniente escoger un programa que incluya la región para lecturas de H^3 .

Como es importante trazar una curva de producción de luz, se programa el contador de centelleo líquido para que cada muestra la lea poco tiempo y durante ciclos repetidos.

6. Hemaglutinación indirecta. (HAI).

La técnica de hemaglutinación pasiva e indirecta - (HAI), es muy sensible que permite detectar pequeños títulos de anticuerpos.

Los eritrocitos de carnero son tratados con una solución diluída de ácido tánico y adquieren la propiedad de absorber proteína y una vez revestidos con ella son aglutinables por el antisuero específico dirigido contra el antígeno absorbido (57).

El reactivo de HAI utilizado fue preparado con antígeno de E.histolytica cepa HM-I:IMSS.

6.1 Soluciones.

a) Anticuagulante de Alsever.

Disolver 2.5 gr de dextrosa, 0.8 gr de citrato de sodio (dihidratado), 55 mg de ácido cítrico (monohidratado) y 420 mg de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada.

Esterilizar 10 min 10 libras de presión a 121°C.

b) Glóbulos rojos de carnero.

Mezclar la sangre de carnero con un volumen igual de anticoagulante de Alsever guardar a 4°C. Se utilizan los eritrocitos de 8 a 21 días de almacenaje, se descartan antes

si presentan hemólisis.

c) Acido tánico (Mallinckrodt Chemical Works).

Preparar una solución 1:20 000, disolviendo 50 mg de ácido tánico en 5 ml de solución salina 1:100.

Tomar 1 ml de la solución anterior y llevarlo a 19.9 ml de solución salina.

d) Amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.2

a 100 ml de salina normal añadir 24 ml de KH_2PO_4 5 M y 76 ml de Na_2HPO_4 0.15

Mezclar y ajustar el pH a 7.2 si es necesario.

e) Amortiguador de fosfatos salino (PHS) pH 6.4

Mezclar 100 ml de solución salina normal, 32.2 ml de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.15 M y 67.8 ml de KH_2PO_4 0.15 M Ajustar el pH a 6,4 si se requiere.

Las dos soluciones de fosfato 0.15 M se esterilizaron por separado, mediante filtración a través de una membrana de acetato de celulosa de poros de 0.22 micras de diámetro (Milipore). Después se guardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

f) Antígeno total.

Lavar los trofozoítos 6 veces con solución salina isotónica al 0.85% pH 7.2 o con PBS pH 7.2

Romper las células por congelación a -170°C y descongelamiento a 37°C alternadas, y homogeneizar.

g) Antisuero.

Inactivar el complemento por calentamiento a 56°C durante 30 min.

h) Diluyente SNC-PBC al 1%.

Preparar 50 ml mezclando 500 μl de SNC más 49,500 ml de PBS pH 7.2

6.2 Desarrollo.

Los eritrocitos se lavaron 5 veces, mezclándolos con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos PBS pH 7.2 fría, mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 min a 4°C y se resuspendieron 3 ml del paquete celular en 97 ml de la misma solución amortiguadora.

La solución de ácido tánico 1:20,000 se preparó y mantuvo en baño de hielo.

En un tubo de ensayo se mezclaron 3 ml de la suspensión de GRC al 2% más 3 ml de una solución de ácido tánico 1:20,000 y se mantuvo en baño de hielo durante 15 min.

Se agitó por inversión cada 5 min.

Los GRC tratados se lavaron tres veces con PBS pH 7.2 y se resuspendieron en 2 ml de solución salina isotónica a PBS 0.15 M pH 6.4. Los GRC tanados se sensibilizaron con antígeno amibiano, para lo cual se depositó 1 ml de eritrocitos en un tubo conteniendo 1 ml del antígeno diluido con 4 ml de PBS pH 6.4. La suspensión se agitó y se dejó en reposo, se incubó a 37°C durante 15 min y se mezcló por inversión cada 5 min.

Los eritrocitos se lavaron dos veces con PBS-SNC pH 7.2 para eliminar el antígeno libre y finalmente se resuspendieron en 6 ml de SNC-PBS pH 7.2

Para titular los sueros en una placa de microtitulación se realizaron diluciones seriadas modulo 2 x del antisuero con PBS-SNC pH 7.2

Los volúmenes diluidos fueron de 50 μ l paralelamente se probaron GRC sin sensibilizar, así como controles, suero positivos y negativos.

Los resultados se interpretaron a los 60 min. El título se define como el recíproco de la

mayor dilución del suero a la que se observa aglutinación de los eritrocitos.

La hemaglutinación que se presentó en cada pozo se consideró de la siguiente manera:

HAI (+): Una aglutinación compacta, granular o una película delgada y difusa de eritrocitos aglutinados cubriendo el fondo del pozo, los bordes de la película pueden estar doblados, amasados o desgrarrados a veces, o bien un estrecho anillo de eritrocitos rodeando una película difusa de células aglutinadas.

HAI (-): Anillo grueso de eritrocitos o un discreto botón rojo en el fondo del tubo o bien un botón de eritrocitos bien definidos.

7. Histopatología.

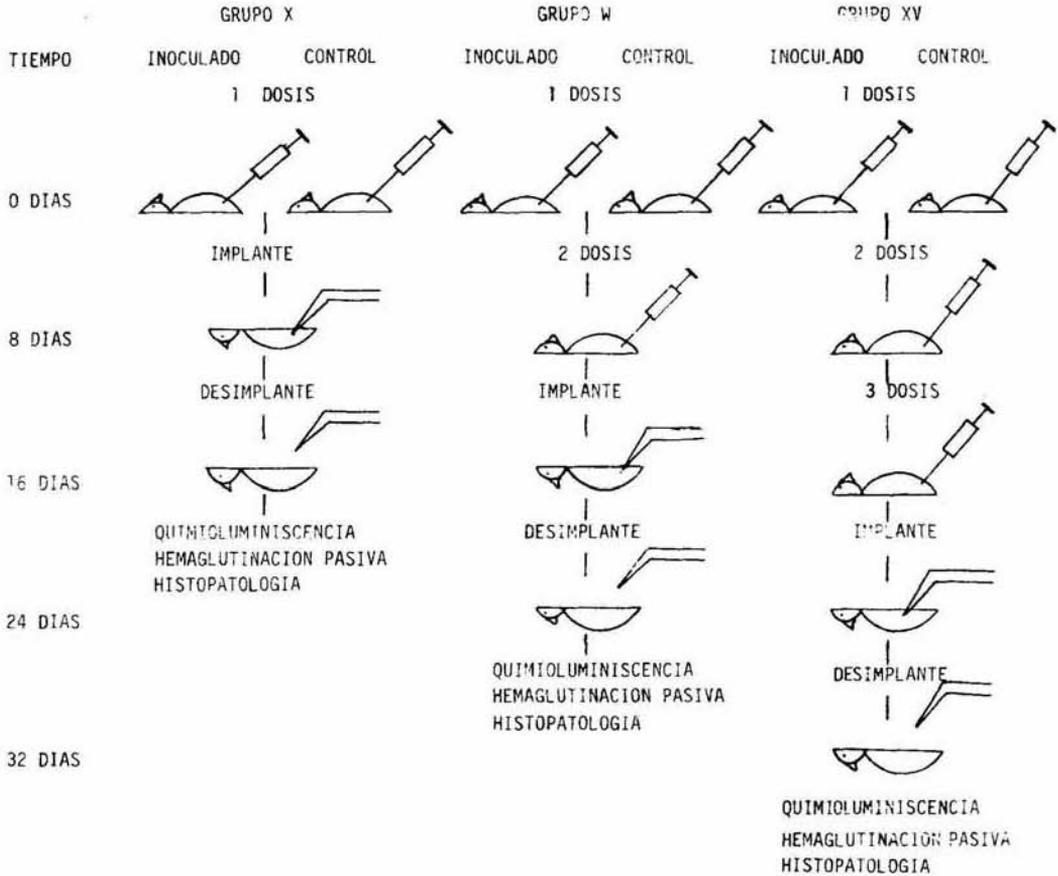
7.1 Inclusión en parafina (58): los coágulos que se extrajeron de los hamster inoculados y tésigo se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina para obtener los cortes y luego teñirlos. El estudio microscópico se llevó

a cabo en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México.

- 7.2 Fijación: Se utilizó formol al 10% neutro, el cual tiene por objeto coagular los fluidos protoplasmáticos de las células, endurecer los geles, e inactivar enzimas, además de que el formol tiene un efecto antiséptico.
- 7.3 Deshidratación: Consiste en extraer el agua del tejido pasándolo por diferentes concentraciones del alcohol, al 60%, 70%, 80% y 90% en forma progresiva hasta que el agua haya sido reemplazada por la última concentración, a intervalos de 1 hr. cada uno.
- 7.4 Aclaración: En este paso se substituye el alcohol 90% por Xilol, el cual es soluble tanto en alcohol como en parafina.
En este punto como el anterior se llevaron a cabo en un Histo-chinet 40 American Optical Modelo T/P8000 TISSUE PROCESOR.
- 7.5 Inclusión: El Xilol es desplazado por la parafina fundida, a una temperatura de 58-60°C, formando un bloque que incluye el tejido.

- 7.6 Corte: El bloque se monta en el microtomo AO -- American Optical TIPE 820 Microtome para efectuar cortes con grosor de 3-5 micras, dependiendo de la técnica a efectuar, después de los cortes se montan sobre portaobjetos.
- 7.7 Aclaración: En coágulo cortado se inicia la rehidratación, sustituyendo la parafina por el Xilol.
- 7.8 Rehidratación: La hidratación es necesaria para poder teñir el tejido, ya que la mayoría de los colorantes sólo actúan en el medio acuoso. Para esto el tejido pasa por las concentraciones de alcohol mencionadas en orden descendente hasta llegar al agua.
- 7.9 Tinción: Para el estudio histopatológico del corte de los coágulos, la tinción con la técnica de hematoxilina-cosina fué usada. Las observaciones se realizaron en un microscopio de luz (Leitz Orthoplam, 956430) empleando los objetivos de 6.3 X, 10 X, 25 X, 40 X.

ESQUEMA DE INOCULACION E IMPLANTE



Esquema 1. Inoculación intraperitoneal de 1×10^6 trofozoitos viables de *E.histolytica* e implante subcutáneo de coágulos conteniendo en su matriz 1×10^6 trofozoitos viables del mismo protozoario.

V. R E S U L T A D O S .

a) Quimioluminiscencia.

La respuesta en porcentaje de quimioluminiscencia obtenidas en los grupos estudiados - se representa en la tabla 1, (fig.1). En los primeros grupos de hamster inoculados previamente con E.histolytica, a los 16 días la quimioluminiscencia descendió notablemente en comparación con los que no lo fueron, dicha diferencia se mantuvo hasta los 36 días, de acuerdo con el análisis estadístico de T de Student ambos grupos fueron diferentes con una $p < 0.05$.

b) Histopatología.

La presencia de trofozoítos de E.histolytica en coágulos de fibrina es seguida por la adhesión de leucocitos polimorfonucleares en la periferia del coágulo y seguida por la quimiotaxis activa de éstos últimos en forma centrípeta hacia los agregados amibianos. Fig. 3

A los 16 días, en el grupo uno, de los hamsters no inoculados, la infiltración por PMN

se ve incrementada hacia el centro del coágulo. Numerosos PMNs destruidos con abundante cariorresis y picnosis se observan en esta zona, con pocos mononucleares en la periferia. Fig. 4

En el grupo dos, a los 24 días se observa respuesta inflamatoria notable. En la porción media del coágulo se distinguen en PMNs con cariorresis. Numerosos mononucleares en la periferia con la misma estructura nuclear. Fig. 5., no así en el tercer grupo al que ya después de 32 días se distingue infiltrado inflamatorio notable, principalmente en el centro de la lesión en el que se distinguen numerosos PMNs destruidos. En la periferia escasos mononucleares. Fig.6 la amplificación de la anterior muestra numerosas células inflamatorias como PMNs y mononucleares con cariorresis y picnosis. Fig.6a. En aquellos grupos de hamster, que fueron previamente inoculados con trofozoítos viables de E. histolytica, el primer grupo presenta comparativamente un descenso en el in-

filtrado inflamatorio dado por PMNs y mononucleares. En el centro del coágulo de la izquierda PMNs con cariorresis, picnosis y necrosis. Fig. 7. A mayor aumento, en la zona central del coágulo se distinguen restos de amibas y en la contraesquina numerosos PMNs con cariorresis y picnosis. Fig. 7a. Así también para el grupo dos, donde se ve una delgada capa de PMNs migrando centripetamente hacia el centro del coágulo, con escasos mononucleares en periferia Fig. 8 y Fig. 8a., donde se distingue principalmente moderada infiltración por PMNs hacia la aglomeración residual amibiana central. El grupo tres, en la zona central del coágulo amibas residuales y escasez de ellas.

En la periferia se distingue moderado infiltrado inflamatorio por PMNs destruidos, con cariorresis y picnosis, escasos mononucleares en forma continua a la capa PMNs con la misma morfología: Fig. 9

A mayor aumento en la zona central, amibas enteras y residuales, con PMNs con cariorre~~s~~is y picnosis en la periferia. Fig. 9a.

c) Títulos de anticuerpos.

La inoculación de E.histolytica en hamster a los cuales se les implantó un coágulo de trofozoítos viables de E.histolytica parece haber afectado el grado de infiltración por PMNs. No hubo correlación entre los títulos de anticuerpos y el grado de infiltración por PMNs. La tabla II muestra los grupos noinoculados, los cuales presentaron un título general de 1:512 (Fig.2). En cambio los que si lo fueron, sus títulos se fueron incrementando de 1:512-1024 mientras que disminuye el grado de inflamación.

T A B L A I

QUIMIOLUMINISCENCIA. Respuesta de fagocitosis hacia E.histolytica

	DIAS DE IMPLANTE		
	16	24	32
INOCULADO ^a	54	5	3
NO INOCULADO ^b	100 ^c	23	19

- a. Grupo de hamsters inoculados intraperitonealmente - con 1×10^6 trofozoitos viables obtenidos de cultivo axénico en crecimiento logarítmico.
- b. Grupo de hamsters no inoculados.
- c. Porcentaje de quimioluminiscencia en cuentas por minuto (CPM).

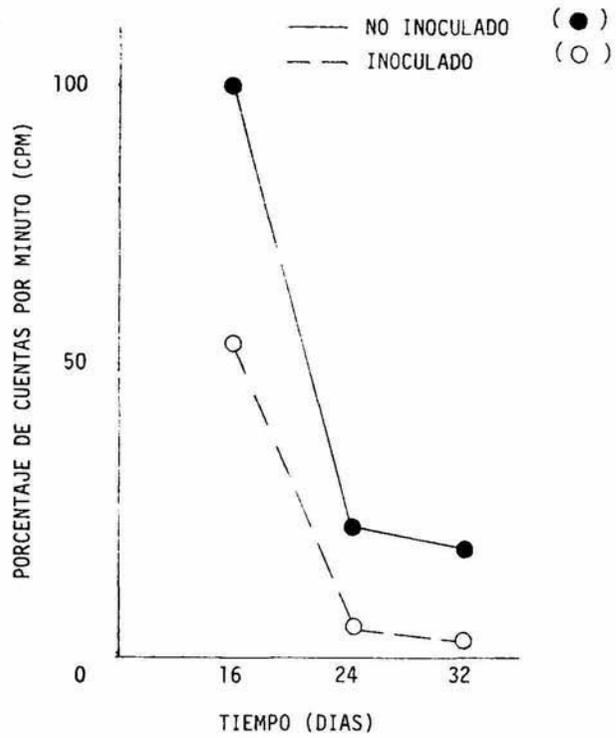


Fig. 1 Respuesta fagocítica expresada en % de CPM de unidades de quimio luminiscencia hacia el antígeno amibiano en el coágulo de fibrina conteniendo en su matriz 1×10^6 trofozoítos viables de E. histolytica.

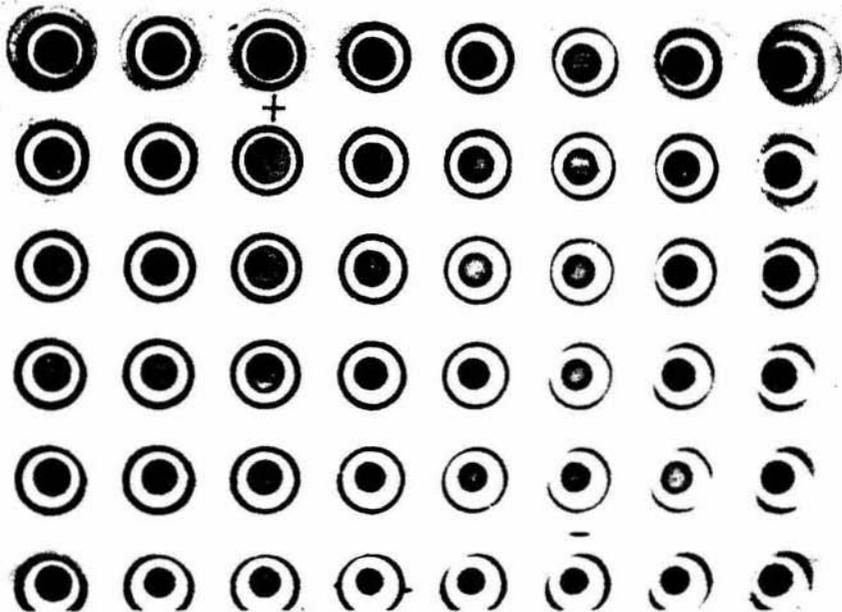


Fig. 2. Hemaglutinación indirecta (HAI). Aglutinación de eritrocitos recubiertos con antígeno de E.histolytica en una placa de microtitulación. Se ilustra un suero cero positivo (+) y una reacción cero negativo (0).

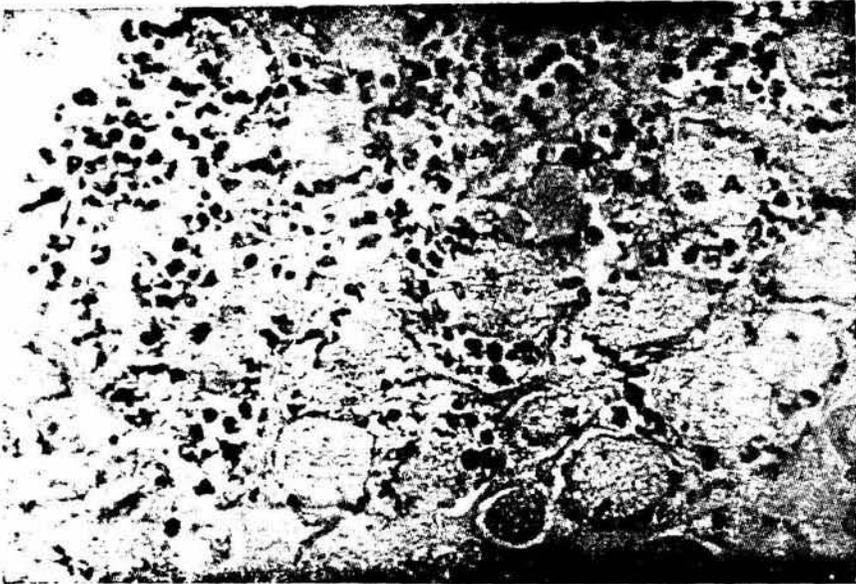


Fig. 3. Migración del infiltrado inflamatorio dado principalmente por PMNs (Ps) hacia los agregados amibianos (A). H&E, X 250.

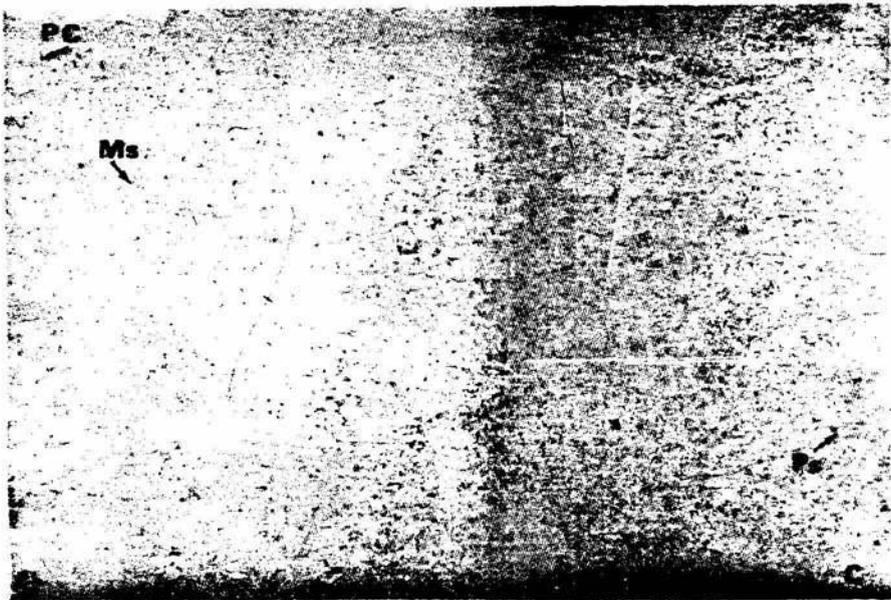


Fig.4. Grupos control a los 16 días. Las células responsables de la reacción inflamatoria se ven incrementadas hacia el centro (C) del coágulo.

Se observan numerosos PMNs (Ps) destruidos con abundante cariorresis en esta zona, con pocos mononucleares (Ms) en la periferia del coágulo (PC). H&E, X 63.

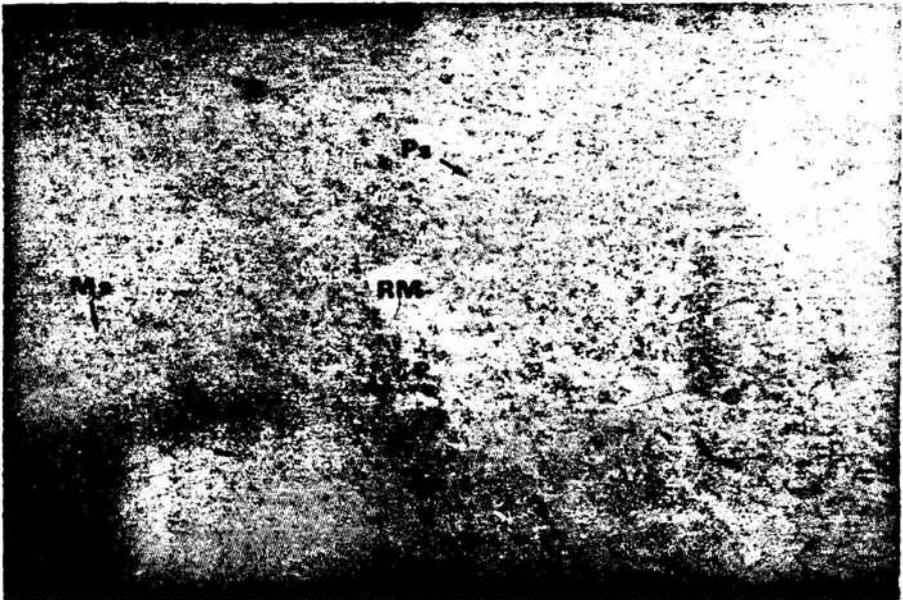


Fig. 5. Grupo control a los 24 días. Respuesta inflamatoria notable. En la región media (RM) del coágulo se distinguen PMNs (Ps) con cariorresis, numerosos mononucleares (Ms) en la periferia del coágulo (PC) con la misma estructura nuclear. H&, X 63.

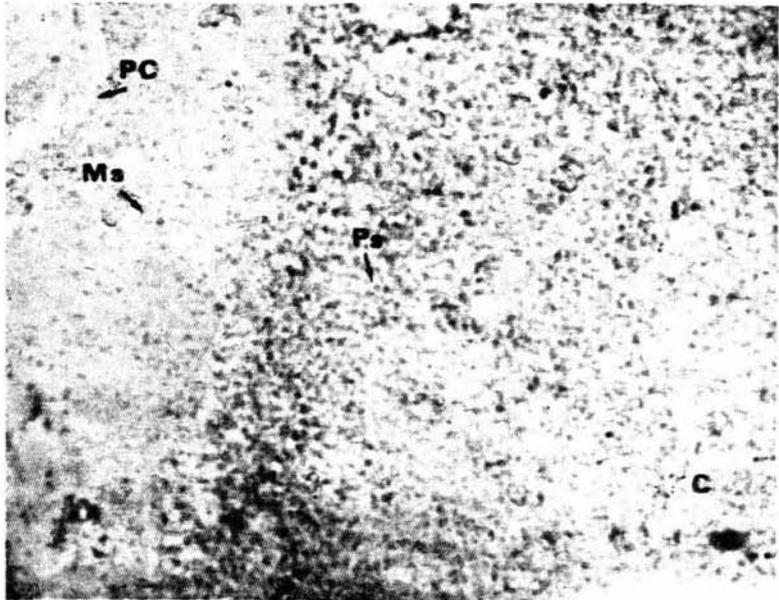


Fig. 6. Grupo control a los 32 días. Infiltrado inflamatorio notable, principalmente en el centro (C) en el que se distinguen numerosos PMNs (Ps) y mononucleares (Ms) con alteración nuclear. Escasos mononucleares en la periferia del coágulo (PC).H&E,X63.



Fig. 6a. Grupo control a los 32 días. Mayor aumento. Se muestran numerosas células inflamatorias - como PMNs (Ps) y mononucleares (Ms). H&E, X 400.

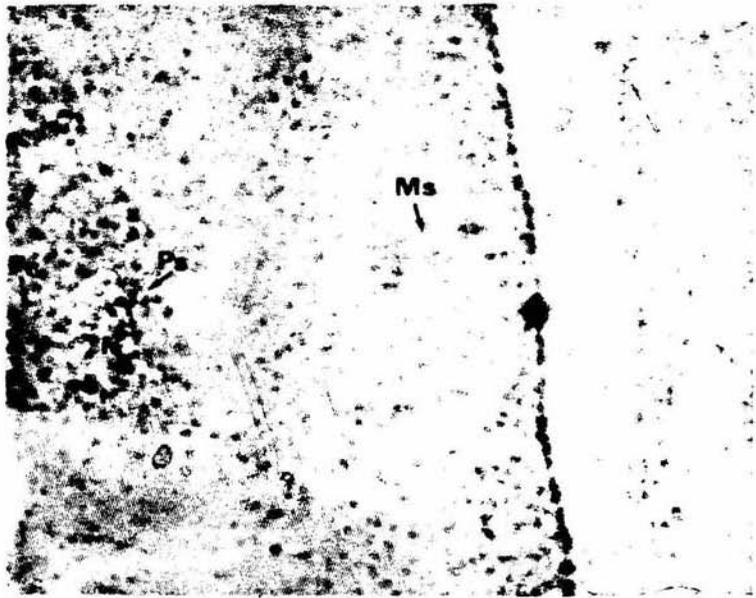


Fig. 7. Primer grupo inoculado. A los 16 días se observa un descenso en el infiltrado inflamatorio dado por PMNs (Ps) y mononucleares (Ms). En el centro del coágulo de la izquierda PMNs con carrionresis (Pc) y necrosis (N). H&E, X 63.

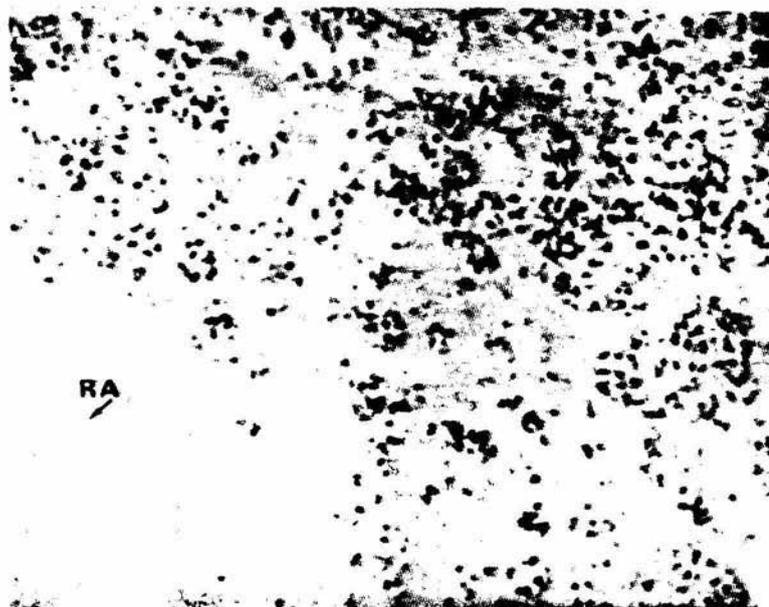


Fig. 7a. Zona central. Mayor aumento. En el extremo inferior derecho se distinguen restos de amibas (RA) y en la contraesquina numerosos PMNs (Ps) con cariorresis. H&E, X 160.

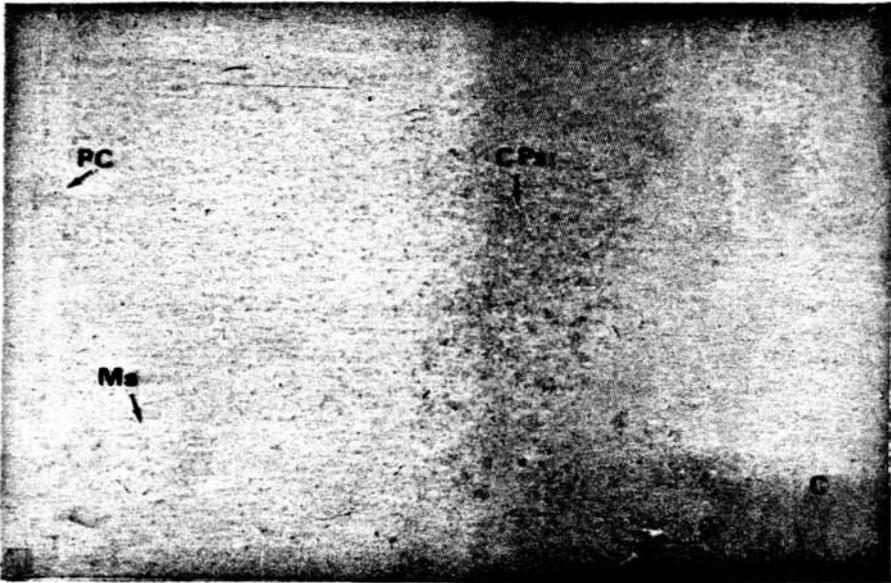


Fig. 8. Grupo dos a los 24 días se observa una delgada capa de PMNs (CPs), migrando centripetamente hacia el - centro del coágulo (C). con escasos mononucleares (Ms) en la periferia del coágulo (PC), H&E, X 63.

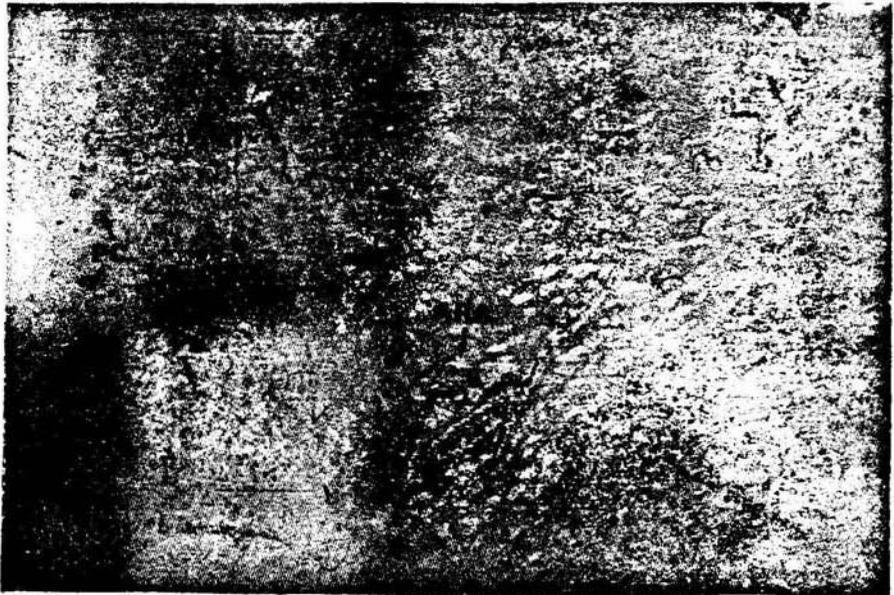


Fig. 8a. Grupo dos, a los 24 días se distingue princi--
palmente moderada infiltración por PMNs (Ps) hacia
la aglomeración residual ambiana (ARA). (PC) Periferia
del coágulo H&E, X 63.

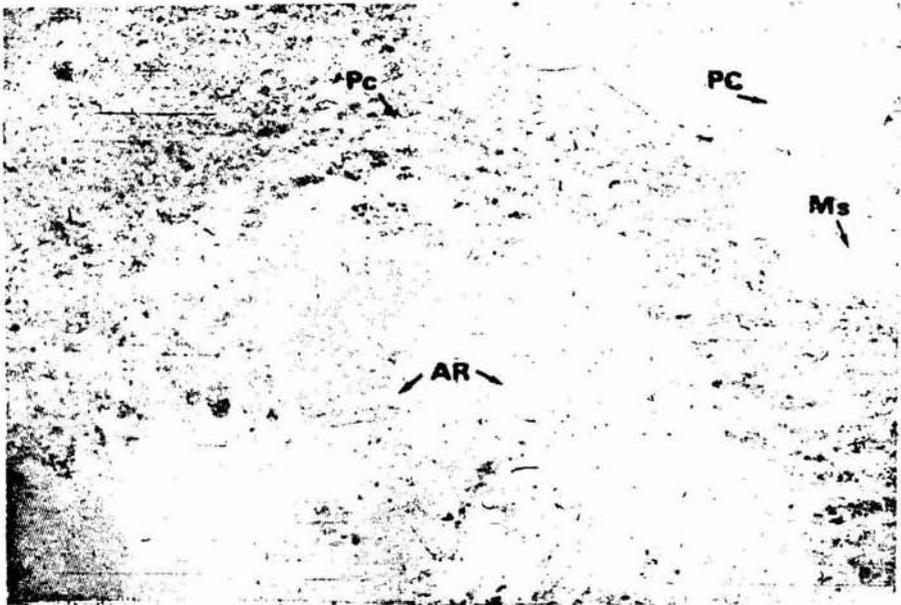


Fig. 9. Grupo tres, a los 32 días en la zona central amibas residuales (AR) y escasez de ellas. En forma contigua moderado infiltrado de PMNs destruidos con cariorresis (Pc), escasos mononucleares (Ms) en la periferia del coágulo (PC) con la misma morfología nuclear. H&E, X 63.

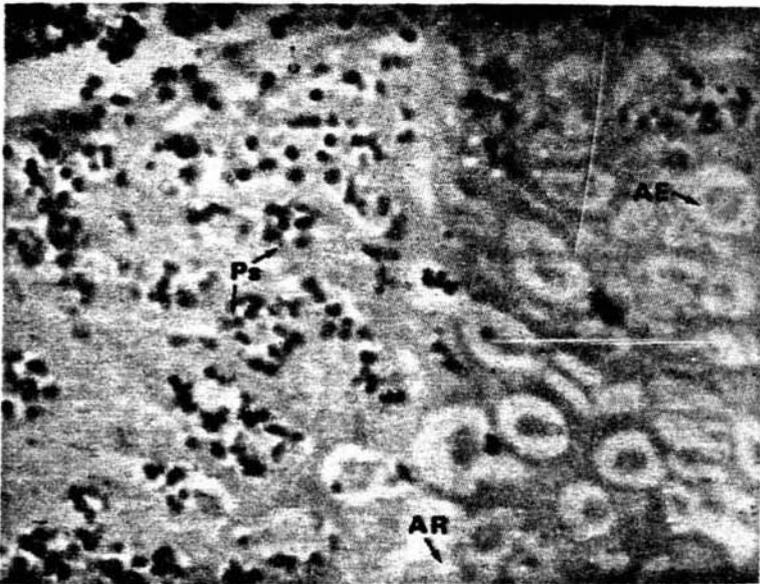


Fig. 9a. Zona Central. Mayor aumento. Amibas enteras (AE) y residuales (AR) con PMNs (Ps) destruidos con cariorresis en la periferia H&E, X 250.

T A B L A II

TITULOS DE ANTICUERPOS ANTIAMIBIANOS^a EN SUERO DE HAMSTER CON IMPLANTE SUBCUTANEO^b DE COAGULO CON TROFOZOITOS VIABLES DE E.histolytica CEPA HM-1.

	DIAS DE IMPLANTE		
	16	24	32
INOCULADO ^c	1:512 (5) ^d	1:1024 (5)	1:512 (1)
	X:512	X=1024	1:1024 (4)
	S=0	S=0	X:921.6
			S=228.9
NO INOCULADO	1:512 (5)	1:512 (5)	1:512 (5)
	X=512	X=512	X=512
	S=0	S=0	S=0

- a. Determinado mediante hemaglutinación indirecta (HAI)
- b. Coágulo de fibrinógeno de cerdo conteniendo en su matriz 1×10^6 de E. histolytica cepa HM-1.
- c. Fueron inoculados intraperitonealmente con 1×10^6 trofozoitos viables de E. histolytica de la misma cepa.
- d. Número de animales a los que se les determinó el título.

VI. D I S C U S I O N .

De acuerdo a la migración celular de PMNs hacia los coágulos que contienen trofozoítos de E.histolytica, nuestros datos apoyan la existencia de un proceso inflamatoria en la amibiasis extraintestinal. La inoculación previa con E. histolytica influye sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria. Tal respuesta se asocia con una disminución notable con el grado de infiltración de PMNs y mononucleares hacia el coágulo que contiene el parásito.

La presencia de trofozoítos viables de E.histolytica en coágulos de fibrina es seguido por la infiltración centripeta de leucocitos polimorfonucleares hacia los conglomerados amibianos, mientras que la infiltración de mononucleares es moderada Fig. 3.

A los 16 y 24 días de la inoculación, la migración gradual de PMNs es principalmente hacia el centro Fig. 7, 8, 9. A los 32 días la disposición de los PMNs es preferentemente central y en unión estrecha con los restos amibianos Fig. 9a.

En contraste en los grupos de animales que no fueron previamente inoculados con trofozoítos de E. histolytica se presentó una respuesta inflamatoria significativamente mayor. Fig. 6.

La destrucción de los trofozoítos amibianos en el modelo descrito al parecer está dado por dos mecanismos; mediante la participación de las respuestas inflamatorias y humoral. Aunque en los grupos inoculados previamente con trofozoítos viables de E. histolytica presentaron títulos de anticuerpos antiamibianos relativamente altos, también presentaron un infiltrado inflamatorio significativo, que pudo haber tenido su participación en la destrucción del parásito.

Los grupos no inoculados presentaron un incremento significativamente mayor del infiltrado, sus títulos no son significativamente menores a los grupos inoculados, y pudieron haber tenido un papel antiamibiano.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido cuantificar la sobrevivencia de levadura, bacterias y protozoarios incluidos en coágulos de fibrina, resultando un modelo de mucha utilidad para evaluar in vivo la dinámica inflamatoria específica

de cada uno de ellos (60). La presencia de trofozoítos vivos o fijados con glutaraldehído de E.histolytica, en coágulos de fibrina, e implantados subcutáneamente en la región ventral de hamsters es seguido por la adhesión a las 3 horas por neutrófilos polimorfonucleares en la periferia del coágulo y ésto es seguido por una quimiotaxis activa, sin embargo no se han reportado quimioattractantes en los sobrenadantes de trofozoítos de E.histolytica crecidos axénicamente (64). A las 12 horas los PMNs se encuentran formando capas alrededor de los parásitos, y a las 48 horas la respuesta celular es debida a PMNs, en seguida los mononucleares hacen su aparición, pero raramente son vistos en contacto directo con los trofozoítos vivos, al parecer se encargan de la remoción de los restos celulares. Desafortunadamente después de 96 horas hay grandes depósitos de colágeno alrededor de la lesión y dificulta la observación del parásito. Así también es notable la presencia de una cápsula compuesta de fibroblastos y neovascularización. La adhesión sigue hasta la superficie del parásito que finaliza con la muerte del parásito o de los PMNs o de ambos (60).

En abscesos hepáticos amibianos provocados por inoculaciones de trofozoítos vivos por vía portal a las 12 horas se muestra una infiltración celular aguda, formada por un gran número de leucocitos polimorfonucleares rodeando trofozoítos localizados centralmente. En las fases tardías la necrosis se ve incrementada, donde los mononucleares y células epiteloides reemplazan a la mayoría de los leucocitos, provocando el desarrollo de granulomas característicos. Al día 7 los granulomas se asocian con una necrosis extensa (49).

Parecen ser varios factores los que toman parte en la secuencia anteriormente descrita; el complemento del huésped parece activarse por alguna vía; así se ha demostrado que el parásito parece activar ambas vías del complemento en ausencia de anticuerpos específicos (63). La liberación en péptidos quimiotácticos derivados de los componentes del complemento como C 5, 6 y 7 activan quimiotaxis y fagocitosis de células inflamatorias (59).

Lo anterior podría explicar parte no solo la destrucción del parásito, sino también la intensa migración de células inflamatorias hacia la lesión.

Las diferencias en la respuesta de quimiolumi-
niscencia entre los grupos no inoculados y los inocula-
dos previamente con E. histolytica, podrían interpreta-
se como presencia de factores solubles (anticuerpos
específicos) que de alguna forma eleven o disminuyan
la actividad metabólica celular.

Aparentemente la respuesta humoral en
nuestro modelo estuvo parcialmente involucrada.
En los animales inoculados previamente a la implantación
del coágulo de títulos de anticuerpos antiambianos
se fueron incrementando gradualmente, no así, para
los grupos control o testigo, donde se alcanzó un
título y éste permaneció constante.

Las diferencias de los títulos de anticuerpos
en los grupos de animales inoculados parecen deberse
a la inoculación previa con trofozoítos viables
de E. histolytica, mientras los que no fueron inoculados
el antígeno estuvo menos expuesto al aparato inmune.

Se han cuantificado que una proporción
de 200 PMNs por trofozoíto amibiano son necesarios
para destruir trofozoítos de la cepa 310. Por otro
lado se requieren más de 3000 PMNs por amiba para
destruir trofozoítos de la cepa HM-I de E. histolytica.

La destrucción de las amibas por PMNs no parece depender del complemento ya que los PMNs tiene efecto amebicida sobre cepas menos virulentas en presencia de suero activada como inactivada. La destrucción de amibas por PMNs no dependió de metabolismo dependiente de oxígeno (61).

El sistema del complemento como ya se mencionó anteriormente es otro factor humoral involucrado en la respuesta inmune contra E. histolytica. Experimentos empleando suero fresco sin anticuerpos anti-amibianos detectables pueden inducir lisis de aproximadamente 49% de la población amibiana cuando se usó una dilución 1:3. La lisis bajo estas condiciones ha mostrado ser un proceso dependiente de complemento por la vía alterna (62).

El modelo usado en el estudio ofrece ventajas: evaluar la respuesta inflamatoria hacia algunos antígenos como el de E. histolytica incluidos en la matriz del coágulo.

En el presente estudio cuantificamos el tipo y la dinámica de la respuesta celular, aparentemente relacionada al proceso inflamatorio. Tal proceso inflamatorio fué afectado por la inmunización previa

con trofozoitos viables de E. histolytica.

VII. CONCLUSIONES.

Los hamsters inoculados previamente con trofozoítos de E. histolytica se observó una menor migración de PMNs hacia los coágulos que contenían en su matriz trofozoítos viables de E.histolytica.

La quimioluminiscencia presentó un decremento en los animales que fueron inoculados previamente con trofozoítos viables de E. histolytica en comparación a los no inoculados.

La inoculación de trofozoítos viables de E. histolytica estimuló el aumento en el título de anticuerpo anti*amibianos* determinados mediante HAI y pareció influir en el decremento de la quimioluminiscencia y la migración de PMNs.

VIII. B I B L I O G R A F I A.

1. BARNES, D.R. (1984). Zoología de los invertebrados. 3a. Edición. Interamericana Editorial p. 31, 32 y 45. México.

2. CHEVEZ, A., SEGURA, M., ITURBE, I. and AUBANEL, M. (1971). Aspectos morfológicos en la biología del trofozoito de Entamoeba histolytica desde el punto de vista de la citología dinámica. Arch. de Inv. Med. (México), 2(I): 229-244.

3. CHEVEZ, A., CORONA, D., SEGURA, M. and ITURBE-ALESSIO, I. (1972 a). La pinocitosis como expresión anabólica de Entamoeba histolytica. Arch. de Inest. Med. (México), 3 (2):265-274.

4. CHEVEZ, A., ITURBE-ALESSIO, I., SEGURA, M. y CORONA, D. (1972 b). Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (México), 3(2):275-286.

5. MARTINEZ-PALOMO, A., GONZALEZ-ROBLES, A. and CHAVEZ DE RAMIREZ, B. (1976 b). Ultrastructural study of various *Entamoeba* strains. In Porcceding of the International Conference on Amibiasis. Ed. B. Sepulveda and L.S. Diamond. p.p 226-237 Instituto Mexicano del SEguro Social, Mexico city.

6. OSADA, M. (1959). Electron-microscopic studies on protozoa. I. Fine structure of *Entamoeba histolytica*. Keio Journal of Medicine, 8,99-108.

7. TREVIÑO, G.M.N., DE LA TORRE, R:M.: RUIZ DE CH. I. y SEPULVEDA B.: Microscopía electrónica de *Entamoeba histolytica*. Trabajo presentado en el VI Congreso Nacional de Gastroenterología, México. 1969.

8. KORN, E.D. (1975). Biochemistry of endocytosis. In Biochemistry of call walls and membranas. Ed. C.F. Fox. p.p 1-26 Butter Worths, London.

9. KUDO, R.R. (1966). Protozoología. Editorial Continental p.414-419 México.
10. LA PAGE GEOFFREY (1971). Parasitología Veterinaria. Continental Editorial. p. 562-563 México.
11. MARTINEZ PALOMO, A.: Parásito factors of virulence. In, Martínez Palomo. A. The Biology of Entamoeba histolytica Research Studies Press. Great Britain, 1982, 93-117.
12. WITTNER, M. (1968). Growth characteristics of Entamoeba histolytica. Schaudin. 1903. Journal of Protozoology, 15, 403-406.
13. MONTALVO, F.E., REEVES, R.E. WARREN, L.G. (1971). Aerobic metabolism in Entamoeba histolytica. Experimental Parasitology. 30. 249-256.
14. WEINBACH, E.C. and DIAMOND, L.S. (1974). Entamoeba histolytica. I. Aerobic metabolism. Experimental Parasitology. 35, 232-243.
15. BOECK, W.C. y ARBOHLAV, J.: The cultivation of Entamoeba histolytica. Proc. Nat. Acad. Sci. II:235, 1925.

16. SHACFTER, J.G. y PRYA, W.W: Studies on the growth requirements of Entamoeba histolytica, I. Maintenance of a strain of E. histolytica through one hundred transplants in the absence of an activity in multiplying bacterial flora, Am. J. Hyg. 56; 119,1948.
17. PHILLIPS, B.P.: Cultivation of Entamoeba histolytica with Trypanosoma cruzi. Science. III: 8, 1950.
18. DIAMOND, L.S.: Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science. 134: 336, 1961.
19. SEPULVEDA, B.: Amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gac. Med. Méx. 100:201. 1970.
20. DIAMOND, L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Shaudin, 1903, and E. histolytica like amebae. Journal of parasitology, 54, 1047-1056.
21. DIAMOND, L.S., HARLOW, D.R. and CUNNICK, L.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba

Transactions of the Royal Society of tropical
Medicine and Hygiene, 72, 431-432.

22. DIAMOND, L.S. (1980). Axenic cultivation of Entamoeba histolytica: Progress and problems. Arch. - Invest. Med. (México), 2(1): 47-54.
23. JARUMILINTA, R. y MAEGRAITH, B.G.: Enzymes of Entamoeba histolytica. World Health Organization Expert Lommittee of amebiasis. Teheran. 1968.
24. REEVES, R.E. y BISCHOFF, J.M.: Classification of Entamoeba species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J. parasit, 54:594,1968.
25. LEE, T.; DE LA TORRE, R. M.; Palacios, B.O. y Landa, L.; Actividad enzimática en amiba histolytica. Trabajo presentado en el VI Congreso Nacional de Gastroenterología. México, 1969.
26. RAUDIN, J.I., MURPHY, L.F. Guerrant, R.L., and Long-Kiug, S.A.Effect of Antogonis of calcium and Phos - pholipase. A on the citopathogenecity of Enta moeba histolytica. J. Infect. Dis. 1985;152-549

27. CALDERON, J., MUÑOZ, M.A. de L., ACOSTO, H.M.: Surface redistribution and release of antibody induce caps in Entamoeba. J. Exp.Med.1980; 151; 184-193.
28. MARTINEZ PALOMO, A., GONZALEZ ROBLES, DE LA TORRE, M. (1973). Aglutinación selectiva de trofozoítos de varias cepas de Entamoeba histolytica inducida por concavalina. Arch. Invest. Med. (México) 4 (1):539.
29. BOS, H.J., VAN DE GRIEND.: Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica.Nature. 1977:265:341-343.
30. TRISSL, D.: Immunology of Entamoeba histolytica in human and host animal, Rev. Infect. Dis. 1982; 4; 1154-1184.
31. DIAMANTESTEIN, T., KLOS, MICROSLAW., GOLD, D. and HAHN, H. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. Mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for human peri-

- pheral T. Lymphocytes. J. Immunol. 1981; 126: 2084-2086.
32. MUÑOZ, M.L., CALDERON, J. AND ROHKIND, M. (1982) The - collage nace of Entamoeba histolytica J. Exp. Med. 155, 42-51
33. CHEVEZ, A., ITURBE, A. J., SEGURA, M. CORONA, D. (1972) Relaciones biológicas: Entamoeba histolytica y otras células: I Complejo de asociación amiba leucocito. Arch. Invest. Med. (México), 3, (2):, 241-256.
34. BRAND HERMAN Y TAMAYO RUY. (1970). Amibiasis. La Prensa Médica Mexicana. p. 8-15 y 21-28. México.
35. PATERS, R.S., GILLIN, n. and LIBKE. R.D. (1981). Amebic liver abscess. Ann. Rev. Med. 32 161-174.
36. ALVAREZ-ALBA, R. and DE LA LOZA-SALDIVAR, A. (1971). Fre cuencia del absceso hepático amibiano en hospí tales del Insituto Mexicano del Seguro Social de la República Mexicana. Arch. Invest. Med. (México), 2, (1): 327-332.

37. ROSE, G.W. and KNIGHT, R. (1973). Dietary factors affecting the pathogenicity of Entamoeba histolytica in rats. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67 560-567.
38. MURRAY, M.J., MURRAY, A. AND MURRAY (1980). The salutary effect of milk on amoebiasis and its reversal by iron. Br. Med. J. 280, 1351-1352.
39. ABIOYE, A.A. (1973). Fatal amebic colitis in pregnancy and puerperium: A new clinicopathological entity. J. Trop. Med. 76. 97-100.
40. SEN, M.R., ACHARYA, D.P. and sen, P.C. (1984). Effect of stress on the pathogenicity of Entamoeba histolytica Indian J. Med. Res. 79, 349-353.
41. DIAMOND, L.S., Marlow, D.R., PHILLIPS, B.P. and KEISTER, D.B. (1978). Entamoeba histolytica: iron and nutritional immunity. Arch. Invest. Med. (México) 9 (1): 329-338.
42. SEXTEN, D.J., KROGSTAD, D.J., SPENCER, H.C., Jr. HEALY, G.R. , SINCLAIR, S., SLEDGE, C.E. and SCHULTZ,

- M.G. (1974). Amebiasis in a mental institution: Serologic epidemiologic studies. Am. J. Epidemiol. 100, 414-423.
43. GRAING, C.G.: The Etiology, Diagnosis and treatment of Amebiasis. Williams and Wilkins, Baltimore, 1944.
44. MARTINEZ BAEZ, M: Historia de la Amibiasis en: Amibiasis Edit. por: Sepulveda, B. y Diamond, C.S. IMSS México, 1976.
45. MACOTELA, R.E. (1971) Amibiasis invasora cutánea Arch. Invest. Med. (México), 2 (1): 373.
46. MORA GALINDO, J., MARTINEZ PALOMO, A. and CHAVEZ, B. (1978) Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch. Invest. Med. (México), 9 (1): 261-274.
47. GARVEY, J.S., CREMER, N.E., and SUSSDORF, D.H., (1987). Methods in immunology. A. Laboratory text for instruction and research. 3a. Edic. W.A. -

Benjamín. Inc. London; p.p. 7-38, 183-185, 313-321, 328-335.

48. TANIMOTO, M. SEPULVEDA, B., VAZQUEZ-SAAVEDRA, J.A. AND LANDA, L. (1971). Lesiones producidas en el hígado del hamster por inoculación de Entamoeba histolytica en medio axéxico. Arch. Invest. Med. (México), 2 (1); 275-284.
49. TSUTSUMI et al. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Amer. J. Pathol 117 (1) 81-91.
50. CHEVEZ A., ITURBE, I., AUBANEL, M., SEGURA, M. (1971). Actividad fibrinogénica y fibrinolítica de Entamoeba histolytica sobre el plasma humano in vitro. Arch. Invest. Med. (México) (1): 211-218.
51. GONZALEZ LICEA, A., LANDA, L., SEGOVIA, E., VELAZCO. E. (1973). Estudio de la amibiasis invasora del recto con microscopia de luz y electrónica. Arch. Invest. Med. (México); 4 (1): 5,56.
52. AGUIRRE-GARCIA, J. (1970). Peculiaridades histopatológicas de la lesión amibiana. Arch. Invest. Med.

(México); 1 (1): 5,147.

53. PRATHAP, K., AND GILMAN, R. The histopathology of acute intestinal amebiasis. Amer. J. Pathol.; 60:229-239.
54. BIANCO, C. FIBRIN, Fibrinectin, and Macrophages. ANYAS. 1983; 408: 602-609.
55. KAHN, R.A., FLINTON, L.J.: The relationship between platelets and bacteria. Blood 1974; 44 715-721.
56. ANDERSEN, D.R.:BRENDEL, A.M.; Use of a unique chemiluminescence spectrometer in study of factors influencing granulocyte light emission. J.Imm. Methods. 19; 279-287. 1978.
57. CABBELL, D.H., GARVEY, O.S. CREMER, N.E., Sussdorf, D.H. Methods in Immunology. Second edition. W.A. Benjamin, N.Y. 1970.
58. HAMM, A.W. (1975): Tratado de Histología. 7a. Edición. Interamericana Editorial. p.p 9-14 México.

59. HERBERT, J.W. (1972). *Immunología Veterinaria*. Acribia Editorial. p.p 85-89 y 90. España.
60. Comunicación Personal.
61. GUERRANT, R.L., BRUSCH, J., RAUDIN, J.I. SULLIVAN, J.A. and MANDELL, G.I. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* 143, 83-93.
62. ORTIZ-ORTIZ., CAPIN, R., CAPIN, N.R., SEPULVEDA, B. and ZANACINA, G. (1978). Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. *Clinical and Experimental Immunology*, 39, 10-18.
63. CLUDT, G., DAVIES, P., ALLISON, A.C. and SHORLEMMER, H.V. (1979). Interactions between Entamoeba histolytica. y complement nature, 277, 214-216.
64. KRETSCHMER, R.R., COLLADO, M.L., PACHECO, M.G., SALINAS, M.C., LOPEZ-OSUNA, M., LECUONA, M., CASTRO, E.M. AND ARELLANO, J. (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown E. histolytica. *Parasite Immunol.* 7, 527-544.