

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

26  
rej.

CIUDAD UNIVERSITARIA

POSGRADO EN BIOLOGIA CELULAR

"MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO  
DE AMIBIASIS INTESTINAL"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(Biología Celular)

P R E S E N T A

EMILIANO FERNANDO NAVARRO GARCIA



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F.

ENERO DE 1992



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

|   |      |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS .....   | iv   |
| LISTA DE FIGURAS .....  | viii |
| LISTA DE TABLAS .....   | xi   |
| RESUMEN .....   | xii  |
| <br>  |      |
| INTRODUCCION .....  | 1    |
| A. Amibiasis .....  | 1    |
| 1. Generalidades .....  | 1    |
| 2. Entamoeba histolytica .....  | 1    |
| 3. Infección .....  | 4    |
| a. Intestinal .....   | 4    |
| b. Extraintestinal .....  | 5    |
| 4. Patogenia .....  | 6    |
| a. Toxinas y enzimas .....  | 6    |
| b. Proteínas formadoras de poros .....  | 7    |
| c. Neurotransmisores .....  | 7    |
| 5. Inmunidad .....  | 8    |
| a. Sistémica .....  | 8    |
| b. Local .....  | 10   |
| B. Estructura del intestino .....   | 11   |
| 1. Generalidades .....  | 11   |
| 2. Capas principales .....  | 11   |
| a. Mucosa .....   | 11   |
| b. Submucosa .....  | 12   |
| c. Muscular externa .....   | 13   |
| d. Serosa .....   | 13   |
| 2. Células epiteliales .....  | 13   |
| a. De la superficie .....   | 13   |
| b. Indiferenciadas .....  | 14   |
| c. Caliciformes .....   | 15   |
| d. Enterocromafines .....   | 15   |
| e. Linfocitos .....   | 16   |
| C. Amibiasis intestinal .....   | 16   |
| 1. Biopsias humanas .....   | 16   |
| 2. Inoculación a animales .....   | 16   |
| 3. Sistemas in vitro .....  | 17   |
| D. Propiedades eléctricas de los epitelios .....  | 17   |
| 1. Transporte de iones .....  | 17   |
| 2. Diferencia de potencial, corriente de corto circuito, resistencia y conductancia ..... | 19   |
| E. Agentes que afectan las propiedades eléctricas .....                                   | 20   |
| 1. Fármacos .....   | 20   |
| a. Vasopresina y aldosterona .....  | 20   |

|   |           |
|---|-----------|
| c. Prostaglandinas .....                                      | 21        |
| d. Otros reguladores endógenos del transporte .....           | 21        |
| e. Glucósidos digitales y diuréticos .....                    | 22        |
| f. Fármacos que actúan sobre la membrana .....                | 23        |
| 2. Microorganismos infecciosos .....                          | 23        |
| 3. <i>E. histolytica</i> .....                                | 25        |
| 4. Inmunofisiología .....                                     | 27        |
| F. Justificación y objetivos del trabajo .....                | 29        |
| <b>MATERIALES</b> .....                                       | <b>30</b> |
| A. Aparatos y reactivos .....                                 | 30        |
| 1. Procedencia .....  | 30        |
| 2. Registro de las propiedades eléctricas .....               | 30        |
| a. Cámaras de Ussing .....                                    | 30        |
| b. Celdas de calomel .....                                    | 30        |
| c. Fijadores de voltaje .....                                 | 30        |
| B. Soluciones .....   | 32        |
| 1. Soluciones madre .....                                     | 32        |
| 2. Electrodos, puentes de agar y celdas de calomel .....      | 33        |
| 3. Solución de Ringer y medio TP .....                        | 33        |
| 4. Soluciones para microscopía .....                          | 33        |
| 5. Mezclas con actividad biológica .....                      | 35        |
| <b>METODOS</b> .....  | <b>36</b> |
| A. Preparación de los experimentos .....                      | 36        |
| B. Obtención del colon .....                                  | 36        |
| C. Montaje en la cámara de Ussing .....                       | 36        |
| D. Tratamiento de las preparaciones .....                     | 37        |
| 1. Amilorida .....  | 37        |
| 2. Ouabaína .....   | 37        |
| 3. Lisados amibianos .....                                    | 37        |
| a. No preincubados .....                                      | 37        |
| b. Preincubados con suero .....                               | 37        |
| E. Fijación y tinción para microscopía óptica .....           | 38        |
| F. Fijación y tinción para microscopía electrónica .....      | 38        |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                       | <b>40</b> |
| A. Propiedades eléctricas de las preparaciones de colon ..... | 40        |
| 1. Caída espontánea .....                                     | 40        |
| 2. Efecto de amilorida y ouabaína .....                       | 41        |
| 3. Efecto del medio TP .....                                  | 43        |
| a. Con burbujeo .....   | 43        |
| b. Sin burbujeo .....   | 44        |
| B. Aspecto microscópico de los segmentos de colon .....       | 46        |
| 1. En Ringer .....  | 46        |

|   |    |
|---|----|
| a. No montados .....  | 46 |
| b. montados .....   | 47 |
| 2. En medio TP y montados .....                               | 47 |
| a. Con burbujeo .....   | 47 |
| b. Sin burbujeo .....   | 48 |
| C. Efecto de lisados ambientes .....                          | 49 |
| 1. Sobre preparaciones en medio TP .....                      | 49 |
| a. Propiedades eléctricas .....                               | 49 |
| b. Aspecto microscópico .....                                 | 53 |
| 2. Sobre preparaciones en Ringer .....                        | 55 |
| a. Propiedades eléctricas .....                               | 56 |
| b. Microscopía óptica .....                                   | 57 |
| c. Microscopía electrónica .....                              | 58 |
| 3. Dosis variables de trofozoítos lisados .....               | 58 |
| a. Propiedades eléctricas .....                               | 58 |
| b. Microscopía óptica .....                                   | 60 |
| c. Ultraestructura .....                                      | 62 |
| 4. Curso temporal del deterioro .....                         | 64 |
| a. Propiedades eléctricas .....                               | 64 |
| b. Aspecto microscópico .....                                 | 65 |
| c. Microscopía electrónica .....                              | 65 |
| D. Efecto de la preincubación con suero humano .....          | 68 |
| 1. Suero normal .....   | 68 |
| 2. Suero inmune .....   | 68 |
| DISCUSION .....   | 71 |
| A. Propiedades eléctricas de las preparaciones de colon ..... | 71 |
| B. Aspecto microscópico de los segmentos de colon .....       | 72 |
| C. Efecto de los lisados ambientes .....                      | 73 |
| REFERENCIAS .....   | 77 |

## LISTA DE FIGURAS

1. Diagrama de una preparación de la pared del colon de conejo montada en la cámara de Ussing.
2. Fig. 2. Diagrama funcional simplificado del fijador de voltaje modelo "Farma 9726-2"
3. Caída espontánea típica de los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones de colon mantenidas en Ringer burbujeado en ambas hemicámaras con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.
4. Efecto típico de la amilorida sobre los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en Ringer burbujeado.
5. Efecto típico de la ouabaina sobre los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en Ringer burbujeado.
6. Caída espontánea típica de los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en medio basal TP burbujeado del lado seroso.
7. Efecto típico de la hipoxia sobre el curso temporal de los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en medio basal TP.
8. Valores normalizados de DP e Icc de preparaciones mantenidas en Ringer burbujeado, o en medio TP, con o sin burbujeo.
9. Valores normalizados de la resistencia eléctrica transmural en preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo y TP con o sin burbujeo.
10. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo.
11. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en medio TP con burbujeo.
12. Efecto de la hipoxia sobre el aspecto microscópico de preparaciones mantenidas en medio TP durante 70 min.
13. Efecto típico de 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre los valores

absolutos de DP, lcc y R en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo.

14. Efecto típico de 50,000 trofozoítos lisados de *E. invadens* PZ sobre los valores absolutos de DP, lcc y R en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo.

15. Valores normalizados de DP e lcc en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo y tratadas con 50,000 trofozoítos de lisados de *E. histolytica* HM1 o de *E. invadens* PZ.

16. Valores normalizados de la resistencia eléctrica transmural de preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo y tratadas con 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 o de *E. invadens* PZ.

17. Efecto de lisados de *E. histolytica* HM1 sobre el aspecto microscópico de preparaciones mantenida en medio TP durante 95 min.

18. Efecto de 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre los valores relativos de DP e lcc de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo.

19. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo. (A) No tratada. (B) tratada con lisados de 50,000 trofozoítos de *E. histolytica* HM1 durante 80 min.

20. Daño ultraestructural de las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos.

21. Efecto de dosis variables de lisados de *E. histolytica* HM1 sobre los valores relativos de DP e lcc de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo.

22. Efecto de dosis variables de lisados de trofozoítos de *E. histolytica* HM1 sobre los valores absolutos de la resistencia eléctrica transmural de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo.

23. Efectos típicos de dosis variables de trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre la morfología de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo.

24. Ultraestructura de preparaciones tratadas con dosis variables de lisados de *E.*

*histolytica* HM1.

25. Deterioro electrofisiológico y microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo y tratada con 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1.

26. Cinética del deterioro ultraestructural de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo y tratada con 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1.

27. Efecto del suero humano normal (SHN) sobre los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones tratadas con trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1. .

28. Efecto del suero humano inmune (SHI) sobre los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones tratadas con trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1.



## LISTA DE TABLAS

1. Preparación de la solución de Ringer
2. Preparación del medio basal TP para cultivo de amibas
3. Cambio de las propiedades eléctricas de colon de conejo bajo diferentes condiciones en la cámara de Ussing
4. Efecto de la dosis de lisados de trofozoítos de *E. histolytica* sobre las propiedades eléctricas del colon de conejo

## RESUMEN

Hemos desarrollado un modelo *in vitro* que permite observar efectos iniciales de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* sobre la mucosa del intestino grueso. En nuestro modelo, en cámaras de Ussing se montan segmentos de colon que incluyen todas las capas del intestino, es decir desde la mucosa hasta la serosa, los cuales tratamos con lisados de trofozoítos colocados en la hemicámara mucosa. Los lisados de *E. histolytica* HM1 causaron una caída inmediata de la diferencia de potencial (DP), la corriente de corto circuito (Icc) y la resistencia eléctrica (RE) cuya velocidad fue dependiente de la dosis. La velocidad de caída provocada por los lisados fue similar a la observada en preparaciones hipóxicas. Preparaciones tratadas con la misma dosis de lisados de *E. invadens* PZ (cepa virulenta para reptiles) se comportaron como las no tratadas. Los efectos electrofisiológicos causados por los lisados y la hipoxia correlacionaron con el daño morfológico estructural y ultraestructural de las preparaciones. Nuestro modelo permite por tanto detectar daño morfológico temprano que correlaciona con el deterioro funcional del epitelio del colon y puede ser útil para caracterizar los factores patogénicos de *E. histolytica* y la inmunidad local en la amebiasis intestinal.

## INTRODUCCION

### A. Amibiasis

#### 1. Generalidades

La amibiasis intestinal en humanos es una infección debida a la colonización y daño de la mucosa del colon por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*.

En el marco de las enfermedades infecciosas endémicas, la amibiasis intestinal constituye una entidad patológica revestida de especial interés, por su elevada frecuencia principalmente en países pobres y con clima tropical (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1982). En 1971, Alvarez-Alva y De la Loza indicaron que la importancia capital de la infección por *E. histolytica* en México se debe a que de cada tres individuos que mueren de amibiasis en Hispanoamérica, uno es mexicano, por lo que la tasa de mortalidad es de 4.6 por 100,000 habitantes, la más elevada de Hispanoamérica. Otros estudios refieren que el parásito se encuentra en proporciones que varían del 5 al 75% de la población mexicana y predomina en los medios pobres y mal saneados (Kumate y Gutiérrez, 1978).

Los estudios epidemiológicos establecen a la amibiasis como una enfermedad que se puede adquirir por la ruta fecal-oral, usualmente por contagio de persona a persona. En muchas áreas geográficas los brotes de amibiasis han sido asociados a la contaminación del agua y los alimentos (ver Ravdín y Guerrant, 1982). Aunque hay diversos medicamentos antiambianos para el tratamiento de la enfermedad, se calcula que la prevalencia de la infección intestinal es alrededor del 10% en la población mundial (Walsh, 1986).

#### 2. *Entamoeba histolytica*

*E. histolytica* es un protozooario de elevado pleomorfismo. Su forma y movilidad son muy sensibles a cambios fisicoquímicos del ambiente, lo mismo que a variaciones locales de pH, osmolaridad y potencial de óxido-reducción.

*E. histolytica* puede ser observada en las heces como trofozoito, prequiste y quiste. Los trofozoitos (formas móviles) se distinguen de otras amibas intestinales por características morfológicas que sirven para el diagnóstico. El tamaño puede ser de 10-60  $\mu\text{m}$ . Los quistes (formas inmóviles) son redondos u ovals, ligeramente asimétricos

y de 10-12  $\mu\text{m}$  de diámetro. El quiste inmaduro tiene un solo núcleo que ocupa un tercio de su diámetro y cuando ha madurado contiene cuatro pequeños núcleos.

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente simple si se compara con los de otros parásitos, ya que no han sido encontrados ni un estado sexual en las amibas ni huéspedes intermedios (ver Trissl, 1982). La forma resistente al medio ambiente es el quiste, bajo la cual el parásito puede sobrevivir hasta varias semanas en condiciones apropiadas de temperatura y humedad. El quiste también es la forma infectante, ya que al ser ingerido con alimentos o a través de objetos contaminados, puede ocasionar la infección de sujetos sanos. Por acción de los líquidos intestinales, del quiste viable se liberan cuatro a ocho pequeños trofozoítos que pueden establecerse y colonizar la mucosa del colon. Los trofozoítos pueden formar nuevamente quistes que luego son excretados en las heces (Brown, 1983).

La organización citoplásmica de *E. histolytica* se caracteriza por la ausencia de la mayoría de los organelos diferenciados de las células eucarióticas: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtúbulos (Martínez-Palomo, 1982). El endoplasma contiene numerosas vesículas incluidas en la matriz citoplásmica que presenta el aspecto de vidrio despolido. Además de las vesículas citoplásmicas se puede observar un sistema vacuolar y un sistema tubular, ambos de estructura muy compleja.

**Sistema vacuolar.** Una gran porción del citoplasma se encuentra ocupada por una población heterogénea de vesículas y vacuolas limitadas por membranas de tamaño muy variable que oscila entre 0.5 a más de 9  $\mu\text{m}$ . Los tipos vacuolares cuya ultraestructura se puede identificar en el citoplasma amibiano son: vacuolas micropinocíticas, vacuolas macropinocíticas, vacuolas fagocíticas y "lisosomas", cuerpos residuales y vacuolas autofágicas. Numerosos autores han descrito la presencia de fosfatasa ácida asociada a ciertas membranas vacuolares, pero no libres en el interior de las mismas, por lo que el término lisosoma es aplicado en forma vaga a las estructuras referidas en el citoplasma amibiano (Treviño-García et al., 1971; Feria-Velasco y Treviño, 1972b; Martínez-Palomo, 1982).

**Sistema tubular.** Este sistema ha sido interpretado como la equivalencia del retículo endoplásmico liso típico, que consiste de un sistema de elementos tubulares ramificados que constituyen una red tridimensional compacta cuyas superficies membranosas carecen de ribosomas. Los túbulos son de 20 nm de diámetro y forman espirales dispuestos paralelamente. Mientras que las membranas del sistema tubular

semejan a la membrana plasmática, ya que miden 10 nm, la membrana que encierra a los túbulos mide solamente 6 nm de espesor.

En *E. histolytica* no se han identificado ribosomas con el empleo del microscopio electrónico. Sin embargo existen ribonucleoproteínas que aparecen arregladas en hélices de 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro, que se denominan "cuerpos cromatoídes" (Rosenbaum y Wittner, 1970; Martínez-Palomo, 1982).

**Citoesqueleto.** Los microfilamentos se han identificado al microscopio electrónico en el citoplasma de la amiba. Son filamentos de 7 nm de diámetro y generalmente localizados inmediatamente por debajo de la membrana en los sitios de adhesión de la amiba al sustrato, al igual que en porciones especializadas de la membrana en donde forman canales fagocíticos. Los microfilamentos de las amibas son muy sensibles a la fijación ya que no se encuentran ligados a proteínas que les den estabilidad como en otras células eucarióticas. Los microtúbulos, similares a los encontrados en casi todas las células eucarióticas, no son visibles en los trofozoítos de *E. histolytica*. En las amibas que no se encuentran en división no se observan microtúbulos en el citoplasma ni en el núcleo. En los núcleos en división de ciertas cepas patógenas, entre ellas la cepa HM1, se han encontrado haces de microtúbulos.

**Membrana celular.** En las amibas la membrana mide 10 nm de espesor y muestra la clásica unidad de membrana. La cara interna de la membrana que está en contacto con el citoplasma está cubierta por una gran cantidad de partículas membranales heterogéneas que al parecer son proteínas integrales. La mitad externa contiene menor cantidad de partículas membranales (Martínez-Palomo, 1982).

**Cubierta celular.** La cubierta celular cubre la cara externa de la membrana plasmática de la amiba. Está formada por dos capas: una amorfa de 15 nm de espesor y una filamentosa de 50 nm. Al parecer ambas contienen complejos de mucopolisacáridos ácidos y proteínas (Feria-Velasco et al., 1972). La cubierta de *E. histolytica* carece de ácido siálico a diferencia de la mayoría de las células eucarióticas (Feria-Velasco et al., 1973, 1980). Esta cubierta amibiana es de gran interés ya que se acepta que contiene antígenos amibianos reconocidos como extraños por el huésped al establecerse la amibiasis invasora (Feria-Velasco y O'Shea, 1974; O'Shea y Feria-Velasco, 1974).

**Núcleo.** En *E. histolytica* el núcleo mide entre 4 y 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La membrana nuclear está limitada por una capa uniforme y delgada de gránulos que le dan un aspecto anillado en los cortes de parafina. Los cúmulos de cromatina tienen tamaño uniforme y están siempre periféricamente distribuidos por dentro de la membrana

nuclear. Se ha demostrado por microcinematografía que el núcleo no tiene una posición fija dentro del citoplasma sino que se mueve libremente en él. En su parte central el núcleo posee el cariosoma o endosoma que es una masa esférica formada de material granular electrodensito de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Entre el endosoma y la cromatina periférica se encuentra cromatina (Martínez-Palomo, 1982).

### 3. Infección

#### a. Intestinal

Los quistes formados en la luz del intestino grueso pasan hacia las heces y son inmediatamente infectantes. Cuando son ingeridos resisten al jugo gástrico y pasan hacia el intestino delgado. Ahí, bajo la influencia de los jugos digestivos la pared del quiste se desintegra, liberando el metaquiste tetranucleado que inmediatamente se divide en ocho pequeños trofozoítos uninucleados. Estas pequeñas amibas se mueven a lo largo del intestino grueso, donde en condiciones apropiadas crecen e invaden la mucosa y la submucosa (Brown y Neva, 1983)

El Comité de Expertos en Amibiasis de la OMS definió esta enfermedad como la situación en la que se porta el parásito *E. histolytica*, con manifestaciones clínicas o sin ellas. La amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal, y cuando se vuelve extraintestinal generalmente afecta el hígado. (Pérez-Tamayo, 1982).

La amibiasis intestinal puede ser crónica, subaguda y aguda. La forma crónica ocurre en individuos cuyo intestino grueso ha sido colonizado por amibas pero que no presentan síntomas de la enfermedad amibiana, pudiendo permanecer en ellos la infección asintomática por largo tiempo. La forma subaguda ocurre como diarrea y disentería; es más frecuente en niños. La forma aguda, con colitis amibiana fulminante y apendicitis amibiana, tiene un índice de mortalidad que varía del 20 al 50% (Sepúlveda, 1982).

De acuerdo con su sintomatología variable, puede producir una amplia variedad de alteraciones anatómicas. Las correspondientes a cuadros clínicos bien definidos se conocen como colitis ulcerativa amibiana, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana. En la colitis ulcerativa amibiana, las úlceras amibianas típicas se observan en el colon (especialmente en el ciego), en el colon sigmoide y en el recto; las lesiones se presentan como pequeñas áreas (0.1-0.5 cm) redondeadas y ligeramente elevadas de la mucosa, con centros

necróticos irregulares rodeados por un anillo de tejido edematoso. En el megacolon tóxico, forma altamente letal de amibiasis intestinal que por fortuna es muy raro (generalmente ocurre en sujetos ancianos y desnutridos), el intestino grueso está muy distendido y muestra destrucción masiva de la mayor parte de la pared, que es muy delgada y en algunos sitios puede estar representada por el peritoneo. El ameboma también es una forma rara, se presenta con mayor frecuencia en el ciego y en el colon ascendente, en forma de una gran masa de tejido bien definida y que ocupa la pared y la luz; la mucosa que la recubre es delgada y generalmente está ulcerada, mientras las otras capas de la pared se encuentran muy engrosadas, edematosas y hemorrágicas. En la apendicitis amibiana las úlceras amibianas son de tipo nodular y aunque pequeñas son características; sin embargo, con mayor frecuencia el órgano muestra el aspecto macroscópico de inflamación supurativa aguda (Pérez-Tamayo, 1982).

*b. Extraintestinal (Pérez-Tamayo, 1986)*

El absceso hepático es sin duda la complicación extraintestinal más frecuente de la amibiasis intestinal invasora. Además, las amibas encuentran más fácil diseminarse a otros órganos a partir del hígado que del intestino. Macroscópicamente, un absceso hepático amibiano es un área bien delimitada donde el parénquima del hígado está completamente reemplazado por material necrótico de color amarillento y de consistencia cremosa, generalmente rodeado por un anillo de tejido hepático congestivo. Las complicaciones torácicas de la amibiasis son secundarias al absceso hepático y generalmente se desarrollan como resultado de la ruptura del absceso a través del diafragma. Las tres formas principales de la amibiasis torácica son la pleuropulmonar, la pericárdica y la mediastinal. La necrosis pulmonar amibiana tiene una consistencia mucinosa característica y sus límites con el parénquima pulmonar vecino no son claros. Los vasos sanguíneos no son atacados y no existen hemorragias o trombosis prominentes; los bronquios son especialmente resistentes a la necrosis. Los abscesos pulmonares parecen no diseminarse a otras áreas del pulmón por la vía bronquial, aún en los casos en los que los grandes bronquios están drenando material necrótico de la cavidad.

La afección amibiana del sistema nervioso central se considera rara. Nunca se presenta en ausencia de amibiasis hepática y por lo menos la mitad de los casos también tienen complicaciones pleuropulmonares. La presencia de amibas en el cerebro se explica fácilmente cuando hay un absceso amibiano pulmonar concomitante, ya que de esta manera los parásitos logran pasar al lado izquierdo de la circulación. Las

lesiones cerebrales se localizan con predominancia en el hemisferio cerebral izquierdo. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y macroscópicamente aparecen como áreas pequeñas de reblandecimiento con hemorragias petequeales o bien como focos necróticos mayores de color amarillo verdoso mezclados con áreas hemorrágicas.

Se ha mencionado que la amibiasis cutánea, cuando ocurre, es generalmente una complicación de la amibiasis intestinal con disentería. También puede presentarse en la piel que rodea a una fístula abdominal en casos de abscesos hepáticos amibianos que afectan la pared del abdomen.

La amibiasis se ha descrito en muchos otros órganos, pero generalmente en casos aislados y sin documentación adecuada.

#### **4. Patogenia**

##### **a. Toxinas y enzimas (Martínez-Palomo, 1986)**

No existen pruebas de que las cepas patógenas de *E. histolytica* produzcan y liberen sustancias semejantes a las potentes exotoxinas de ciertas bacterias. En cambio, los sonicados de *E. histolytica* contienen compuestos tóxicos para las células de mamífero. Por ejemplo, se ha demostrado que los lisados amibianos producen lisis de glóbulos rojos (Craig, 1927; Vinayak y Chitkara, 1976; López-Revilla y Said-Fernández, 1980; Prasad et al., 1982), pero la naturaleza química de la hemolisina, su localización en las amibas y su significado en los mecanismos de citólisis aún permanecen ignorados.

Durante muchos años no fue posible demostrar en las amibas, toxinas activas contra células nucleadas de mamífero, debido a que muchas de las proteínas amibianas con actividad citotóxica son inhibidas por componentes del medio de cultivo. Sin embargo, se han concentrado, purificado parcialmente y analizado la actividad citotóxica de ciertas toxinas amibianas (Bos, 1979; Lushbaugh et al., 1979; Mattern et al., 1980; Ravdin et al., 1980). Las pruebas de citotoxicidad han mostrado que las toxinas producen retracción y despegan las células del sustrato, pero no tienen efecto sobre la viabilidad de las células blanco. Además, no se ha encontrado prueba de que esas toxinas participen en el efecto lítico que sigue al contacto de amibas patógenas con células en cultivo (Ravdin et al., 1980).

La caracterización química más detallada de los componentes intracelulares de las amibas con actividad tóxica sobre células de mamífero ha revelado la existencia de varias proteinasas, algunas de ellas con actividad citotóxica. Lushbaugh et al. (1984)



encontraron que la principal actividad tóxica de *E. histolytica* está en una proteinasa semejante a la catepsina B. Scholze y Werries (1984) encontraron una proteasa débilmente ácida con intensa actividad proteolítica en homogenados amibianos que se asemeja a la catepsina L.

En cultivos axénicos de *E. histolytica* se ha descrito una colagenasa potente y específica (Muñoz et al., 1982; Gadasi y Kessler, 1983). La enzima se libera después del contacto de la amiba con el sustrato específico y puede encontrarse en el medio de cultivo.

En extractos de *E. histolytica* libres de células se han descrito varias glucosidasas, pero la mayoría de ellas muestran un grado muy bajo de actividad (Trissl, 1983).

#### *b. Proteínas formadoras de poros*

En 1982, dos grupos informaron independientemente el hallazgo de proteínas formadoras de poros en lisados amibianos y el medio de cultivo en el que las amibas habían crecido. Lynch et al. (1982) encontraron que la molécula formadora de canales era una proteína de 13,000 daltones, concentrada en una fracción que sedimenta a 150,000 X g. La proteína se incorpora espontáneamente a bicapas lipídicas artificiales y a membranas naturales, creando cambios progresivos e irreversibles en la conductancia iónica. Young et al. (1982) encontraron actividad formadora de poros, tanto en lisados congelados y descongelados, como en pastillas de membranas, mientras que Lynch et al. (1982) encontraron que esta actividad se encuentra en una fracción sedimentable sensible a detergente, lo que sugiere que la actividad está localizada dentro de un organelo limitado por membrana. Anteriormente ya se habían descrito proteínas formadoras de poros en ciertas bacterias y en algunas levaduras; estas proteínas pueden representar un mecanismo común a varios microorganismos para producir lisis de células blanco a través de cambios osmóticos, de forma comparable a como actúan otras células efectoras y el complemento (Young et al., 1982).

La proteína formadora de canales de la *E. histolytica* produce lisis de glóbulos rojos, ya que las fracciones enriquecidas de esta proteína lisan eritrocitos de rata y de conejo. Se ha demostrado que esta proteína puede ser liberada por las amibas por estimulación con la concavalina A, con un ionóforo del calcio, o con lipopolisacárido bacteriano (Young et al., 1982).

#### *c. Neurotransmisores*

Los sobrenadantes de lisados amibianos contienen, además de proteasas y de proteínas formadoras de poros, sustancias semejantes a ciertas neurohormonas, como la serotonina, la sustancia P y la neurotonina (McGowan et al., 1983, 1985). Los lisados amibianos alteran el transporte intestinal de electrolitos en el íleon del conejo y en el colon de rata, estudiados mediante la técnica de fijación de voltaje en cámaras de Ussing. Esta actividad se encuentra sólo cuando los productos amibianos se colocan en la superficie serosa del tejido intestinal. Se ha sugerido que los productos semejantes a neurohormonas aislados de *E. histolytica* pueden estar asociados con diarrea secretora, ya que las amibas invasoras, la mayoría localizadas en la lámina propia, podrían estimular el transporte de agua en el lado basal del epitelio intestinal (McGowan et al., 1985).

Sin embargo, la participación de estos componentes amibianos en la patogenia de la amibiasis es, hasta ahora, puramente hipotética. Los mecanismos bioquímicos que pueden tener mayor interés para la mejor comprensión de la enfermedad son aquellos que expliquen la lisis de las células blanco, la capacidad invasora del parásito y su habilidad para sobrevivir y multiplicarse frente a la respuesta inmune del huésped.

## 5. Inmunidad

### a. Sistémica

Los estudios sobre la producción de anticuerpos anti-amibianos en el suero de pacientes con amibiasis intestinal y extraintestinal indican que los componentes amibianos tienen antigenicidad suficiente para inducir una respuesta inmune sistémica por anticuerpos (Neal et al., 1968; Ali Khan y Meerovitch, 1968; Vinayak et al., 1981). En general se observa que los títulos de anticuerpos séricos aumentan con la gravedad de la infección: son bajos o nulos en la amibiasis intestinal asintomática, intermedios en la amibiasis intestinal sintomática, y medianos o altos en amibiasis invasora intestinal o extraintestinal. Sin embargo, esta correlación no se mantiene siempre, ya que existen casos de abscesos hepáticos en los que los títulos son bajos e incluso nulos. Así mismo, en sujetos con amibiasis intestinal asintomática pueden encontrarse títulos altos (Vinayak et al., 1981). Por otro lado, en las poblaciones de zonas endémicas es común encontrar anticuerpos anti-amibianos en el suero de personas sin antecedentes de amibiasis (Trissl, 1982).

Los anticuerpos séricos anti-amibianos, que pertenecen principalmente a la clase G, tienen la capacidad de inmovilizar trofozoitos. También permiten la fijación del

complemento (Sepúlveda et al., 1974), aunque no se ha observado aumento en la lisis de trofozoítos por complemento en presencia de anticuerpos antiámibianos, con respecto a la lisis por complemento en ausencia de ellos, lo que sugiere la existencia de mecanismos que inactivan dichos anticuerpos (Trissl et al., 1986).

La relevancia de los anticuerpos séricos en la protección es discutible, ya que a pesar de su presencia en el suero no es rara la reinfección con *E. histolytica* (Krupp, 1970).

En cuanto a la serología de la amibiasis, no hay duda en cuanto a su utilidad en el diagnóstico del absceso hepático (Healey et al., 1971) y del ameboma (Toswill et al., 1980) en donde las pruebas convencionales no dan falsos positivos. Sin embargo, es menos prominente en el diagnóstico de la amibiasis intestinal invasora, donde arroja 60-90% de positividad (Kessel et al., 1961, 1985; Trissl, 1982). La persistencia prolongada de los anticuerpos agrega una dimensión de error en casos en los que la serología se aplica a pacientes con lesiones intestinales invasoras. Las pruebas convencionales son incapaces de distinguir entre invasión reciente o antigua (3 años) (Jackson et al., 1984).

*E. histolytica* activa el sistema del complemento en presencia y en ausencia de anticuerpos, y en mayor proporción la vía clásica (Ortiz-Ortiz et al., 1978). Esta activación provoca la lisis de los trofozoítos *in vitro* y posiblemente constituye un factor natural de defensa contra la infección amibiana. En pacientes con absceso hepático los niveles de C3d, producto de la activación del complemento, correlacionan directamente con la evolución del padecimiento, ya que es más rápida y adecuada la recuperación de los pacientes con niveles altos de C3d (Muñoz-Espinosa et al., 1986). La descomplementación de hámsteres con veneno de cobra aumenta la gravedad de las lesiones hepáticas producida por la inoculación intrahepática de trofozoítos (Capín et al., 1980).

Los linfocitos T (LT) juegan un papel importante en la inmunidad celular de la amibiasis, ya que el tratamiento de animales infectados experimentalmente con drogas supresoras de LT o con sueros antilímicos, disminuye la capacidad de respuesta inmune por anticuerpos dirigidos contra los antígenos amibianos y provoca que las lesiones hepáticas causadas por trofozoítos sean de mayor gravedad que en los animales no inmunosuprimidos (Arias-Negrete y Calderón, 1980; Vinayak et al., 1982).

Los extractos amibianos tienen actividad mitogénica sobre LT, pero se desconoce si esta actividad promueve la proliferación de alguna subpoblación especial, que pudiera modular la respuesta inmune contra las amibas (Diamantstein et al., 1981). Existe además un retardo en la capacidad de producción del factor inhibidor de la migración de

macrófagos por los LT, que es un mediador de la respuesta inmune celular en pacientes con absceso hepático (Ortiz-Ortiz et al., 1975).

La inyección de hámsteres con suero de conejo anti-macrófagos antes de la inoculación intrahepática de trofozoítos, produce un aumento en el tamaño y número de los abscesos hepáticos secundarios (Ghadirian et al., 1983). También se ha observado una disminución en la fagocitosis de bacterias por monocitos de hámsteres con absceso hepático (Capín et al., 1980).

Se ha sugerido que hay al menos un factor quimiotáctico para monocitos humanos en los sobrenadantes de cultivos axénicos de *E. histolytica* y se ha descrito que los trofozoítos producen factores inhibidores de la migración de los monocitos (Kretschmer et al., 1980, 1986).

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) parecen ser el primer tipo celular que se encuentra en las reacciones inflamatorias durante las etapas tempranas de la formación de abscesos hepáticos en hámsteres y cobayos (Canales et al., 1986). Los PMN pueden lisar a los trofozoítos si la relación amibas/PMN es apropiada. Esta capacidad lítica de los PMN no requiere suero inmune, sino más bien depende de la virulencia de la cepa amibiana (Guerrant et al., 1981; López-Osuna et al., 1986).

Otro factor que ha sido estudiado es la liberación de histamina, que tiene un importante papel regulador de la respuesta inflamatoria. Se ha encontrado que la liberación de histamina por leucocitos de pacientes con absceso hepático es estimulada con extractos de trofozoítos y ocurre con dosis menores de dichos extractos que en los leucocitos de sujetos sanos. Por lo tanto, hay hipersensibilidad inmediata en los pacientes con amibiasis invasora, la cual puede contribuir a la modulación de la respuesta inflamatoria (Gil-Recasens et al., 1982). La liberación de histamina inhibe en los PMN la quimiotaxis, la fagocitosis y la secreción de enzimas, así como la producción de linfocinas por las células T y la secreción de anticuerpos (IgA secretora) antiamibianos específicos (Campos-Rodríguez et al., 1986).

#### **b. Local**

La inmunidad local ha sido poco estudiada en general y en particular en la amibiasis. Los estudios que existen, por lo general han sido hechos indirectamente durante trabajos enfocados en otro sentido.

La respuesta inmune local por anticuerpos es casi el único aspecto estudiado en la amibiasis intestinal en humanos, aunque no extensamente. Estos anticuerpos intestinales, llamados también coproanticuerpos, específicos contra *E. histolytica* han sido

detectados en las heces de sujetos con amibiasis intestinal no invasora e invasora (Sharma et al., 1978; Martínez-Cairo et al., 1979; O'Shea-Alvarez y Treviño, 1985). La secreción biliar de IgA reactiva contra trofozoitos ha sido producida experimentalmente en ratas inmunizadas parenteralmente (Acosta et al., 1983).

Se ha reportado una disminución de los niveles de IgA en el líquido yeyunal de pacientes con colitis amibiana o absceso hepático amibiano (Ahluwalia et al., 1982).

La inmunidad local anti-amibiana mediada por células en el intestino prácticamente no ha sido estudiada. Se sabe que la inmunosupresión por fármacos o con sueros anti-LT o anti-monocitos producen un aumento en el número y gravedad de las lesiones amibianas intestinales (Vinayak et al., 1982). No se conoce el papel de las células cebadas, basófilos y eosinófilos durante la infección intestinal.

## B. Estructura del intestino

### 1. Generalidades

El intestino grueso está dividido topológicamente y para algunas extensiones, estructuralmente, en tres segmentos principales: colon, recto y canal anal. A lo largo del intestino grueso, la pared está compuesta por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa.

Entre el intestino delgado y el colon hay un cambio abrupto, la unión ileocecal. El gran diámetro del colon es tal vez la diferencia más llamativa. Hay otras diferencias estructurales en las capas.

### 2. Capas principales

#### a. Mucosa

La membrana mucosa del colon tiene una superficie comparativamente lisa, ya que no tiene vellosidades como el intestino delgado. Sin embargo, al igual que el intestino delgado, la mucosa está formada por tres capas: i) un revestimiento epitelial; ii) la lámina propia de soporte y iii) una capa de músculo liso, la muscular de la mucosa. El epitelio es una capa de células columnares. El tipo de epitelio varía según la función que corresponda a cada parte del tubo digestivo; en ocasiones es ante todo protector, en otras es de absorción y en otras de secreción. El epitelio forma invaginaciones hacia la lámina propia denominadas criptas o glándulas de Lieberkühn. Las células de absorción tienen un borde estriado el cual es más delgado que el de las células del intestino

delgado. Las células caliciformes están intercaladas entre las células columnares de absorción.

La membrana mucosa del colon tiene dos funciones principales atribuidas a las células columnares de absorción y las caliciformes, respectivamente: la absorción de agua y la producción copiosa de moco.

La superficie epitelial tiene importancia como una barrera entre el medio interno y el exterior, su capa única de células es capaz de resistir efectos físicos y químicos variados. Debido al recambio y al continuo desgaste que sufre el epitelio de la mucosa intestinal, continuamente se descaman células en ciertas zonas del epitelio, desde donde son arrojadas a la luz intestinal. La integridad del revestimiento intestinal se mantiene mediante la proliferación de las células epiteliales en las criptas de Lieberkühn, desde donde las células migran para sustituir a las que se descaman en la superficie epitelial. La migración y pérdida de las células no se debe a presión por acumulación de nuevas células, sino a migración vectorial del epitelio intestinal. La gran cantidad de mitosis características de las células de las criptas intestinales señala la proliferación debida al continuo recambio celular. Con el empleo de timidina tritiada se ha demostrado que el tiempo de recambio celular en el colon varía entre 1 y 10 días.

El tejido conectivo de la *lamina propria* está muy extendido entre las glándulas pero es reducido por la cercanía de los túbulos de las glándulas. Esta compuesto de fibras reticulares entrecruzadas y delicadas fibras de colágena, con un considerable número de fibrillas elásticas. También contiene células del tejido conjuntivo: fibroblastos, eosinófilos, células plasmáticas, células cebadas, etc. Los linfocitos están presentes en todos los segmentos intestinales y en muchos lugares son tan abundantes que dan la apariencia de un tejido linfático difuso.

Los nódulos linfáticos solitarios que están en la submucosa se hacen aparentes en la mucosa al atravesar la *muscularis mucosae*.

La *muscularis mucosae* consiste de una capa circular interna y una capa longitudinal externa de músculo liso.

#### **b. Submucosa**

La submucosa está compuesta de tejido conjuntivo laxo. Contiene vasos sanguíneos y los plexos nerviosos de Meissner. Los folículos linfáticos solitarios, aunque propiamente considerados como estructuras de la *lamina propria* desde donde se originan, yacen principalmente en la submucosa.

### c. Muscular externa

La muscular externa en el colon muestra algunas variaciones en su estructura usual. La capa circular interna es completa y prominente, pero los músculos longitudinales están arreglados en tres fuertes bandas longitudinales, planas, equidistantes, las *lineae coli*. Entre estos gruesos filamentos se adelgaza la cubierta de músculo longitudinal aunque raramente está enteramente ausente. Las células nerviosas y las fibras componentes de los plexos de Auerbach yacen, como es usual, en el tejido conjuntivo inmediatamente por fuera de la capa muscular circular.

### d. Serosa

La serosa está compuesta de una delgada capa de tejido conjuntivo cubierta por mesotelio. En ciertas regiones, la cubierta mesotelial está ausente. En esta capa el tejido conjuntivo fibroso une el colon firmemente a las estructuras adyacentes.

## 2. Células epiteliales

### a. De la superficie

Son células completamente diferenciadas que se denominan células columnares de absorción. Son el tipo celular más numeroso y forman una capa virtualmente continua que tapiza la luz intestinal. El citoplasma de dichas células presenta los organelos usuales; las mitocondrias son numerosas, con dimensiones promedio de 3  $\mu\text{m}$  de longitud. La matriz mitocondrial es de opacidad media y contiene un número moderado de gránulos densos intramitocondriales, particularmente en las células de las criptas.

El retículo endoplásmico rugoso y el liso se encuentran principalmente en la región supranuclear. Las cisternas del retículo endoplásmico rugoso son de longitud moderada y en el citoplasma se encuentran numerosos ribosomas libres.

El aparato de Golgi está localizado en la región supranuclear, presenta la forma laminar característica y está asociado con un pequeño número de vesículas en el citoplasma circundante. El aparato de Golgi es activo en la síntesis de complejos polisacáridicos, destinados probablemente a la cubierta superficial que se extiende sobre las microvellosidades.

Los lisosomas aparecen como estructuras rodeadas por membrana y contienen componentes de densidad variable, con áreas laminares y granulares. En ocasiones

contienen estructuras que semejan organelos citoplásmicos en aparente estado de destrucción.

La matriz citoplásmica de las células epiteliales es moderadamente densa, contiene cantidades variables de finos filamentos de longitud indefinida, los cuales parecen formar una delicada red o citoesqueleto. En la región subyacente a las microvellosidades se presenta una agregación del material fibrilar, denominada red terminal, que tiene conexión con las partes laterales de la célula.

Las superficies de contacto de células columnares adyacentes muestran especializaciones características; en la región apical los complejos de unión forman una zona de anclaje continua a manera de collar, constituida por la unión hermética. Los desmosomas aparecen a intervalos entre el complejo de unión apical y la base de la célula. Comúnmente se pueden observar numerosas interdigitaciones de proyecciones celulares; en otras áreas, las células pueden separarse sustancialmente y dejar un espacio intercelular amplio, principalmente en la base del epitelio.

La estructura de absorción es el borde de cepillo, que consiste en discretas proyecciones citoplásmicas o microvellosidades, las que aumentan la superficie luminal de las células. En las microvellosidades se observa un núcleo central constituido por fibrillas longitudinales dispuestas desde la membrana apical hasta la red terminal.

#### *b. Indiferenciadas*

Las células indiferenciadas o proliferativas de las criptas realizan la función de renovación celular del epitelio intestinal. La estructura de estas células es diferente a la de las células epiteliales de la superficie.

El citoplasma contiene numerosos gránulos limitados por membranas, considerados como de secreción. La naturaleza de la secreción de estas células no es clara, pero se considera que toman parte en la producción del jugo intestinal. Las interdigitaciones entre las células son menos prominentes. Existe además una población homogénea de lisosomas primarios.

La diferencia más pronunciada radica en las dimensiones y arreglo de las microvellosidades. En las células de las criptas son cortas y gruesas y su número por célula es menor. La red terminal virtualmente no existe y la orientación de las microvellosidades es irregular. La cubierta celular es menos prominente. Las células en mitosis son características de esta región y presentan una forma esférica, aunque mantienen contacto con la luz de la cripta.



### *c. Caliciformes*

Las células caliciformes secretan un complejo proteína-carbohidrato sulfatado, al cual se le atribuye una función lubricante y protectora del intestino.

La célula caliciforme típica tiene base estrecha, el núcleo situado basalmente y el ápice distendido por la acumulación de vacuolas de mucopolisacáridos. El aparato de Golgi es extremadamente elaborado, con una configuración cilíndrica característica, en la región supranuclear.

Las vacuolas de secreción se originan en el aparato de Golgi; varían en densidad a los electrones y contienen material finamente granular con un área central más densa.

Las mitocondrias son notorias, aunque la alta densidad citoplásmica hace difícil distinguirlas. En la región luminal las células presentan microvellosidades irregulares en escaso número.

El proceso de diferenciación de las células caliciformes se inicia en las células indiferenciadas de las criptas con el incremento en la organización del aparato de Golgi. Las membranas del retículo endoplásmico aparecen en la periferia del aparato de Golgi y en algunos sitios esas cisternas se comunican con la cisterna perinuclear. En estadios posteriores, el núcleo, las mitocondrias y el retículo endoplásmico son desplazados y comprimidos por las vacuolas de secreción hacia la base de la célula y son difícilmente distinguibles.

### *d. Enterocromafines*

Este tipo celular posee una morfología característica y reacciones de tinción específicas, algunas de las cuales se basan en reducir las sales de plata y cromo.

En el citoplasma es característico encontrar haces de fibrillas orientadas al azar, sin conexión con los sitios de anclaje. El retículo endoplásmico rugoso aparece en pequeña cantidad, principalmente en localización supranuclear. El ápice de las células puede alcanzar la luz intestinal y presentar microvellosidades.

Las células tienen una cantidad variable de gránulos densos, generalmente agregados en la base, la cual comúnmente se amplía y está en contacto con la membrana basal.

No se tiene evidencia de que estas células produzcan enzimas digestivas o secreción exócrina. Sin embargo, se ha reportado liberación de gránulos. La granulación basal de estas células y su similitud con la de células con función endócrina conocida, sugiere que las células enterocromafines son de naturaleza secretora endócrina.

Actualmente se acepta que el sistema de las células enterocromafines produce 5-hidroxitriptamina o serotonina.

#### *e. Linfoides*

Adicionalmente, se encuentra en el epitelio intestinal un tipo celular con aspecto morfológico de linfocitos; se encuentran en número considerable en la base del epitelio, comúnmente en espacios intercelulares preexistentes. Estas células proceden de la *lamina propria*.

### **C. Amibiasis intestinal**

Dentro de la amibiasis, uno de los aspectos más importantes es el mecanismo de penetración de las amibas al epitelio. Para determinar el mecanismo de invasión se han adoptado tres formas de estudio: 1) el examen de biopsias de pacientes con amibiasis, 2) examen de cortes de la mucosa intestinal de animales inoculados experimentalmente con amibas, 3) sistemas de estudio *in vitro* con células en cultivo.

Estos diferentes sistemas han permitido obtener diversos resultados de la interacción amiba-células del huesped.

#### **1. Biopsias humanas**

Prathap y Gilman (1970) describieron la evolución de las lesiones colónicas iniciales en biopsias de pacientes con amibiasis intestinal aguda. Clasificaron las modificaciones observadas por ellos en cuatro tipos: a) lesión inespecífica, que consiste en engrosamiento de la mucosa; b) lesión inicial, que consiste tanto en depresión de la superficie mucosa, que se vuelve carente de mucina, como en un cambio en la forma de las células epiteliales de columnar a cuboidal; c) pequeñas lesiones en el espacio interglandular del epitelio, sitio por el cual ocurre la invasión de los trofozoítos; y d) la "úlceras en matriz" cuyos límites no se determinan claramente y abarca la mucosa y la *muscularis mucosae*. Estos autores consideran que la citólisis y la destrucción del tejido son debidas a enzimas liberadas por las amibas.

#### **2. Inoculación a animales**

Takeuchi y Phillips (1975) propusieron una reconstrucción de la secuencia de eventos que suceden en la invasión del epitelio cecal de cobayos infectados experimentalmente.

Consideran que cuando los trofozoítos se encuentran en cercana proximidad a las células epiteliales de la mucosa, las microvellosidades de las mismas se acortan, se hacen irregulares y algunas veces desaparecen. Cuando se produce el contacto con la célula, el citoplasma apical de la célula epitelial se proyecta hacia la amiba, de manera que queda un espacio al despegarse la célula dañada de las células vecinas, por el cual pueden ahora penetrar los trofozoítos gracias a su movimiento amiboideo, hasta alcanzar la *lamina propria*. Una observación interesante que estos autores comparten con otros es que la invasión inicial se efectúa en la superficie interglandular del epitelio. Consideran además que un producto de las amibas causa los cambios focales iniciales que sufren las células epiteliales y que los productos originados por la lisis de los leucocitos polimorfonucleares contribuye a la invasión posterior de las amibas a través de la *lamina propria*.

### 3. Sistemas in vitro

Knight y colaboradores (1974) empleando monocapas de células de riñón de conejo en cultivo observaron que las lesiones detectables con el microscopio electrónico se inician cuando los trofozoítos establecen contacto con las células (el medio de cultivo usado por las amibas no produjo daño). En los estadios iniciales de la interacción no se encontró daño en la membrana plasmática, sino más bien en algunos componentes citoplásmicos, especialmente las mitocondrias, las cuales mostraron vacuolización y pérdida de las crestas. Cuando la interacción fue prolongada se observaron daños focales en la membrana plasmática. Los autores concluyeron que el efecto citopático se debe a enzimas liberadas por la amiba, pero es necesario un estrecho contacto amiba-células blanco para que el daño se produzca.

## D. Propiedades eléctricas de los epitelios

### 1. Transporte de iones

Algunos tejidos de animales están compuestos por células agrupadas sólidamente y la solución que las rodea y baña, el líquido intersticial. El plasma de las células o líquido intracelular y el líquido intersticial son similares; ambos consisten de agua y de igual número de partículas disueltas por unidad de volumen. La barrera funcional entre el líquido intersticial y el intracelular es la membrana celular, que restringe severamente el intercambio de material. Las diferencias entre el líquido intersticial y el intracelular son mayores que sus similitudes. Para nuestro caso, hay dos diferencias importantes (i) la

concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ) son mucho más altas en el líquido intersticial que en el intracelular, justamente lo contrario que para el potasio, cuya concentración es más alta intracelularmente que intersticialmente; (ii) hay una diferencia de potencial eléctrico entre el líquido intersticial y el intracelular.

Por tanto, las células trabajan para mantener la composición que es óptima para su sobrevivencia. Esta no es una función especializada; las células responden a cualquier cambio del medio interno arregiando la composición iónica al de una célula normal. Por ejemplo, mientras que células tales como las neuronas tienen como función primaria mantener los canales dependiente de voltaje, también transportan iones para que la composición intracelular de electrolitos sea favorable para el funcionamiento celular. Esta última función viene a ser más complicada en células epiteliales cuya función primaria es el transporte de iones. Así, las células epiteliales literalmente luchan para sobrevivir porque en ellas la regulación de la composición iónica intracelular es un balance entre la velocidad de entrada de iones y la velocidad con que los mismos iones salen de la célula (Lewis y Wills, 1981).

En el colon de vertebrados puede afectarse el transporte neto de sales, y por tanto de agua, en la dirección de absorción o de secreción, dependiendo del estado hormonal del animal y de la presencia o ausencia de agentes patógenos. La base iónica para este flujo de sales es relativamente compleja y no bien comprendida, pero parece involucrar el transporte activo (acoplado metabólicamente) de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ ; así como el movimiento de estos iones. Los canales iónicos juegan un papel importante en cada uno de estos procesos de transporte (Dawson, 1991).

En el modelo clásico de Koefoed-Johnsen y Ussing (KJU) (1958) para la absorción de  $\text{Na}^+$  electrogénico, la polaridad de las células de absorción, que es esencial para el transporte transcelular, es producida en parte por la disposición asimétrica de clases específicas de canales iónicos. La membrana apical es postulada para canales selectivos a  $\text{Na}^+$ , amilorida-sensibles, que facilitan la entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula bajo un gradiente de potencial electroquímico favorable, mientras que la membrana basolateral es dominada por canales de  $\text{K}^+$  que permiten la salida del  $\text{K}^+$  acumulado en la célula por la ATPasa- $\text{Na}/\text{K}$ . Como la estequiometría de la ATPasa- $\text{Na}/\text{K}$  es de  $3\text{Na}:2\text{K}$ , y la concentración intracelular de  $\text{K}^+$  es mayor. Dawson y Halm (1984) añadieron canales apicales al modelo básico de KJU. La célula permite la secreción activa de  $\text{K}^+$ , y el balance entre el reciclaje basolateral de  $\text{K}^+$  y la secreción apical del mismo sería determinado por la conductancia relativa de  $\text{K}^+$  y la permeabilidad de ellos en las dos membranas.

En el colon de mamíferos la absorción activa de  $\text{Na}^+$  ocurre propiamente a través de las células de la superficie, mientras que la secreción de sales está a cargo de las células de las criptas, las que transportan  $\text{Cl}^-$ . El modelo consenso para la secreción activa de  $\text{Cl}^-$  (Binder y Sandle, 1987; Dawson y Richards, 1990; Wilkinson y Dawson, 1989), el determinante principal para el flujo secretor de sales y agua. La asimetría de la membrana requerida para el transporte secretor de  $\text{Cl}^-$  es dada por canales de  $\text{Cl}^-$  localizados en la membrana apical y canales de  $\text{K}^+$  basolaterales. Aquí el transporte transcelular requiere también no sólo de la salida apical de  $\text{Cl}^-$ , sino también del flujo basolateral de  $\text{K}^+$  hacia fuera. En este modelo el peso del  $\text{K}^+$  reciclado es mejor nivelado porque éste puede entrar a la célula por la vía del cotransporte de  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$  como por la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . A este modelo básico de secreción también es necesario añadir los canales apicales de  $\text{K}^+$  propuestos para el modelo de básico de absorción.

En la adición de los canales apicales de  $\text{K}^+$  es interesante contrastar la capacidad secretoria de ambos modelos. Considerar por ejemplo, el caso limitante en el que todo el  $\text{K}^+$  que entra a la célula a través de la membrana basolateral es secretado (la conductancia apical de  $\text{K}^+$  es mucho mayor que la basolateral). La adición del cotransporte incrementa la velocidad potencial de entrada basolateral de  $\text{K}^+$  tal que, para la misma velocidad de intercambio de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y suponiendo estequiometría fija ( $3\text{Na}^+:\text{2K}^+$  y  $1\text{Na}^+:\text{1K}^+:\text{2Cl}^-$ ) la máxima velocidad secretoria en "steady-state" para el modelo secretor es más del doble que para el modelo de absorción (Dawson, 1991). Hay que notar que este resultado se basa en parte en la suposición de que en el modelo secretor el  $\text{Na}^+$  es reciclado en la membrana basolateral.

## ***2. Diferencia de potencial, corriente de corto circuito, resistencia y conductancia***

La diferencia de cargas dadas por los iones hace del epitelio un capacitor, compuesto de dos conductores, el lado mucoso y el lado seroso, separados por un aislante: la pared intestinal. Como los iones pueden penetrar la pared intestinal de manera limitada, el intestino no es un capacitor perfecto.

Cuando la vejiga urinaria o piel de anfibio es montada entre dos hemisferios de cámaras de Ussing (Fig. 1), y bañada con soluciones idénticas en sus dos superficies, la solución serosa es eléctricamente positiva respecto al medio mucoso. Cuando se pasa corriente eléctrica a través del tejido desde el medio seroso al mucoso, aumenta la diferencia de potencial trasepitelial (DP) espontánea es incrementada; el tejido es hiperpolarizado. El paso de corriente positiva en la dirección opuesta despolariza el tejido, reduciendo el valor espontáneo o el circuito abierto de DP. Con el paso de

suficiente corriente despolarizante, la diferencia de voltaje entre las dos fases acuosas externas puede ser reducida a cero. Bajo estas condiciones, se dice que la preparación está en estado de corto circuito y la corriente necesaria para fijar el voltaje de la preparación a 0 mV es llamada corriente de corto circuito ( $I_{cc}$ ) (Civan, 1983).

Por tanto, DP es la diferencia en carga eléctrica entre el lado seroso y el mucoso de tejido epitelial, que es debido a diferencias en la concentración de iones. La  $I_{cc}$  es la cantidad de corriente continua necesaria para nulificar la DP. La resistencia ( $R$ ) resulta del cociente de DP (voltios) entre  $I_{cc}$  (amperios/cm<sup>2</sup>). La conductancia total del tejido, representa la recíproca de la resistencia del tejido (i.e.,  $1/R$  del tejido). La permeabilidad de un tejido intacto a las cargas eléctricas dadas por los iones es debida a los flujos transcelular y paracelular (Fasano et al., 1990).

La mucosa intestinal se parece a otros epitelios que transportan  $Na^+$ , tales como la piel y la vejiga urinaria de anfibios, puesto que se encuentra en ellos DP e  $I_{cc}$  que normalmente resultan del transporte activo de  $Na^+$  desde la capa mucosa a la serosa (Frizzell et al., 1976; 1978). La mucosa intestinal también se comporta de manera similar a los otros epitelios en su respuesta a factores o fármacos que afectan el transporte de sodio.

## E. Agentes que afectan las propiedades eléctricas

### 1. Fármacos

#### a. Vasopresina y aldosterona

La vasopresina (hormona diurética) tiene grandes efectos sobre los epitelios de transporte: incrementa la permeabilidad al movimiento de agua a través del epitelio y el transporte activo de sodio. Experimentos en vejiga de sapo mostraron que que la  $I_{cc}$  y el transporte de sodio son estimulados por bajas concentraciones de vasopresina; los incrementos en la permeabilidad hidromótica en vejiga requieren una concentración mayor de vasopresina (Wright y Snart, 1971). El incremento en la permeabilidad al  $Na^+$  por la vasopresina permite más entrada de  $Na^+$  a las células epiteliales, la que lleva a una extrusión mayor de  $Na^+$  de la célula, incrementando la capacidad de bombeo (Handler y Orloff, 1973).

Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que el AMP cíclico (AMPc) es el mediador intracelular de la vasopresina. Se ha visto que la elevación en el AMPc del tejido es precedida de un aumento en la  $I_{cc}$  en vejiga de sapo (Sapirstein y Scott, 1973).

Frizzell et al. (1976) encontraron que en colon de conejo la adición de AMPc 7.5 mM en ambos lados del epitelio incrementa la lcc, 2.5 veces y mas que el observado por Field (1971) en ileon.

La aldosterona estimula el transporte transepitelial de sodio. Frizzell y Schultz (1978) mostraron que segmentos de colon descendente de conejo responden a la aldosterona (después de un periodo lag de 30 a 60 min) con un incremento marcado en lcc, un incremento equivalente en la velocidad de absorción activa de  $\text{Na}^+$  ( $J^{\text{tr}}$ ) y una caída en la resistencia del tejido. La aldosterona también provoca un incremento marcado en el influjo unidireccional de  $\text{Na}^+$  dentro de la célula a través de la membrana mucosa ("tiempo cero"), el cual no difiere significativamente del incremento en lcc.

### c. Prostaglandinas

La prostaglandina  $E_1$  estimula el transporte de  $\text{Na}^+$  a través de los epitelios. Esta estimulación puede ser potenciada por teofilina, sugiriendo que la prostaglandina  $E_1$  actúa estimulando la adenilato ciclasa. En piel de rana la respuesta a prostaglandinas tiene variaciones estacionales, en estaciones calurosas la lcc de la piel de rana es estimulada marcadamente mientras que en invierno hay una respuesta pequeña. La prostaglandina  $E_1$  y la vasopresina estimulan la lcc y causan un decremento en la resistencia del tejido. El tratamiento de piel de rana con prostaglandina  $E_1$  exógena, incrementa los niveles de AMP cíclico, que permiten también un aumento en lcc. El transporte de  $\text{Na}^+$ , medido por la lcc, decrece con la adición de ácido acetilsalicílico, ácido mefenámico, paracetamol y fenilbutazona. La indometacina tiene un periodo corto de estimulación de lcc seguida por un largo periodo de depresión (Hall y O'Regan, 1975).

### d. Otros reguladores endógenos del transporte

La angiotensina II a concentraciones de  $2 \times 10^{-7}$  a  $2 \times 10^{-9}$  M produce un incremento significativo en la permeabilidad de los epitelios. La angiotensina II estimula la lcc en preparaciones de piel de varios tipos de ranas (Coviello et al., 1976).

Se ha reportado que la prolactina estimula el transporte de  $\text{Na}^+$  y la lcc en vejiga de sapo de forma similar al de la vasopresina (Debnam y Snard, 1975).

Se sabe que la norepinefrina incrementa la permeabilidad a agua y el transporte activo de sodio en piel de anfibios. Capas de células epiteliales aisladas de piel de rana responden a bajas concentraciones de norepinefrina con un incremento en la permeabilidad al agua y en la lcc. Las catecolaminas ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) incrementan la lcc

y la DP en piel de rana. Los bloqueadores beta adrenérgicos inhiben la estimulación de la lcc por catecolaminas, mientras que los alfa adrenérgicos no tienen efecto. La norepinefrina y la epinefrina causan un incremento en la lcc de vejiga de sapo. La elevación de la lcc por norepinefrina es inhibida casi completamente por bloqueadores alfa adrenérgicos pero no por los beta adrenérgicos (Wood y Tomlison, 1974).

La insulina estimula el transporte de  $\text{Na}^+$  y la lcc en la vejiga de sapo, presumiblemente por una acción sobre la bomba de la membrana basolateral de las células epiteliales. Se ha encontrado que la insulina tiene un efecto sinérgico con la vasopresina en la estimulación de la lcc en vejiga de sapo; la estimulación resultante de la aplicación simultánea de ambas hormonas excedió la suma aritmética de los efectos estimulatorios de las dos hormonas por separado (Wiesmann et al., 1976).

#### e. *Glucósidos digitales y diuréticos*

El glucósido cardiotónico, ouabaína, es reconocido como un inhibidor específico de la ATPasa- $\text{Na}/\text{K}$  y ha sido extensamente usado en estudios de transporte para inhibir la etapa de bombeo activo de  $\text{Na}^+$ . Es posible encontrar una concentración de ouabaína justamente adecuada para bloquear la actividad eléctrica espontánea de epitelios de transporte de  $\text{Na}^+$ . La adición de ouabaína  $10^{-4}$  M a la solución mucosa y a la serosa seguida de un período control resulta en una caída lenta en lcc el cual llega a un valor nulo en 20 min. La absorción activa de  $\text{Na}^+$  fue esencialmente abolida en presencia de ouabaína. La inhibición de  $\text{J}^{\text{na}}$  neta es enteramente atribuible al decremento en  $\text{J}^{\text{na}}$  mucosa-serosa con ningún cambio significativo en  $\text{J}^{\text{na}}$  serosa-mucosa (Frizzell et al., 1976).

La amilorida surgió como una herramienta farmacológica muy útil para la elucidación del mecanismo de transporte de  $\text{Na}^+$  en epitelios. El bloqueo por amilorida es a través de su unión al sitio de entrada del  $\text{Na}^+$  en la membrana apical y por competir con el sodio por este sitio. La amilorida, una vez unida, evita la unión del  $\text{Na}^+$  a este sitio. La adición de amilorida a la solución mucosa resulta en una caída rápida de lcc a cero, mientras que su adición al lado seroso no tiene efecto sobre lcc. La absorción activa de  $\text{Na}^+$  y la lcc son inhibidas marcadamente por la adición de amilorida  $10^{-4}$  M a la solución mucosa. El decremento en el flujo neto de  $\text{Na}^+$  es debido al decremento en  $\text{J}^{\text{na}}$  mucosa-serosa (Frizzell et al., 1976). El influjo unidireccional de  $\text{Na}^+$  en el epitelio desde la solución mucosa de colon descendente de conejo, determinada bajo condiciones de corto-circuito, comprende dos componentes: uno representa la entrada de  $\text{Na}^+$  a las células epiteliales y es abolida por amilorida, que también inhibe la



absorción de  $\text{Na}^+$ ; el otro representa la entrada difusional de  $\text{Na}^+$  a través de la vía paracelular (Frizzell y Turnheim, 1978).

#### f. Fármacos que actúan sobre la membrana

El antibiótico anfotericina B, usado extensamente en estudios de transporte epitelial, actúa inespecíficamente incrementando la permeabilidad de la membrana celular. Los efectos de la anfotericina B sobre lcc y conductancia ocurren en función de la concentración de anfotericina en la solución mucosa; con concentraciones crecientes ( $> 25 \mu\text{g/ml}$ ) la conductancia aumenta indefinidamente. En contraste, la lcc aumenta hasta llegar a una meseta y aumentos posteriores de anfotericina no producen un incremento adicional de lcc. La adición del antibiótico a la solución serosa no tiene efecto sobre la lcc y la conductancia (Frizzell y Turnheim, 1978).

Se ha encontrado que el dietiléter y el metoxifluorano, dos anestésicos inhalables, tienen una influencia bifásica sobre lcc y DP en piel de rana; estimulan ambos parámetros eléctricos y luego los disminuyen. Esta respuesta bifásica fue preservada después de la preestimulación de lcc con vasopresina o insulina (Szulc y Knapowski, 1975).

El para-cloromercuribencén sulfonato estimula la lcc en vejiga de sapo, sólo cuando el compuesto es aplicado en el lado mucoso; el efecto se debe a un incremento en el flujo de  $\text{Na}^+$  de la mucosa a la serosa (Spooner y Edelman, 1976).

## 2. Microorganismos infecciosos

Dentro de los mediadores de la secreción de electrólitos en el intestino se incluyen el sistema adenilato ciclasa-3',5'-AMP cíclico, el sistema guanilato ciclasa-3',5'-GMP cíclico, y el calcio (Field, 1979; Frizzell y Heintze, 1979). Aunque el sistema de adenilato ciclasa-AMPc fue el primer mediador identificado de la secreción de electrólitos, no se sabe como este sistema se involucra para causar la secreción intestinal in vivo. La secreción intestinal inducida por la toxina de cólera, las prostaglandinas y la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* parecen estar relacionadas causalmente con el incremento de actividad de adenilato ciclasa en la mucosa (Field, 1974); las explicaciones de otros mecanismos son menos claras.

La mayoría de los parásitos intestinales que tienen efecto sobre la secreción o absorción de iones están relacionadas con la producción de diarrea.

La toxina de cólera purificada añadida del lado mucoso de preparaciones de ileon de humano montadas en cámaras de Ussing causa un movimiento neto de  $\text{Na}^+$  de 0.6

$\pm 0.8 \mu\text{Eq/cm}^2\text{-h}$  y una secreción neta de Cl significativa, (flujo neto de Cl  $-2.9 \pm 0.9$ ), mientras que el íleon normal tiene un movimiento neto de  $\text{Na}^+$  de  $2.6 \mu\text{Eq/cm}^2\text{-h}$ . Este efecto es similar al obtenido cuando se agrega teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos) a la preparación, por lo que se sugiere que ambos agentes actúan sobre el mismo mecanismo de transferencia de iones (Al-Awqati et al., 1973).

El efecto de la enterotoxina termoestable de *E. coli* (ST) sobre la secreción alcalina y la DP transepitelial han sido reportados en segmentos denervados de yeyuno, íleon y colon proximal de rata. La ST causa un incremento en la secreción alcalina en yeyuno pero no en íleon o colon. El efecto de ST sobre el yeyuno puede ser debido a una estimulación de la secreción de bicarbonato y/o una inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Con respecto a DP, la ST causa un incremento de la DP colónica, mientras que solamente provoca una respuesta pequeña sobre el yeyuno, y no tiene efecto sobre DP del íleon. Los efectos de lidocaína sobre la DP y la secreción alcalina fueron similares al de hexametonio, disminuyendo los efectos de ST sobre la DP y causando una pequeña inhibición de la secreción alcalina por ST. Estas evidencias sugieren que la ST ejerce, por vía nerviosa, una profunda influencia sobre el mecanismo de transporte yeyunal responsable de los cambios en DP, mientras que la influencia sobre la secreción alcalina parece no ser mediada por los nervios de la vía entérica. Así, el punto de control de los nervios entericos sobre la función epitelial difiere para las diferentes funciones de transporte (Tantisira et al., 1990).

Las cepas enteroinvasoras de *E coli* (EIEC) son la causa de enfermedades diarreicas y disentería en niños. Sobrenadantes y lisados celulares de dos cepas de EIEC probadas en asas ileales de conejo, ambas estimularon una moderada acumulación de líquido sin daño al tejido; la actividad secretoria fue confirmada en cámaras de Ussing, donde ambas cepas bacterianas incrementaron significativamente la Icc sin alterar la conductancia del tejido (Fasano et al., 1990).

El envenenamiento por ciguatera es un síndrome clínico que consiste en una combinación de síntomas gastrointestinales y neurológicos que ocurren después de comer pescado que contiene la toxina. Para definir los mecanismos patofisiológicos del componente diarreico de esta enfermedad se ha examinado el efecto de preparaciones crudas o fraccionadas de la toxina sobre segmentos de íleon de conejo en el modelo de las cámaras de Ussing. Ambas preparaciones de la toxina causan un incremento notable de DP transepitelial e Icc. La actividad enterotóxica parece ser mediada por calcio. Se examinó la mucosa intestinal por microscopía de luz y no se encontró daño en las preparaciones usadas (Fasano, et al. 1991).

Se han encontrado cambios en el transporte de iones del intestino delgado en respuesta al nemátodo parásito *Trichinella spiralis*. El transporte neto de iones por yeyuno de ratas inmunizadas contra *T. spiralis* en preparaciones retadas con antígenos derivados del parásito medido en cámaras de Ussing, expresa rápidamente una elevación bifásica y una caída en la Icc. El reto antigénico del yeyuno sensibilizado causó la liberación de 5-hidroxitriptamina, histamina y prostaglandina E, (Castro et al., 1987), que se sabe afectan el transporte de sodio.

Existen otras situaciones patológicas que pueden tener efecto sobre el transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  en el intestino.

Se ha encontrado una dependencia del calcio en los cambios inducidos por serotonina en el transporte de electrólitos del ileon de conejo. En presencia de concentraciones estándar de calcio (1.2 mM) en el lado seroso, la serotonina aplicada del lado seroso causa un incremento transitorio de Icc y un decremento prolongado en el flujo de  $\text{Na}^+$  y Cl. La falta de calcio (más EGTA) del lado seroso pero no del lado mucoso inhibe el incremento de Icc ileal inducido por serotonina y bloquea completamente los efectos de la serotonina sobre el flujo neto de  $\text{Na}^+$  y Cl. Por esto se postula que la serotonina afecta el transporte intestinal de electrólitos por un mecanismo que depende del calcio del lado seroso pero no del mucoso e involucra un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática intestinal al calcio, y quizás un incremento en el calcio intracelular (Donowitz et al., 1980).

La vía de transporte de electrólitos en la mucosa colónica distal de pacientes con enfermedades no inflamatorias e inflamatorias (colitis ulcerativa, colitis de Crohn) del intestino grueso ha sido estudiada *in vitro* con técnicas electrofisiológicas. Los tejidos no inflamados mostraron un sustancial transporte electrogénico de  $\text{Na}^+$  sensible a amilorida. En contraste, los tejidos inflamados pero estructuralmente intactos, mostraron solo un modesto grado de transporte electrogénico de  $\text{Na}^+$ , incrementos en la conductancia total del tejido y en la conductancia de la membrana apical y un incremento del 100% en el contenido del ácido araquidónico de la fracción membranal de homogenados de mucosa. La conductancia total del tejido fue mas alta en tejido inflamado que en el no inflamado en presencia de gradientes transepiteliales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sugiriendo una ampliación del paso de iones y cationes por la mucosa en colitis aguda (Sandle et al., 1990).

### 3. E. histolytica

Se ha reportado actividad citotóxica y enterotóxica de la cepa HM1 de *E. histolytica* en preparaciones libres de células. La secreción ambiana de estas sustancias ha sido postulada como mecanismo que contribuye a los procesos de la enfermedad (Lushbaugh et al., 1979).

Con el objeto de estudiar el efecto citopático de las amibas sobre células epiteliales en cultivo a tiempos cortos, Orozco et al. (1982) han utilizado técnicas de microscopía electrónica (ME) que incluyeron el uso de marcadores macromoleculares y mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de los epitelios en cultivo en contacto con los trofozoítos vivos y con extractos amibianos citoplásmicos. Los registros electrofisiológicos de la RET detectaron daño en las monocapas celulares a los 2 min de la interacción de los trofozoítos con las células epiteliales. El daño fue progresivo a través del tiempo y máximo a los 60 min. Estos resultados y los obtenidos por ME, donde se observó el paso del trazador molecular, sugieren que la monocapa celular presenta daño funcional manifiesto por la apertura de las uniones herméticas.

McGowan y Donowitz (1988) han discutido el papel de los secretagogos en la patofisiología de la diarrea que ocurre en la infección por *E. histolytica*. Encontraron que los lisados de *E. histolytica* afectan el transporte electrolítico cuando son añadidos al lado seroso de ileon de conejo o colon de rata (McGowan et al., 1983). Los cambios producidos por los lisados fueron similares a los que ocurren por varias sustancias neurohumorales. Este mismo grupo encontró que los lisados amibianos contienen serotonina, neurotensina y sustancia P inmunoreactiva (McGowan y Donowitz, 1988). El efecto de los lisados sobre el transporte electrolítico fue parcialmente inhibido por anticuerpos anti-serotonina. Recientemente este grupo (McGowan et al., 1990) reportó que el efecto de los lisados sobre el transporte tiene dos componentes, uno calcio-dependiente y el otro calcio-independiente; además, muestran que los metabolitos del ácido araquidónico de la vía de ciclooxigenasa probablemente están involucrados en los cambios inducidos por *E. histolytica* en el transporte colónico, que no dependen de la entrada de calcio. Mostraron también que existe una estimulación de la síntesis de prostaglandinas E, en la mucosa colónica de rata por los lisados amibianos (que no contienen PGE<sub>2</sub>) y que el efecto de los lisados es parcialmente inhibido por PGE<sub>2</sub>, indometacina, peroxicana y mepacrina y que los lisados incrementan significativamente el contenido de AMPc colónico. Por lo anterior sugieren que las neurohormonas presentes en *E. histolytica* pueden actuar directamente sobre el tejido colónico para estimular la secreción intestinal, probablemente a través de un mecanismo calcio-dependiente bloqueable por verapamil, o indirectamente por la estimulación, generación

y liberación de PGE, del colon de rata mediante un mecanismo AMP-dependiente. Estos efectores parecen ser separados; la secreción dependiente de AMPc es el mecanismo predominante en este modelo de diarrea colónica amibiana (McGowan et al., 1990).

#### 4. Inmunofisiología

En 1982 Castro revisó la relación entre las células epiteliales y la *lamina propria*. Su tesis principal fue que las células de la *lamina propria* regulan la función de las células epiteliales y para el estudio de esta relación y de los elementos del tubo digestivo propuso el término de inmunofisiología.

Los estudios de las infecciones intestinales por nemátodos revelan que los elementos de la *lamina propria*, a través de sus capacidades inmunológicas contribuyen al control de la estructura y función epitelial. Las evidencias muestran que las células no epiteliales influyen directa, indirectamente o de ambas maneras la morfología de las vellosidades intestinales y la estructura, diferenciación, secreción y absorción epitelial (Castro, 1982).

El transporte neto de iones por yeyuno de ratas inmunizadas con *T. spiralis* en preparaciones retadas con antígenos derivados del parásito mostró rápidamente una elevación bifásica y luego una caída en la lcc. El incremento en la lcc fue disparado por anafilaxis en la mucosa. El reto antigénico del yeyuno sensibilizado causó la liberación de 5-hidroxitriptamina, histamina y PGE., sugiriendo que la 5-HT, la histamina y la PGE, mediante inducción por el antígeno cambian la lcc del epitelio yeyunal a través de una estimulación mediada directa y neuralmente (Castro et al., 1987).

La influencia de la reacción inmunológica sobre el transporte de electrolitos y líquidos es expresada dramáticamente después de la estimulación antigénica. En la triquinosis murina, la secreción de líquidos ocurre varios días después de la infección primaria, pero en una infección secundaria ocurre en minutos (Castro et al., 1979). *In vitro*, los cambios en el transporte de iones son detectables segundos después de la estimulación antigénica. La secreción neta de Cl es inducida por retos antigénicos en intestino aislado de ratas infectadas con *T. spiralis* (Russell y Castro, 1985).

Se ha reportado también que los parásitos causan cambios funcionales y anatómicos en las capas musculares de la pared intestinal. En el intestino delgado de ratas infectadas con *Nippostrongylus brasiliensis* se encontró un engrosamiento marcado de la capa muscular externa. El incremento en la masa muscular fue debido a hipertrofia de la capa muscular longitudinal. Observaciones análogas han sido reportadas en ratas o cuyos infectados con *T. spiralis*, ratas con *Moniliformis dubius*, caballos con

*Parascaris equorum* y cerdos con *Ascaris suum*. Las causas del incremento muscular en estas infecciones es desconocido pero pueden involucrar efectos físicos del parásito o mediadores químicos de la inflamación (Castro, 1989).

Observaciones sobre la regulación inmune de la función muscular implican a la actividad del sistema nervioso entérico en la misma vía por la cual los antígenos inducen respuestas eefectoras. Los plexus mesentericos de cuyos infectados con *T. spiralis* retados con antígenos de *T. spiralis* producen cambios en la DP y la resistencia en las neuronas (Palmer et al., 1988). La traducción de las señales antigénicas para provocar cambios neuronales presumiblemente implica una respuesta iniciada por células cebadas, sugiriendo que las neuronas entéricas del tejido intestinal sensibilizado responden fisiológicamente a la estimulación antigénica (Castro, 1989).

Castro (1989) propone que en estudios futuros de los parásitos que habitan en el tracto gastrointestinal, sería ventajosa o necesaria la perspectiva inmunofisiológica ("sociológica") para poder reconciliar fenómenos o eventos que no han podido ser explicados mediante las técnicas o los conceptos de las disciplinas tradicionales.

## F. Justificación y objetivos del trabajo

El principal obstáculo para el estudio y entendimiento de los mecanismos patogénicos y la inmunidad local en la amibiasis intestinal deriva de la falta de modelos experimentales agudos apropiados. Los modelos actuales producen lesiones intestinales que son analizadas varios días después de la inoculación intracecal de amibas, son muy laboriosos, y su reproducibilidad es baja.

Por lo anterior nos propusimos estandarizar y caracterizar un modelo que permita analizar el daño a la mucosa del intestino grueso durante la interacción inicial de trofozoítos de *E. histolytica* o de sus productos.

En este proyecto cubrimos las siguientes etapas:

1. Montaje de preparaciones de segmentos de intestino grueso de conejo (con todas sus capas) en cámaras de Ussing, para caracterizar el deterioro espontáneo de sus propiedades electrofisiológicas (DP, Icc y R).
2. Determinación y caracterización del efecto de lisados de trofozoítos de *E. histolytica* sobre la electrofisiología y la morfología de las preparaciones.
3. Determinación del posible efecto protector del suero anti-amibiano sobre los efectos causados por los lisados amibianos a las preparaciones.

## MATERIALES

### A. Aparatos y reactivos

#### 1. Procedencia

Usamos los siguientes materiales: cámara de Ussing, celdas de calomel, fijadores de voltaje (Sección de Bioelectrónica del Depto. de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV-IPN), puentes de agar (Bacto agar Difco), baño recirculante a 37°C (Haake, Berlín), material de disección, tanque con mezcla de oxígeno al 95%-bióxido de carbono al 5% (Aga de México, S.A.), almidón y ouabaina de Sigma Chemical Co. (St Louis MO, EE.UU.).

#### 2. Registro de las propiedades eléctricas

a. *Cámaras de Ussing.* Consisten de dos hemicámaras (izquierda y derecha) hechas de lámina de plástico acrílico ("Lucita") y compuestas de una camisa en forma de cubo de 5 cm de lado que tienen dos salidas de agua para mantener la temperatura deseada, en la parte interna del cubo se encuentra un cilindro con una abertura de 6 mm en uno de sus extremos, que al unir las dos hemicámaras las comunica. El cilindro (con capacidad para 2.5 ml) tiene una chimenea que atraviesa el cubo, y sirve para agregar medio a las hemicámaras. Cada cilindro tiene dos pequeñas aberturas en los extremos internos que permiten colocar los puentes de agar que comunican a las celdas de calomel. El epitelio se coloca entre las dos hemicámaras sobre las aberturas de 6 mm (Fig. 1).

b. *Celdas de calomel.* Están compuestas de un rectángulo de Lucita (6 X 8 X 2.5 cm) que contiene cuatro pozos verticales y paralelos entre sí (1.5 cm de diámetro y 5 cm de profundidad) a lo ancho. En la base de cada pozo hay un orificio atravesado por un alambre de plata (calibre 20) unido en su parte externa a un tornillo, en donde se conectan los cables que van a un multifásico con las salidas para registrar  $\mu A$  y mV en el fijador de voltaje (Fig. 1).

c. *Fijadores de voltaje.* El fijador de voltaje modelo "Farma 9726-2" (especialmente rediseñado para este trabajo) fue diseñado para el registro de propiedades eléctricas (DP e Icc) de epitelios como los de la piel, vejiga urinaria, vesícula biliar, intestino, túbulo renal, etc. La Fig. 2 corresponde al diagrama funcional simplificado del instrumento, que consta de 4 secciones:

i) Un circuito milivoltímetro diferencial (A), flotante respecto a tierra, de alta resistencia de entrada, destinado a medir a través de electrodos impolarizables externos



(E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>) la diferencia de potencial entre las caras del epitelio en estudio. El dato correspondiente aparece tanto en el medidor digital que hay en la carátula del instrumento (a), como en las salidas para registrador gráfico (a<sub>1</sub>).

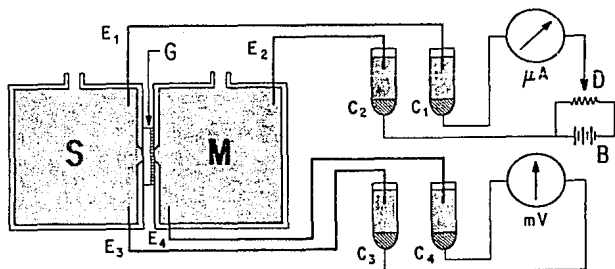


Fig. 1. Diagrama de una preparación de la pared del colon de conejo montada en la cámara de Ussing. B, batería; C, celdas de calomel; D, divisor de potencial; E, electrodos; G, fragmento de intestino con la mucosa orientada hacia la hemisférica derecha (M) y la serosa hacia la hemisférica izquierda (S).

ii) Un circuito fijador de voltaje propiamente dicho (B). Este compara el voltaje del epitelio con un voltaje interno de referencia, ajustable. La diferencia entre estos voltajes se amplifica más de 20,000 veces y, si se desea fijar el voltaje del epitelio, se aplica con signo contrario a través de los electrodos externos E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. Esto hace que a través del epitelio circule la corriente necesaria para obligarlo a manifestar entre sus caras un potencial prácticamente igual al de referencia. Cuando se elige que este valga 0 voltios, el epitelio queda en condiciones de corto circuito. La llave L-L, al abrirse, cancela la acción de la sección fijadora, y permite al epitelio manifestar su diferencia de potencial espontánea.

iii) Un circuito medidor de la corriente inyectada al epitelio (C). Su valor aparece tanto en el medidor digital (c) colocado en la carátula del instrumento, como en las salidas (c<sub>1</sub>) para registrador gráfico.

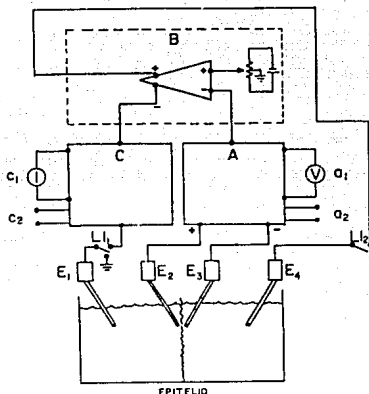


Fig. 2. Diagrama funcional simplificado del fijador de voltaje modelo "Farma 9726-2"

## B. Soluciones

### 1. Soluciones madre

- a. *NaCl* 2.5 M. Se pesaron 14.61 g de NaCl, que se disolvieron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
- b. *NaHCO<sub>3</sub>* 0.5 M. Se pesaron 46.5 g de NaHCO<sub>3</sub>, que se disolvieron con agitación y se aforaron a 500 ml con agua destilada caliente.
- c. *KCl* 3 M. Se pesaron 22.36 g de KCl, que se disolvieron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
- d. *NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 1 M. Se pesaron 13.78 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, que se disolvieron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
- e. *MgSO<sub>4</sub>* 1 M. Se pesaron 24.64 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, que se disolvieron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

*f. CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M.* Se pesaron 1.47 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, que se disolvieron y se aforaron a 100 ml con agua destilada.

### **2. Electroodos, puentes de agar y celdas de calomel**

*a. Solución saturada de KCl.* Se llevó a ebullición una solución de 200 ml de KCl al 40%, luego se colocó en un agitador magnético y se le agregaron 2 g de HgCl<sub>2</sub> y 2 gotas de mercurio metálico con una pipeta Pasteur. La mezcla se agitó con un agitador magnético 30-45 min y finalmente se dejó reposar a temperatura ambiente por lo menos un día.

*b. Pasta para los electrodos.* Se mezclaron en un mortero 6 g de KCl y 6 g de HgCl<sub>2</sub>, a los que se adicionaron 3 g de Hg metálico. Se mezcló bien hasta obtener un color gris uniforme. Finalmente se agregaron 15 ml de la solución saturada de KCl. La pasta se usó después de por lo menos un día de reposo.

*c. Puentes de agar.* A 100 ml de KCl 3 M (casi a ebullición) se añadieron 3 g de agar; la mezcla se calentó en el horno de microondas hasta fundir el agar. Mientras el agar estaba fundido, se llenaron con una jeringa y aguja segmentos de tubo de polietileno de 3/32" de diámetro interno y 30 cm de largo. Posteriormente se dejó solidificar el agar y los "puentes" (i.e. los tubos llenos de agar) fueron colocados en un frasco ámbar de 100 ml con tapón de rosca que contenía KCl 3 M, y se almacenaron a 4°C.

*e. Preparación de las celdas de calomel.* Se colocaron primero volúmenes de 1.5 ml de mercurio metálico en cada una de las celdas y luego se agregó 1 ml de pasta para electrodos en cada celda hasta cubrir el mercurio. Posteriormente, sin remover la pasta se añadieron a cada celda 3 ml de solución saturada de KCl. Se usó después de por lo menos 24 h de reposo.

### **3. Solución de Ringer y medio TP**

a) La solución de Ringer se preparó de acuerdo a la Tabla 1

b) El medio TP de cultivo se preparó de acuerdo a la Tabla 2

### **4. Soluciones para microscopía**

*a. PBS, pH 7.4.* Se pesaron 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, que se disolvieron y aforaron a 1000 ml con agua destilada, se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N.

Tabla 1. Preparación de la solución de Ringer

| Adiciones                               | Para<br>500 ml | Concn<br>(mM) |
|---|----------------|---------------|
| 1) NaCl 2 M                             | 27.50 ml       | 110.0         |
| 2) NaHCO <sub>3</sub> 0.5 M             | 25.00 ml       | 25.0          |
| 3) KCl 3 M                              | 0.83 ml        | 5.0           |
| 4) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M | 0.60 ml        | 1.2           |
| 5) MgSO <sub>4</sub> 1 M                | 0.60 ml        | 1.2           |
| 6) Glucosa                              | 0.63 g         | 7.0           |
| 7) Acetato de sodio anh                 | 0.41 g         | 10.0          |
| 8) Ajustar a pH 7.4                     |                |               |
| 9) CaCl <sub>2</sub> 0.1 M*             | 5.00 ml        | 1.0           |

\*Añadir lentamente para evitar su precipitación

Tabla 2. Preparación del medio basal TP

| Pesar                                | Para:   |        |
|--------------------------------------|---------|--------|
|                                      | 1000 ml | 500 ml |
| 1) Peptona de caseína                | 10.0 g  | 5.0 g  |
| 2) Panmede                           | 20.0 g  | 10.0 g |
| 3) Glucosa                           | 5.0 g   | 2.5 g  |
| 4) L-cisteína                        | 1.0 g   | 0.5 g  |
| 5) Ac. ascórbico                     | 0.2 g   | 0.1 g  |
| 6) NaCl                              | 5.0 g   | 2.5 g  |
| 7) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 0.6 g   | 0.3 g  |
| 8) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 1.0 g   | 0.5 g  |
| 9) Ajustar a pH 7.0                  |         |        |
| 10) Esterilizar 15 min a 20 lb/pulg* |         |        |

*b. Formaldehído al 4%.* Se añadieron 10 ml de Formaldehído al 40% a 90 ml de agua destilada.

*c. Cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.4.* Se pesaron 21.4 g de cacodilato de sodio anhidro, que se disolvieron en 125 ml de agua destilada y se le agregó HCl 1 N hasta ajustar el pH a 7.4. Se aforó a 500 ml con agua destilada.

*d. Glutaraldehído al 2.5%.* Se añadieron 10 ml de glutaraldehído al 8% a 22 ml de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

*e. Mezcla de lavado.* Se pesaron 10 g de sacarosa, que disolvieron y se aforaron a 10 ml con cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

*f. OsO<sub>4</sub> al 1%.* Se prepara una solución madre al 2% disolviendo una cápsula de 1 g en 50 ml de agua destilada e inmediatamente antes de su uso se diluye con un volumen de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.4, por tanto queda una solución de OsO<sub>4</sub> al 1% en cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

#### **5. Mezclas con actividad biológica**

*a. Amilorida 10' M.* Se pesaron 2.66 mg de amilorida y se disolvieron en 1 ml de agua destilada.

*b. Ouabaína 10' M.* Se pesaron 7.28 mg de ouabaína y se disolvieron en 1 ml de agua destilada.

*c. Lisados amibianos.* Se colocaron 25,000, 50,000 o 100,000 trofozoitos de *Entamoeba (histolytica* o *invadens*) en 0.5 ml de medio TP y se mantuvieron en nitrógeno líquido. Lisabamos a los trofozoitos por descongelación brusca con Ringer o medio TP a 37°C al momento de su uso.

*d. Suero humano al 10%.* Se añadieron 250  $\mu$ l de suero humano (normal o inmune) en las hemícámaras de Ussing que contenían 2.5 ml de solución de Ringer.

## METODOS

### A. Preparación de los experimentos

Antes de iniciar cada experimento encendemos el fijador de corriente y el baño Haäke (ajustado a 37°C). Revisamos las celdas de calomel para asegurarnos que no se han mezclado las capas de mercurio con la pasta y que la solución saturada de KCl se encuentra en el nivel adecuado (aproximadamente 3 ml). Conectamos los electrodos de plata de las celdas al fijador de corriente, mediante los cables correspondientes. Verificamos el voltaje del fijador de corriente con el epitelio artificial y lo ajustamos a cero en corto circuito. Nos aseguramos que los puentes de agar no contengan burbujas de aire.

### B. Obtención del colon

Anestesiarnos un conejo Nueva Zelanda (1.5 a 2 Kg) macho, con 30 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja, abrimos la pared abdominal, localizamos el ciego, cortamos dos o tres segmentos adyacentes de colon de aproximadamente 3 cm de largo y los colocamos inmediatamente en un vaso de 150 ml con Ringer enriado con hielo y burbujeadado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%). Tomamos el segmento para montar en la cámara de Ussing y lo fijamos con agujas hipodérmicas sobre la superficie de una capa de parafina dentro de una caja de Petri (el resto de los segmentos los mantenemos en Ringer frío con burbujeo, para ser usados en caso que se requiera montar otra preparación). Cortamos el segmento de colon seleccionado a lo largo de la línea de inserción al peritoneo cuidando de no dañar la mucosa, y lo mantenemos (con la cara mucosa hacia arriba) extendido y fijo con agujas sobre la parafina. Con una pipeta Pasteur lavamos el contenido focal del segmento abierto y extendido con solución de Ringer burbujeadada y mantenemos el segmento en la misma solución.

### C. Montaje en la cámara de Ussing

Colocamos grasa de silicón sobre las caras internas de ambas hemicámaras (mantenidas a 37°C con el baño Haäke), luego colocamos la cara externa de la hemicámara izquierda sobre la mesa y sobre su cara interna (cubriendo la abertura de 6 mm de diámetro) colocamos el segmento de colon, cuidando que la serosa quede hacia abajo y la mucosa hacia arriba. Este paso debe efectuarse lo más rápido que sea

posible para no privar al tejido de oxígeno. Inmediatamente después colocamos la cara interna de la hemicámara derecha (previamente engrasada) sobre el epitelio extendido. Fijamos las dos hemicámaras y montamos la cámara completa en su soporte (Fig. 1). Finalmente añadimos Ringer burbujeado y a 37°C a las dos hemicámaras, conectamos la tubería para burbujear la solución dentro de ambas hemicámaras, conectamos los puentes de agar a los compartimentos de las hemicámaras y a las celdas de calomel (Fig. 2). Registramos la DP e lcc cada 5 min.

#### D. Tratamiento de las preparaciones

**1. Amilorida.** Una vez montada la preparación, registramos DP e lcc durante 10 min para que se estabilizara, e inmediatamente después agregamos 25  $\mu$ l de amilorida 10' M en la hemicámara mucosa que contenía 2.5 ml de Ringer burbujeado, por lo que la concentración final de amilorida era de 10' M. La preparación se mantuvo con burbujeo en ambas hemicámaras durante todo el experimento.

**2. Ouabaína.** Una vez montada la preparación, registramos DP e lcc durante 10 min para que se estabilizara, e inmediatamente después agregamos 25  $\mu$ l de ouabaína 10' M en cada hemicámara (serosa y mucosa), por lo que la concentración de ouabaína en ambas hemicámaras era de 10' M. La preparación se mantuvo con burbujeo en ambas hemicámaras durante todo el experimento.

#### 3. Lisados amibianos

**a. No preincubados.** Los lisados fueron obtenidos mediante un ciclo de congelación-descongelación de muestras con 25,000, 50,000 o 100,000 trofozoítos de fase log, que habían sido suspendidos en 0.5 ml de medio TP y mantenidas en nitrógeno líquido.

Una vez montada la preparación, registramos DP e lcc durante 10 min para que se estabilizara, e inmediatamente después agregamos 0.5 ml de lisados que fueron llevados a temperatura ambiente y mezclados con 2 ml de medio TP o Ringer a 37°C; la mezcla fue añadida inmediatamente a la hemicámara mucosa reemplazando la solución de Ringer, en tanto que en la hemicámara serosa colocamos medio TP o Ringer a 37°C burbujeado. La preparación se mantuvo burbujeada solo del lado seroso después de agregar los lisados.

**b. Preincubados con suero.** Los lisados de 25,000 trofozoítos obtenidos por congelación-descongelación de muestras de 0.5 ml fueron mezclados con 250  $\mu$ l de suero humano

normal o inmune, incubados por 1 min e inmediatamente después agregados a la hemicámara mucosa, por lo que la concentración final del suero era al 10% en Ringer; en la hemicámara serosa colocamos Ringer a 37°C burbujeados. La preparación se mantuvo burbujeadas solo del lado seroso después de agregar la mezcla.

#### **E. Fijación y tinción para microscopía óptica**

Una vez terminado el experimento desmontamos las preparaciones de la cámara de Ussing y la colocamos en la caja de Petri, evitando dañar la mucosa. Posteriormente la preparación se extendió con agujas hipodérmicas en la caja de Petri con la mucosa hacia arriba, se fijó con formol al 10% en PBS, pH 7.4. Se observó al microscopio estereoscópico para seleccionar el área (comprendida entre los 6 mm de diámetro cuyas propiedades eléctricas fueron registradas) y se fraccionó en porciones de 2 X 6 mm. Terminada la fijación los fragmentos fueron lavados con agua corriente, después se sometieron a deshidratación con una serie gradual ascendente de etanol, al 70%, 80% y 96% por 2 h cada uno y cuatro cambios de etanol absoluto de 1 h cada uno. Después de la deshidratación se llevó a cabo la aclaración del material con dos cambios de 1 h en xilol. La infiltración se efectuó en parafina a 60°C con dos cambios, uno a los 60 min y otro a los 90 min. Finalmente los fragmentos fueron pasados a moldes metálicos e incluidos en parafina pura a temperatura ambiente.

Los cortes, de 5  $\mu$ m de espesor, fueron obtenidos con un microtomo para inclusiones en parafina y cuchilla de acero. Los cortes obtenidos fueron depositados en la superficie de un baño a 60°C para extenderlos. Posteriormente fueron recogidos con portaobjetos y depositados en una platina caliente. Una vez secos se procedió a teñirlos con hematoxilina y eosina. Antes de la coloración se quitó el exceso de parafina por inmersión en xilol por 30 min.

#### **F. Fijación y tinción para microscopía electrónica**

Desmontamos las preparaciones de la cámara de Ussing y las colocamos en una caja de Petri, evitando dañar la mucosa. Posteriormente cada preparación se extendió con agujas hipodérmicas en la caja de Petri con la mucosa hacia arriba, se fijó con glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, durante 2 h a temperatura ambiente y se fraccionó en porciones de 1 mm de espesor que se fijaron durante dos horas más. Posteriormente las muestras fueron lavadas con tres cambios de 10 min en la mezcla de lavado (cacodilato de sodio 0.1 M-10% de sacarosa).



La post-fijación se realizó con  $\text{OsO}_4$  al 1% en cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 durante 2 h a temperatura ambiente. Luego se lavó con la mezcla de lavado durante 10 min. Se deshidrató con diferentes concentraciones de alcohol etílico (70%, 80%, 90%) durante 10 min y en etanol absoluto tres veces durante 10 min. Inmediatamente después se hicieron tres cambios de óxido de propileno de 10 min.

La infiltración se hizo en una mezcla 1:1 de Epón 812-óxido de propileno. Los viales se dejaron reposar semidestapados en una caja con sílica-gel durante toda la noche, a temperatura ambiente. Finalmente los fragmentos fueron colocados en moldes planos e incluidos en Epon 812 y se polimerizaron en una estufa a 60°C por 24 h.

Se obtuvieron cortes semifinos y finos en un microtomo Sorvall con cuchillas de vidrio y diamante respectivamente. Los cortes semifinos, de 1  $\mu\text{m}$  de espesor, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico. Los cortes finos de 60 a 90 nm fueron recogidos en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo al 5% por 20 min y citrato de plomo por 45 seg a temperatura ambiente y observados con el microscopio electrónico Zeiss EM-10 del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV.

## RESULTADOS

### A. Propiedades eléctricas de las preparaciones de colon

#### 1. Caída espontánea

Analizamos primero la cinética de la caída espontánea de DP, Icc y RE en preparaciones de colon de conejo con todas sus capas (desde la mucosa hasta la serosa), montadas en la cámara de Ussing y mantenidas con solución de Ringer burbujeadada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en ambas hemicámaras.

El valor inicial promedio de DP fue aproximadamente 5 mV, se mantuvo estable por unos 30 min y luego cayó hasta valores nulos (0 mV) en 120 min con una velocidad relativa del 56%/h (Fig. 3).

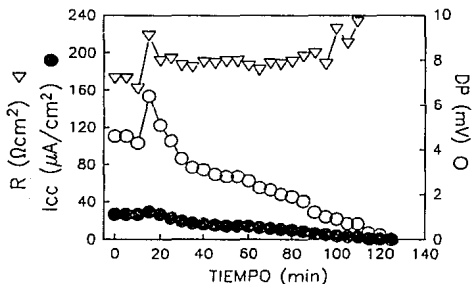


Fig. 3. Caída espontánea típica de los valores absolutos DP, Icc y R de preparaciones de colon mantenidas en Ringer burbujeadada en ambas hemicámaras con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Las preparaciones de colon de conejo fueron montadas en cámaras de Ussing, ambas hemicámaras contenían solución de Ringer burbujeadada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Los valores absolutos de DP e Icc fueron registrados cada 5 min. Los valores de resistencia fueron calculados al dividir cada valor de DP entre su respectivo valor de Icc.

Los valores iniciales promedio de Icc fueron de 30  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , se mantuvieron unos 35 min y luego cayeron hasta valores nulos (0  $\mu\text{A}$ ) en 125 min con una velocidad relativa similar a la de la caída de los valores de DP (Fig. 3). La RE se mantuvo casi invariable con un valor aproximado de 185  $\Omega\text{cm}^2$ , sin embargo cuando los valores de DP e Icc se

aproximan a valores nulos la RE tiende a aumentar. Los valores absolutos de DP,  $I_{cc}$  y RE fueron registrados cada 5 min.

Concluimos que las preparaciones completas de colon de conejo mantienen sus propiedades eléctricas por un tiempo razonable que nos permite realizar experimentos para valorar el efecto de agentes que dañen su integridad y funcionamiento.

## 2. Efecto de amilorida y ouabaina

Para probar si las preparaciones eran funcionales usamos bloqueadores conocidos del transporte de sodio (Frizzell et al. 1976). Cuando agregamos amilorida en el lado mucoso, para bloquear el intercambiador de sodio-protones, encontramos que la amilorida causa un decremento gradual en los valores de DP (Fig. 4); los valores de  $I_{cc}$  también tuvieron un decremento, ambos valores cayeron a valores nulos en 100 min, mientras que los valores de RE se mantuvieron entre 120 y 90  $\Omega\text{cm}^2$  (Fig. 4).

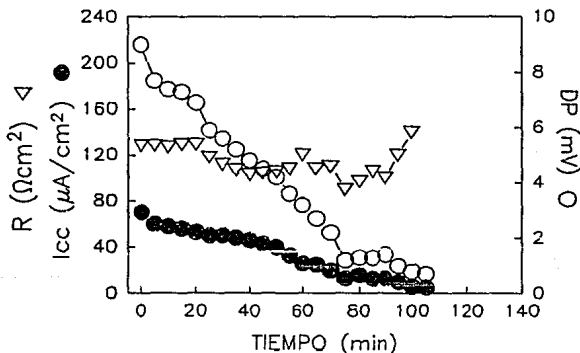


Fig. 4. Efecto típico de la amilorida sobre los valores absolutos de DP,  $I_{cc}$  y R de preparaciones mantenidas en Ringer burbujead. Durante los primeros 5 min después de montar las preparaciones en la cámara de Ussing, ambas hemis Cámaras contenían solución de Ringer burbujead con  $O_2/CO_2$ ; al final de este período, agregamos amilorida  $10^{-6}$  M en la hemis Cámaras mucosa y mantuvimos el burbujeo en ambas hemis Cámaras.

Cuando agregamos ouabaína en el lado seroso y mucoso de la preparación, para bloquear la ATPasa de sodio-potasio, encontramos un decremento inmediato en los valores de DP e Icc que llegaron a valores nulos en 65 min; los valores de RE parecieron no ser afectados, ya que se mantuvieron entre 80 y 60 ncm<sup>2</sup> (Fig.5).

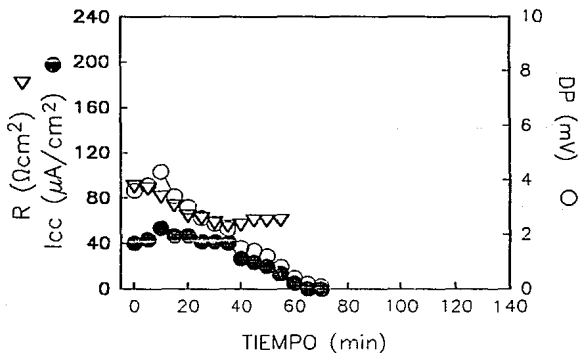


Fig. 5. Efecto típico de la ouabaína sobre los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en Ringer burbujeado. Durante los primeros 5 min después de montar las preparaciones en la cámara de Ussing, ambas hemicámaras contenían solución de Ringer burbujeada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>; al final de este período, agregamos ouabaína 10<sup>-6</sup> M en ambas hemicámaras y mantuvimos el burbujeo en ambas hemicámaras.

Por lo anterior concluimos que las preparaciones eran funcionales, ya que el bloqueo del transporte de sodio con amilorida causó un decremento en Icc y DP. Con la ouabaína, colocada en ambos lados de la cámara hubo un decremento inmediato en DP, Icc. Los valores de RE no fueron afectados por ninguno de estos bloqueadores del transporte de sodio. El bloqueo más rápido con ouabaína sugiere que en estas preparaciones parece tener más importancia el transporte de sodio mediante la ATPasa de sodio-potasio.

### 3. Efecto del medio TP

#### a. Con burbujeo

Como estábamos interesados en probar el efecto de lisados amibianos y amibas enteras sobre la DP, lcc y RE pero sabíamos (i) que la integridad y viabilidad de las amibas se pierden rápidamente en medio salino pero son mantenidas en medio de cultivo (Cano-Mancera y López-Revilla, 1989) y (ii) que las amibas son dañadas por oxígeno (Band y Cirrito, 1979), por lo que decidimos probar cual era el efecto del medio TP de cultivo burbujeado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, sólo del lado seroso (donde no íbamos a colocar las amibas). Los valores de DP e lcc se mantuvieron estables aproximadamente 30 min y posteriormente decayeron hasta valores nulos en 140 min con una velocidad del 68%/h, mientras que la RE se mantuvo hasta los 120 min (Fig. 6).

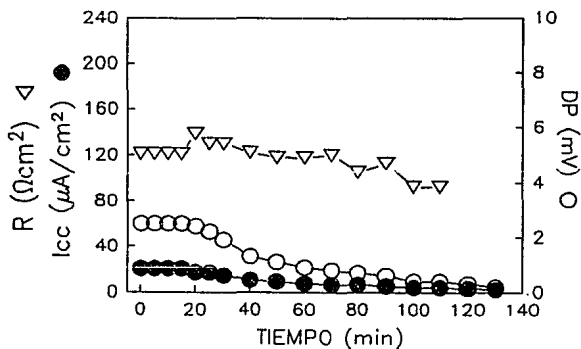


Fig. 6. Caída espontánea típica de los valores absolutos de DP, lcc y R de preparaciones mantenidas en medio basal TP burbujeado del lado seroso. Durante los primeros 5 min, ambas hemisféricas contenían solución de Ringer burbujeada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>; al cabo de este periodo, la solución de Ringer fue reemplazada por medio de cultivo TP y el burbujeo continuó solamente en la hemisférica serosa. Los valores absolutos de DP e lcc fueron registrados cada 5 min.

### b. Sin burbujeo

Cuando cambiamos la solución de Ringer a medio TP sin burbujear después de 5 min de haber montado el intestino en la cámara de Ussing, encontramos un decremento inmediato en los valores de DP e Icc (Fig. 7).

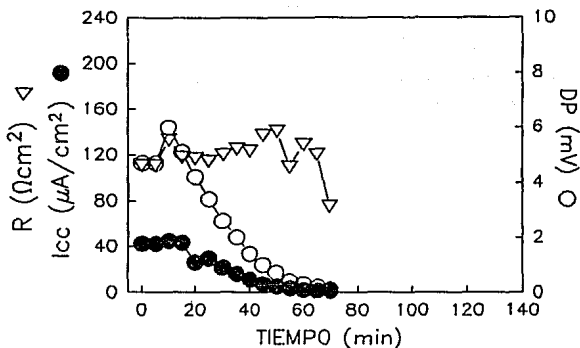


Fig. 7. Efecto típico de la hipoxia sobre el curso temporal de los valores absolutos de DP, Icc y R de preparaciones mantenidas en medio basal TP. Durante los primeros 5 min, ambas hemicámaras contenían solución de Ringer burbujeadada con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>; al final de este periodo, la solución de Ringer fue reemplazada por medio de cultivo TP sin oxígeno. Los valores absolutos de DP e Icc fueron registrados cada 5 min.

Al comparar los valores relativos de ambos tratamientos encontramos diferencias significativas, ya que en medio TP las preparaciones mantienen menos tiempo sus propiedades eléctricas que en Ringer y la falta de burbujeo (hipoxia) provoca una caída inmediata de las propiedades eléctricas (Fig. 8). Sin embargo, al comparar los valores relativos de la RE encontramos que en Ringer y en medio TP con burbujeo la RE se

mantuvo, mientras que en medio TP sin burbujeo (preparaciones hipóxicas) la RE decreció con el

tiempo (Fig. 9). Estos datos indicaron que para hacer los experimentos de efecto de lisados amibianos podíamos usar medio basal TP burbujeado solamente en el lado de la serosa.

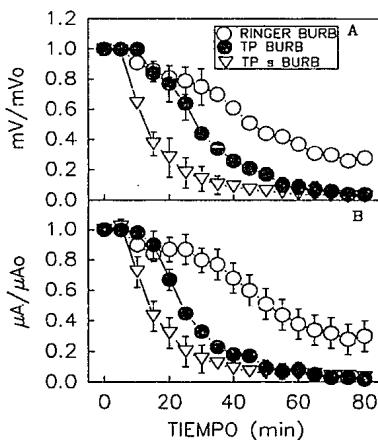


Fig. 8. Valores normalizados de DP e ICC de preparaciones mantenidas en Ringer burbujeado, o en medio TP, con o sin burbujeo. Durante los primeros 5 min, las hemicámaras contenían solución de Ringer burbujeada; al final de este período, la solución de Ringer fue reemplazada por cada uno de los medios de mantenimiento. Los valores relativos de cada punto fueron obtenidos al dividir el valor de DP o ICC de cada tiempo entre el valor inicial correspondiente. (A) Efecto de los medios de mantenimientos sobre los valores de DP de las preparaciones de colon ( $n = 5$ ). (B) Efecto de los medios de mantenimientos sobre los valores de ICC de las preparaciones ( $n = 5$ ).

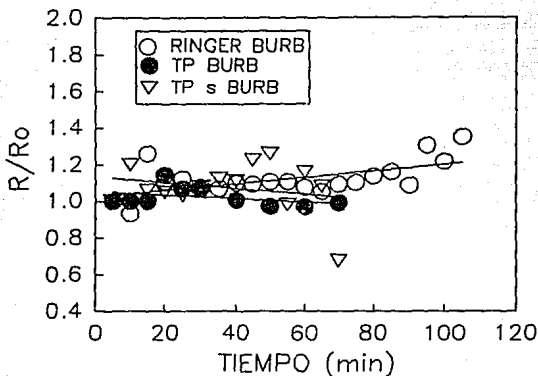


Fig. 9. Valores normalizados de la resistencia eléctrica transmural en preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo y TP con o sin burbujeo ( $n = 5$ ). La resistencia fue obtenida al dividir la DP en voltios entre la Icc en amperios/cm<sup>2</sup>. Mismas preparaciones de la fig. 8.

## B. Aspecto microscópico de los segmentos de colon

### 1. En Ringer

#### a. No montadas

Al observar preparaciones no montadas en la cámara de Ussing, del colon de conejo cortado longitudinalmente por su borde de inserción al peritoneo y mantenido en una caja de Petri con solución de Ringer burbujeadada, pudimos observar claramente las capas que conforman el intestino (Fig. 10A). De arriba hacia abajo vemos la luz intestinal y la capa epitelial de la mucosa que tiene un aspecto normal. En seguida



identificamos la membrana basal, a la cual se encuentra unidas las células epiteliales. Por debajo de la membrana basal observamos la *lamina propria* e identificamos las aberturas de las criptas de Lieberkühn, distribuidas regularmente con una longitud uniforme. En las células de la superficie epitelial observamos claramente los núcleos y en ocasiones apreciamos los límites celulares.

Las criptas de Lieberkühn, invaginaciones de la mucosa dispuestas perpendicularmente a la superficie luminal, estaban incluidas en la *lamina propria* y casi establecían contacto con la *muscularis mucosae*. La capa muscular de la mucosa, la submucosa y la serosa también fueron observadas con aspecto normal.

#### **b. montados**

Fragmentos de colon adyacentes, fueron montados en la cámara de Ussing, mantenidos con solución de Ringer burbujeado por 2 h en ambas hemicámaras y en ellos registramos sus propiedades eléctricas (ver Fig. 3). Los desmontamos, los fijamos con formol al 10%, los incluimos en parafina y los teñimos con hematoxilina-eosina. Bajo estas condiciones la preparación conserva su integridad desde la capa epitelial hasta la serosa (Fig. 10B).

En el registro electrofisiológico de esta misma preparación (ver Fig. 3) se observa la cinética de la caída espontánea de DP e Icc en preparaciones montadas en cámaras de Ussing. Se observa que el intestino mantiene su integridad eléctrica durante 35 min y posteriormente cayó hasta valores nulos, mostrando que existe una correlación entre el estado electrofisiológico del intestino y su morfología.

## **2. En medio TP y montados**

#### **a. Con burbujeo**

Los segmentos de colon montados en la cámara de Ussing y mantenidos en medio basal TP burbujeado en el lado de la serosa por 2 h, observamos el tejido en buen estado similar al tejido control (Fig. 11). Por tanto, la morfología de la preparación parece no ser afectada al ser montada y mantenida con medio TP burbujeado del lado de la serosa, lo cual correlaciona con el mantenimiento de su registro electrofisiológico (ver Fig. 5), en el que como vimos anteriormente la preparación estuvo montado 2 h y empezó a perder sus propiedades eléctricas a los 30 min.

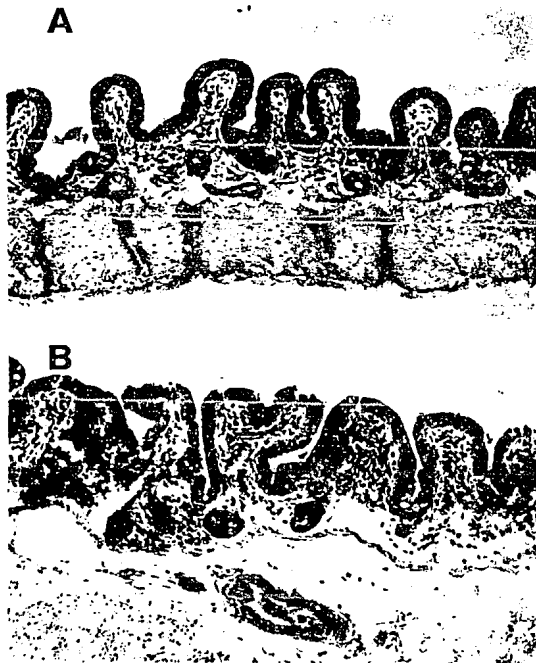


Fig. 10. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo. (A) Al momento de ser montada en la cámara de Ussing. (B) Después de 120 min de haber sido montada. Ambas preparaciones tienen apariencia normal.

*b. Sin burbujeo*

Sin embargo, cuando el segmento fue montado en la cámara de Ussing y mantenido en medio basal TP sin burbujeo por 70 min, observamos un aumento en el infiltrado celular de la *lamina propria*, mayor número de sitios de descamación en las zonas interglandulares, y una tendencia de la capa epitelial a separarse de la membrana basal asociada a la proliferación de vacuolas "translúcidas" en la membrana basal por debajo de las células epiteliales (Fig 12).

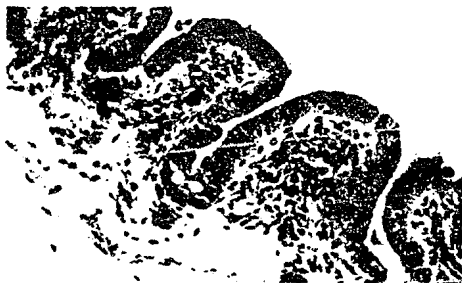


Fig. 11. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en medio TP con burbujeo. Después de 120 min de haber sido montada en la cámara, las preparaciones no son afectadas por el medio TP y su apariencia es normal.

El registro electrofisiológico de esta preparación muestra que el daño morfológico correlacionó con la caída de las propiedades eléctricas (ver Fig. 7).

### C. Efecto de lisados amibianos

#### 1. Sobre preparaciones en medio TP

##### a. Propiedades eléctricas

Sin embargo, cuando el segmento fue montado en la cámara de Ussing y mantenido en medio basal TP sin burbujeo por 70 min, observamos un aumento en el infiltrado celular de la *lamina propria*, mayor número de sitios de descamación en las zonas interglandulares, y una tendencia de la capa epitelial a separarse de la membrana basal asociada a la proliferación de vacuolas "translúcidas" en la membrana basal por debajo de las células epiteliales (Fig 12).

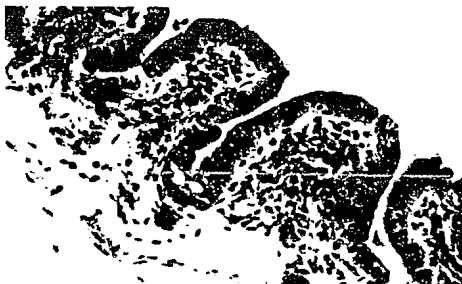


Fig. 11. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en medio TP con burbujeo. Después de 120 min de haber sido montada en la cámara, las preparaciones no son afectadas por el medio TP y su apariencia es normal.

El registro electrofisiológico de esta preparación muestra que el daño morfológico correlacionó con la caída de las propiedades eléctricas (ver Fig. 7).

### C. Efecto de lisados amibianos

#### 1. Sobre preparaciones en medio TP

##### a. Propiedades eléctricas

Los lisados fueron obtenidos mediante descongelación brusca de muestras con 50,000 amibas de fase log que habían sido suspendidas en 0.5 ml de medio TP y mantenidas en nitrógeno líquido.



Fig. 12. Efecto de la hipoxia sobre el aspecto microscópico de preparaciones mantenida en medio TP durante 70 min. El daño caracterizado por la formación de vacuolas y la separación de las capa epitelial de la lamina propia son señaladas con flechas.

Cada muestra de 0.5 ml del lisado descongelado fue llevada a temperatura ambiente y mezclada con 2 ml de medio TP a 37°C; la mezcla fue añadida inmediatamente a la hemicámara mucosa reemplazando la solución de Ringer, en tanto que en la hemicámara serosa colocamos medio TP a 37°C burbujeado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

Los lisados de *E. histolytica* HM1 causaron una caída inmediata y simultánea de DP, Icc y RE. Los valores de las propiedades eléctricas eran prácticamente nulos a los 105 min de la adición de los lisados y la velocidad relativa de caída fue del 75%/h (Fig. 13).

Sin embargo, las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoitos de *E. invadens* PZ (cepa virulenta para reptiles) no tuvieron efecto significativo y las preparaciones tratadas de este modo se comportaron como las no tratadas (Fig. 14).

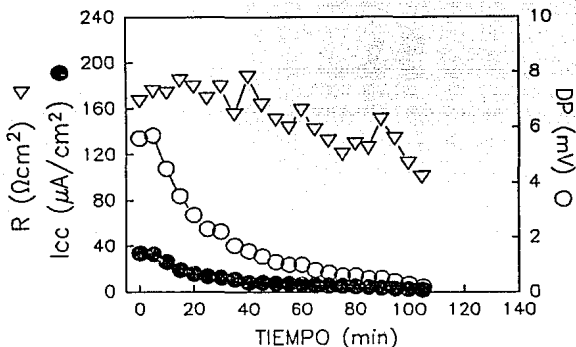


Fig. 13. Efecto típico de 50,000 trofozoitos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre los valores absolutos de DP, Icc y R en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo. Durante los primeros 5 min, ambas hemisféricas contenían solución de Ringer burbujeada; al cabo de este periodo la solución de Ringer fue reemplazada por medio TP/burbujeo en la hemisférica serosa y en la hemisférica mucosa por 50,000 trofozoitos suspendidos en 2.5 ml de medio TP/sin burbujeo. Los valores absolutos de DP e Icc fueron registrados cada 5 min.

Cuando comparamos los valores de DP e Icc de ambos tratamientos (Fig. 15) encontramos que sólo los lisados de *E. histolytica* HM1 causaron una caída inmediata de dichos valores. Al comparar los valores de la RE en las diferentes preparaciones, encontramos que las tratadas con *E. invadens* tuvieron un comportamiento similar a las mantenidas en medio TP con burbujeo ya que en todos los casos la resistencia fue casi constante, con pendientes cercanas a cero (- 0.0009 ncm/min). En cambio, la RE de las preparaciones tratadas con lisados amibianos cayó linealmente con el tiempo, con una pendiente de - 0.0040 ncm/min (Fig. 16).

Al comparar los valores relativos de DP, Icc y RE de las preparaciones de intestino encontramos diferencias claras en las diversas condiciones empleadas (Tabla 3). Las preparaciones mantuvieron sus valores iniciales por más tiempo (35 min) cuando la solución de Ringer era burbujeada en ambas hemisféricas. La duración de los periodos en los que los valores se mantuvieron fueron, en orden decreciente: (i) medio TP

burbujeado del lado seroso o tratado con lisados de *E. invadens* (20 min), (ii) medio TP sin burbujeo (15 min) y (iii) medio TP con lisados ambientales (5 min). Las velocidades relativas de caída de la DP en las diferentes condiciones fueron (i) la más lenta (-0.004/min) con solución de Ringer burbujeadada, y (ii) las más rápidas con medio TP sin burbujear (-0.033/min) y tratadas con *E. histolytica* (-0.022/min). Los valores de las velocidades relativas de caída de  $I_{cc}$  en las diferentes condiciones fueron similares a los correspondientes para DP (Tabla 3) por lo que concluimos que los lisados ambientales causan una caída inmediata después de agregarlos, rápida (75-80%/h) y simultánea de los valores de DP e  $I_{cc}$ , de magnitud similar al efecto causado por la hipoxia. Los lisados ambientales también causan un decremento en la resistencia eléctrica de las preparaciones que debe obedecer a una disminución relativamente más rápida de la DP que de la  $I_{cc}$  (Tabla 3). Los cambios en DP e  $I_{cc}$  pueden deberse a que los lisados ambientales impiden el transporte de  $Na^+$  de la mucosa a la serosa.

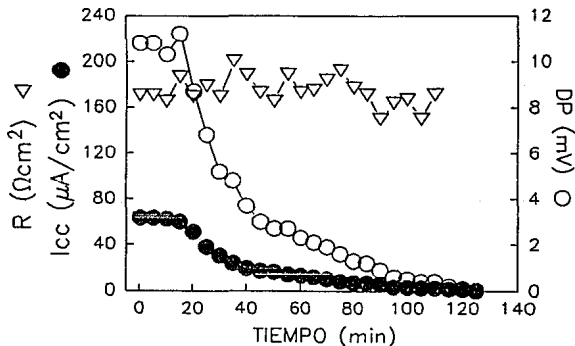


Fig. 14. Efecto tónico de 50,000 trofozoitos lisados de *E. invadens* PZ sobre los valores absolutos de DP,  $I_{cc}$  y R en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo. Durante los primeros 5 min, ambas hemisferas contenían solución de Ringer burbujeadada; al final de este periodo, la solución de Ringer fue reemplazada por medio TP/burbujeo en la hemisferaserosa y en la hemisferamucosa por 50,000 trofozoitos suspendidos en 2.5 ml de medio TP/sin burbujeo. Los valores absolutos de DP e  $I_{cc}$  fueron registrados cada 5 min.

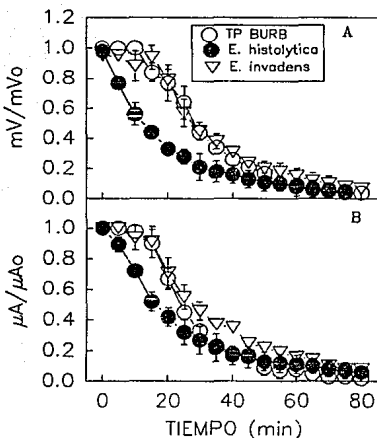


Fig. 15. Valores normalizados de DP e Icc en preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo ( $n = 5$ ) y tratadas con 50,000 trofozoitos de lisados de *E. histolytica* HM1 ( $n = 5$ ) o de *E. invadens* PZ ( $n = 3$ ). Durante los primeros 5 min, las hemicámaras contenian Ringer burbujeadas; al final de este periodo, el Ringer fue reemplazada por medio TP, y el burbujeo continuó solamente en la hemicámara serosa. Los lisados fueron añadidos en la hemicámara mucosa. Los valores relativos de cada punto fueron obtenidos al dividir el valor de DP o Icc de cada tiempo entre el valor inicial correspondiente. (A) Efecto de los lisados sobre los valores de DP de las preparaciones de colon ( $n = 5$ ). (B) Efecto de los lisados sobre los valores de Icc de las preparaciones ( $n = 5$ ).

#### b. Aspecto microscópico

Llama la atención que los segmentos de colon montados en la cámara de Ussing y tratados con los lisados de *E. histolytica* HM1 presentaron las mismas características que los mantenidos en medio TP sin burbujeo, lo cual sugiere que los efectos de los lisados ambientales sobre las preparaciones de colon de conejo montadas en cámaras de Ussing



son similares a los que produce la hipoxia. Al mismo tiempo que observamos en el registro electrofisiológico una caída mucho más rápida (se inició inmediatamente después de añadir el lisado amibiano en la hem cámara mucosa) (ver Fig. 15) observamos también en el tejido zonas de desprendimiento de la capa epitelial, descamación interglandular aumentada y vacuolas translúcidas bajo la capa epitelial, así como infiltrado celular en la *lamina propria* (Fig. 17). Estos resultados se repitieron en todos los segmentos tratados con lisados de trofozoítos de *E. histolytica* HM1.

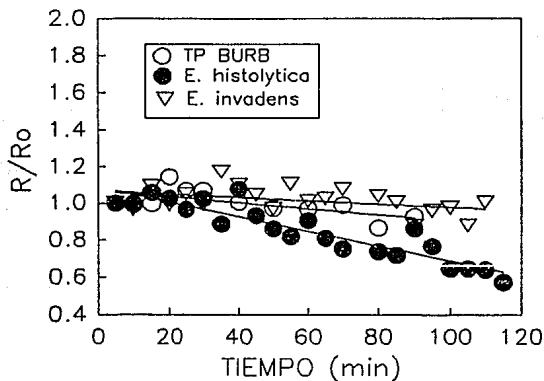


Fig. 16. Valores normalizados de la resistencia eléctrica transmural de preparaciones mantenidas en medio TP con burbujeo y tratadas con 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 ( $n = 5$ ) o de *E. invadens* PZ ( $n = 3$ ). La resistencia fue obtenida al dividir la DP en voltios entre la Icc en amperios/cm<sup>2</sup>. Los valores relativos de cada punto fueron obtenidos al dividir el valor de R de cada tiempo entre el valor inicial correspondiente. Mismas preparaciones de las Fig 11.

Tabla 3. Cambio de las propiedades eléctricas del colon bajo diferentes condiciones

| Condiciones    | Valores iniciales duran (min) | t en llegar a valor nulo (min) | Velocidad de caída |                 |                                  |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------|
|                |                               |                                | DP mV/min          | tcc $\mu$ A/min | R $\dot{U}$ cm <sup>2</sup> /min |
| Ringer burb    | 35                            | 120                            | -0.004             | -0.003          | 0.0017                           |
| TP burb        | 20                            | 120                            | -0.016             | -0.022          | -0.0016                          |
| TP sin burb    | 10                            | 65                             | -0.033             | -0.032          | 0.0007                           |
| E. Invadens    | 20                            | 115                            | -0.014             | -0.015          | -0.0040                          |
| E. histolytica | 5                             | 90                             | -0.022             | -0.020          | -0.0090                          |



Fig. 17. Efecto de lisados de *E. histolytica* HM1 sobre el aspecto microscópico de preparaciones mantenida en medio TP durante 95 min. El daño caracterizado por la formación de vacuolas y la separación de las capa epitelial de la lamina propria son señaladas con flechas.

## 2. Sobre preparaciones en Ringer

### a. Propiedades eléctricas

Para eliminar el efecto que pudiera causar la mezcla de los lisados con el medio TP, probamos los lisados de 50,000 trofozoítos de *E. histolytica* HM1 mezclados con solución de Ringer sobre preparaciones mantenidas con burbujeo del lado seroso. Encontramos una caída en las propiedades eléctricas de preparaciones similares a las mantenidas en medio TP y tratadas con lisados. Más aún, encontramos que las caídas de DP e lcc fueron más evidentes que en medio TP, ya que los valores nulos se alcanzaron a los 80

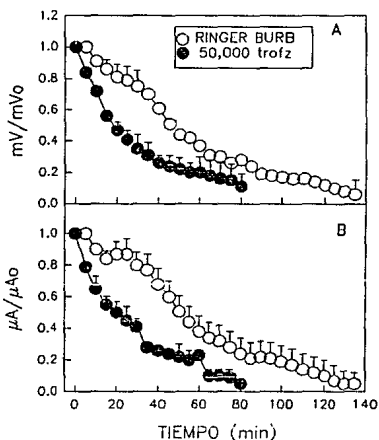


Fig. 18. Efecto de 50,000 trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre los valores relativos de DP e lcc de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo. Durante los primeros 5 min, ambas hemisféricas contenían solución de Ringer burbujeada; al cabo de este periodo agregamos lisados de 50,000 trofozoítos disueltos en Ringer en la hemisférica mucosa y mantuvimos burbujeando solo del lado seroso. Los valores relativos de cada punto fueron obtenidos al dividir el valor de DP o lcc de cada tiempo entre el valor inicial correspondiente. (A) Efecto de los lisados sobre los valores de DP de las preparaciones de colon ( $n = 5$ ). (B) Efecto de los lisados sobre los valores de lcc de las preparaciones ( $n = 5$ ).

min y la velocidad inicial de caída fue más pronunciada (Fig. 18). La caída en la RE también fue más evidente en Ringer que en medio TP (ver Fig. 22). Estos datos sugieren que un componente del medio TP inhibe parcialmente el efecto de los lisados.

#### b. Microscopía óptica

Las preparaciones en las que registramos las propiedades eléctricas fueron desmontados y fijadas para microscopía electrónica. Los cortes semifinos (incluidos en Epon y teñidos con azul de toluidina) de las preparaciones control no mostraron daño a pesar de haber estado montadas en la cámara de Ussing durante 120 min; incluso, parecieron mantenerse mejor que las preparaciones control incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina (Fig. 10). Las preparaciones tratadas con lisados de *E. histolytica* (en Ringer durante 80 min) mostraron, al igual que las mantenidas en medio TP y tratadas con lisados, descamación interglandular aumentada y edema con formación de vacuolas entre la capa epitelial y la *lamina propria* (Fig. 19).



Fig. 19. Aspecto microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo y tratada con lisados de 50,000 trofozoítos de *E. histolytica* HM1 durante 80 min. El daño fue similar a las preparaciones mantenidas tratadas y mantenidas en medio TP. La flecha indica el daño en las zonas interglandulares.

### c. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica de preparaciones control montadas durante 120 min en la cámara de Ussing no mostró daño, ya que observamos la capa epitelial íntegra con las células epiteliales columnares unidas a la membrana basal y a la *lamina propria*, y los núcleos de las mismas con apariencia normal (Fig. 20A). En cambio, las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos de *E. histolytica* se caracterizaron por separación entre las células epiteliales que se deformaron de columnares a cuboidales, y también sufrieron deformación del núcleo (Fig. 20B). Por otra parte, hubo destrucción de las microvellosidades de las células epiteliales, caracterizada por la fragmentación de la parte apical (Fig. 20D), no observada en las células control (Fig. 20C).

## 3. Dosis variables de lisados

### a. Propiedades eléctricas

Con las condiciones definidas antes decidimos analizar el efecto de diferentes dosis de lisados, para lo cual usamos 25,000, 50,000 y 100,000 trofozoítos. Encontramos una diferencia significativa entre los valores de DP e Icc del control y de cualquiera de las dosis de lisados. Las preparaciones tratadas con lisados de 100,000 trofozoítos tuvieron una caída más rápida en los valores de DP (Fig. 21A), cuya velocidad de caída fue de  $-0.033$  mV/min comparada con la caída espontánea de  $-0.004$  mV/min (Tabla 4). Por otra parte, pareció no haber diferencias entre las preparaciones tratadas con 25,000 y 50,000 trofozoítos, cuya velocidad de caída fue de  $-0.015$  mV/min con ambas dosis.

En cuanto a los valores de Icc la diferencia dependiente de dosis pareció menor (Fig. 21B), ya que las velocidades de caída fueron de  $-0.014$ ,  $-0.019$  y  $-0.020$   $\mu$ V/min para 25,000, 50,000 y 100,000 trofozoítos, respectivamente. Las velocidades de caída de las preparaciones tratadas fueron significativamente diferentes a las caídas de las preparaciones control, cuyo promedio fue de  $-0.003$   $\mu$ A/min (Tabla 4).

En la caída de la RE también encontramos diferencias entre las preparaciones control y las tratadas (Fig. 22). Las preparaciones control tuvieron una pendiente de  $-0.155$  ncm<sup>2</sup>/min mientras que las tratadas con lisados de 25,000 trofozoítos tuvieron una pendiente de  $-1.130$  ncm<sup>2</sup>/min, las tratadas con 50,000 trofozoítos tuvieron una pendiente de  $-1.282$  ncm<sup>2</sup>/min y las tratadas con 100,000 trofozoítos tuvieron una pendiente de  $-2.238$  ncm<sup>2</sup>/min (Tabla 4).

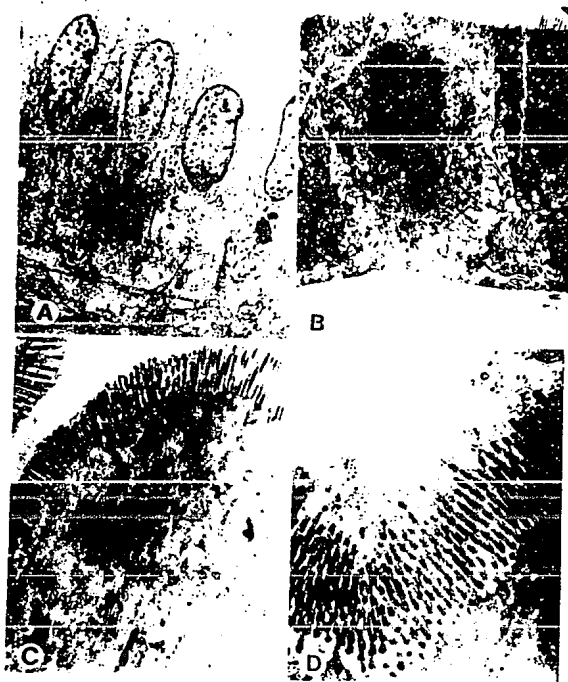


Fig. 20. Daño ultraestructural de las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos. (A) Celúlas epiteliales de preparaciones no tratadas. (B) Céúlas epiteliales de preparaciones tratadas. (C) Microvellosidades de preparaciones no tratadas. (D) Microvellosidades de preparaciones tratadas.

Tabla 4. Efecto de la dosis de lisados de trofozoítos de *E. histolytica* sobre las propiedades eléctricas del colon

| Efecto de     | Valores<br>iniciales duran<br>(min) | t en llegar a<br>valor nulo<br>(min) | Velocidad de caída |                    |                                    |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|
|               |                                     |                                      | DP<br>mV/min       | Icc<br>$\mu$ A/min | R<br>$\Omega$ cm <sup>2</sup> /min |
| Ringer burb   | 35                                  | 130                                  | -0.004             | -0.003             | -0.155                             |
| 25,000 trofz  | 5                                   | 80                                   | -0.015             | -0.014             | -1.130                             |
| 50,00 trofz   | 5                                   | 80                                   | -0.015             | -0.019             | -1.282                             |
| 100,000 trofz | 5                                   | 55                                   | -0.033             | -0.020             | -2.238                             |

Concluimos que los lisados de *E. histolytica* HM1 causan la caída de la DP, Icc y RE de manera dependiente de la dosis y por lo tanto el daño a la preparación también debe ser proporcional a la dosis.

#### b. Microscopía óptica

También encontramos en las preparaciones diferencias morfológicas que dependieron de la dosis de lisados. Los cortes semifinos de las preparaciones tratadas con lisados de 25,000 trofozoítos mostraron un daño menor que consistió en formación de pequeñas vacuolas translúcidas entre la capa epitelial y la *lamina propria*

(Fig. 23A). Los cortes semifinos de las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos mostraron un daño intermedio que consistió principalmente en edema y mayor separación de la capa epitelial de la *lamina propria*, así como pérdida de la integridad de las células epiteliales interglandulares caracterizada por la inconsistencia en la tinción (ver Fig. 19). Los cortes semifinos de las preparaciones tratadas con lisados de 100,000 trofozoítos mostraron daño mayor, caracterizado por destrucción prácticamente total de la capa epitelial en las zonas interglandulares y proliferación de vacuolas en la *lamina propria* (Fig. 23B).

Por lo anterior concluimos que el daño al colon dependientes de la dosis de lisados de *E. histolytica* HM1 encontrado en los registros electrofisiológicos correlaciona perfectamente con el grado de daño morfológico.

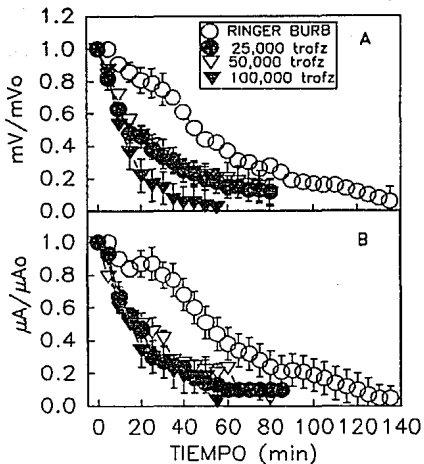


Fig. 21. Efecto de dosis variables de lisados de *E. histolytica* sobre los valores relativos de DP e Icc de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo ( $n = 3$ ). Después de los primeros 5 min de estabilización en solución de Ringer burbujeadas, agregamos lisados de 25,000, 50,000 o 100,000 trofozoítos disueltos en Ringer en la hemisférica mucosa y mantuvimos burbujeadas solo del lado seroso. Los valores relativos de cada punto fueron obtenidos como describimos antes. (A) Efecto de las dosis de lisados sobre los valores de DP de las preparaciones de colon. (B) Efecto de las dosis de lisados sobre los valores de Icc de las preparaciones.



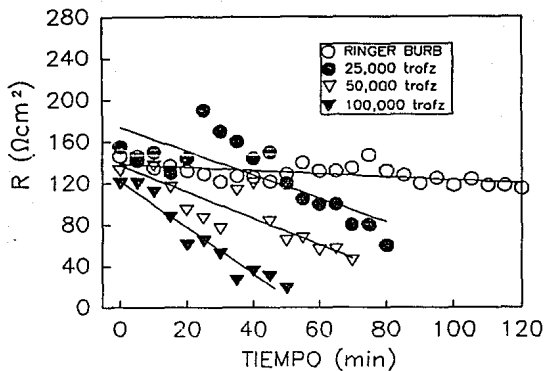


Fig. 22. Efecto de dosis variables de lisados de trofozoítos de *E. histolytica* HM1 sobre los valores absolutos de la resistencia eléctrica transmural de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo. La resistencia fue obtenida al dividir la DP en voltios entre la Icc en amperios/cm<sup>2</sup>. (Datos de la Fig. 20).

### c. Ultraestructura

Los efectos electrofisiológicos dependiente de dosis también correlacionan con el daño ultraestructural. Con lisados de 25,000 trofozoítos, el daño característico en las preparaciones consistió en deformación de la parte basal de las células epiteliales, con tendencia a la formación de una vacuola basal (Fig. 24A). El daño producido por lisados de 50,000 trofozoítos se caracterizó por separación entre las células epiteliales que se deformaron de columnares a cuboidales y se acompañaron de deformación del núcleo, como describimos anteriormente (Fig. 24B). El daño más severo ocurrió con lisados de 100,000 trofozoítos, que se caracterizó por destrucción de las células epiteliales principalmente las interglandulares, incluyendo pérdida de uniones intercelulares y de microvellosidades (Fig 24C).

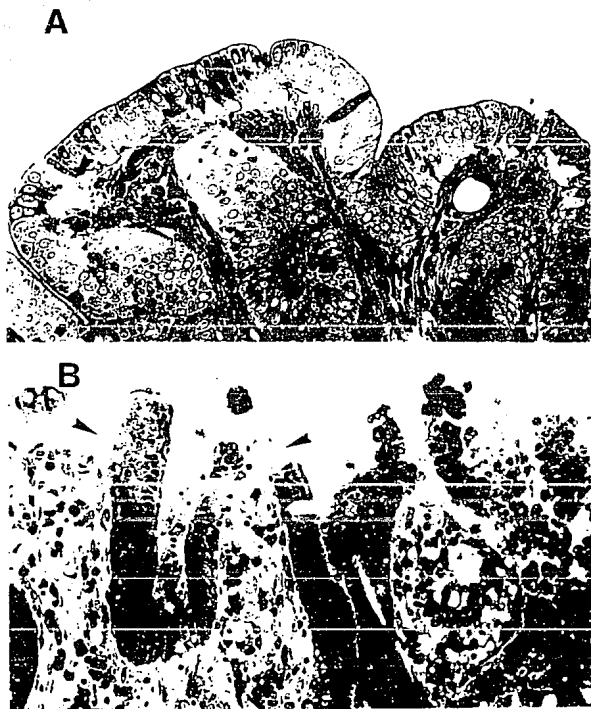


Fig. 23. Efectos típicos de dosis variables de trofozoitos lisados de *E. histolytica* HM1 sobre la morfología de preparaciones mantenidas en Ringer con burbujeo. (A) Lisados de 25,000 trofozoitos. (B) Lisados de 100,000 trofozoitos. Las flechas indican la destrucción de las células en las zonas interglandulares.

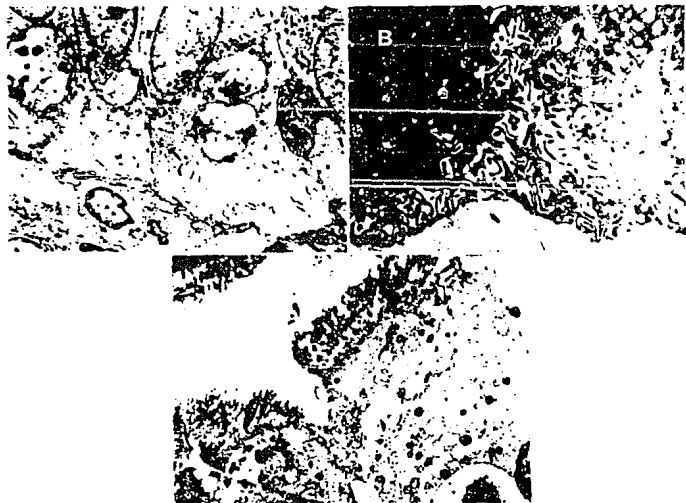


Fig. 24. Ultraestructura de preparaciones tratadas con dosis variables de lisados de *E. histolytica* HM1. (A) Lisados de 25,000 trofozoítos. (B) Lisados de 50,000 trofozoítos. (C) 100,000 trofozoítos.

#### 4. Curso temporal del deterioro

##### a. Propiedades eléctricas

Como los resultados encontrados indicaban una clara correlación entre el daño morfológico y el efecto electrofisiológico de los lisados de *E. histolytica* sobre el colon, decidimos analizar el curso temporal del deterioro electrofisiológico y morfológico. Para

ello montamos dos preparaciones simultáneas que fueron manipuladas de la siguiente manera: la cámara de Ussing No. 1 fue desmontada a los 15 min después de agregar lisados de 50,000 trofozoítos e inmediatamente fijada para microscopía en tanto que en la cámara No. 2 se continuó registrando las propiedades eléctricas hasta 40 min después de agregados los lisados, al cabo de los cuales la desmontamos e inmediatamente la fijamos. Los valores iniciales promedio de las preparaciones antes de agregar los lisados fueron de aproximadamente 7 mV y  $40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  y las preparaciones fueron fijadas para análisis microscópico a medida que los valores decrecían aproximadamente a la mitad del valor inicial (Fig. 25A).

#### b. Aspecto microscópico

Los cortes semifinos de preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos durante 15 min -a diferencia de las preparaciones que fueron tratadas hasta que sus propiedades eléctricas eran nulas (aprox. 80 min)- mostraron un daño menor caracterizado por la formación de vacuolas entre la capa epitelial y la *lamina propria*, asociado con pequeñas zonas de desprendimiento entre las células epiteliales y la *lamina propria*, pero que permite que las células epiteliales permanezcan unidas entre sí (Fig. 25B). Los cortes semifinos de las preparaciones fijadas 40 min después de su exposición a los lisados mostraron principalmente edema en la *lamina propria* (Fig. 25C), mientras que las preparaciones expuestas a los lisados hasta que se anulaban sus propiedades eléctricas (80 min) mostraron un daño mayor (Fig. 25D), como ya describimos anteriormente.

#### c. Microscopía electrónica

El efecto de los lisados de 50,000 trofozoítos sobre el curso temporal del deterioro de las preparaciones, se observó principalmente en la parte basal de las células epiteliales. En las preparaciones control se observa, en condiciones normales, la membrana basal unida a las células epiteliales y ésta a la *lamina propria* (Fig. 26A). Las preparaciones tratadas con los lisados durante 15 min mostraron edema intracelular localizado en la parte basal de las células epiteliales, que pareció permitir la formación de vacuolas entre la membrana basal y dichas células epiteliales (Fig. 26B). A los 45 min de tratamiento con los lisados, las vacuolas parecían estar más hinchadas (Fig. 26C), además del edema en la *lamina propria*. A los 80 min de tratamiento (cuando los valores de las propiedades eléctricas eran prácticamente nulos) había clara separación intercelular y separación de la capa epitelial de la *lamina propria* (Fig 26D).

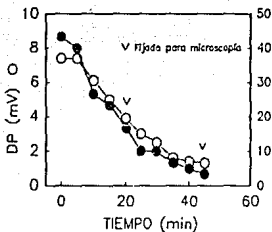


Fig. 25. Deterioro electrofisiológico y microscópico de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo y tratada con 50,000 trofozoitos lisados de *E. histolytica* HM1. En dos cámaras de Ussing montamos preparaciones en las mismas condiciones. Durante los primeros 5 min, ambas cámaras contenían Ringer burbujead; al cabo de este periodo agregamos lisados de 50,000 trofozoitos disueltos en Ringer en las hemisferios mucosa y mantuvimos burbujead solo del lado seroso. En la primer cámara registramos la DP e Icc; a los 20 min fijamos para microscopía la preparación montada en la segunda cámara y a los 45 min la preparación de la primer cámara. (A) Valores absolutos de la caída de DP e Icc. (B) Aspecto microscópico de la preparación fijada a los 20 min. (C) Preparación fijada a los 45 min. (D) Preparación fijada a los 80 min.

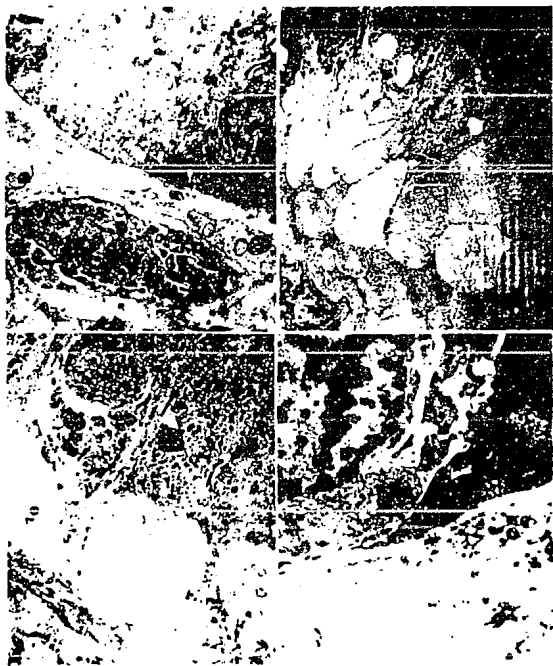


Fig. 26. Cinética del deterioro ultraestructural de una preparación mantenida en Ringer con burbujeo y tratada con 50,000 trofozoitos lisados de *E. histolytica* HM1. (A) Preparación control. (B) Expuesta a los lisados durante 15 min. (C) Expuesta a los lisados durante 45 min. (D) Expuesta a los lisados durante 80 min.

## D. Efecto de la preincubación con suero humano

### 1. Suero normal

Para ver si el efecto causado por los lisados era bloqueado con suero humano inmune (SHI) dirigido contra *E. histolytica*, necesitábamos controlar con suero humano normal (SHN). Si el SHN no afectaba las propiedades eléctricas de las preparaciones y tampoco afectaba el efecto de los lisados, podríamos hacer el experimento directamente. De no ser así, el experimento requería el uso de la fracción de inmunoglobulinas con o sin actividad de anticuerpos anti*amibianos*.

En preparaciones montadas y mantenidas en Ringer por 10 min agregamos 250  $\mu$ l de SHN en la hemicámara mucosa (concentración final, 10%) y mantuvimos la preparación en Ringer burbujeado del lado seroso. Encontramos que las preparaciones tratadas se mantuvieron menos tiempo que las no tratadas (ver Fig. 18) ya que alcanzaron valores nulos a los 85 min, pero la caída de DP e Icc fue gradual (Fig. 27A), es decir, no tuvieron una caída brusca como la que ocurría cuando las preparaciones eran tratadas solamente con lisados. Esta caída gradual se reflejó mejor en la RE, ya que el SHN no la hizo caer y sus valores iniciales se mantuvieron durante todo el experimento (Fig. 27A).

Por otra parte las preparaciones mantenidas en Ringer que fueron tratadas con lisados preincubados con SHN por 1 min, mostraron una caída mas rápida en sus propiedades eléctricas, llegaron a valores nulos a los 60 min y, sorprendentemente, los valores de RE aumentaron con el tiempo (Fig. 27B).

Por estos resultados que concluimos que con SHN ocurre una caída gradual de la DP e Icc en aproximadamente 85 min, aunque no se afecta la RE; mientras que la preincubación de SHN con lisados, al igual que los lisados solos, provocan una caída en DP e Icc, sin embargo a diferencia de los lisados solos, la preincubación con SHN evita la caída de la RE y provoca un aumento de la misma.

### 2. Suero inmune

Las preparaciones tratadas con SHI al 10% en la hemicámara mucosa se comportaron de manera similar a las tratadas con SHN al 10%, aunque los valores de RE fueron más dispersos (Fig. 28A). Las preparaciones tratadas con lisados preincubados con SHI

se comportaron de manera similar a las preparaciones tratadas con lisados preincubados con SHN (Fig. 28B).

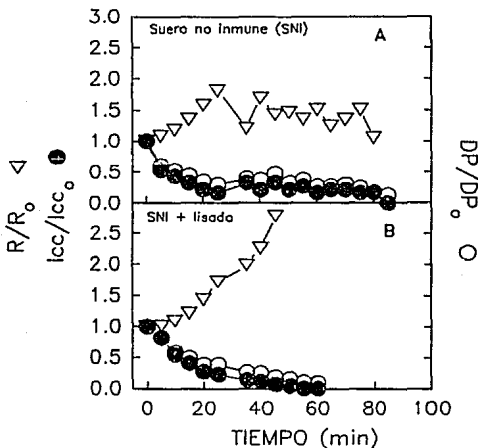


Fig. 27. Efecto del suero humano normal (SHN) sobre los valores absolutos de DP, ICC y R de preparaciones tratadas con trofozoítos lisados de *E. histolytica* HM1. En dos cámaras de Ussing montamos dos preparaciones en las mismas condiciones. Durante los primeros 5 min, ambas cámaras contenían Ringer burbujeadado; al cabo de este periodo en la primer cámara agregamos del lado mucoso, SHN al 10% disuelto en Ringer y en la segunda cámara agregamos lisados de 25,000 trofozoítos preincubados por 1 min con SHN al 10% y mantuvimos burbujeadado solo los lados serosos. (A) Control negativo: tratamiento con SHN ( $n = 3$ ). (B) Experimental: tratamiento con SHN y lisados de 25,000 trofozoítos ( $n = 3$ ).

Estos resultados sugieren que la protección contra el efecto de los lisados sobre la RE de las preparaciones es debido a un factor del suero, ya que los resultados obtenidos con SHN y SHI fueron similares. Es necesario determinar las condiciones de



preincubación apropiadas que permitan analizar las posibles diferencias entre los tratamientos con SHN y SHI.

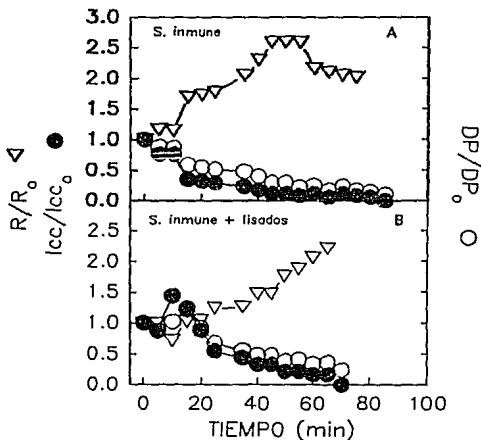


Fig. 28. Efecto del suero humano inmune (SHI) sobre los valores absolutos de DP, ICC y R de preparaciones tratadas con trofozoitos lisados de *E. histolytica* HM1. El tratamiento fue igual al del SHN (ver Fig. 27). (A) Control negativo: tratamiento con SHI ( $n = 2$ ). (B) Experimental: tratamiento con SHI y lisados de 25,000 trofozoitos ( $n = 2$ ).

## DISCUSION

### A. Propiedades eléctricas de las preparaciones de colon

Las preparaciones clásicas de epitelio intestinal se han usado para el entendimiento del transporte de electrólitos en diferentes partes del intestino (Frizzell et al., 1976; 1978; Edmons y Marriott, 1968; Thompson et al., 1981; Schultz et al., 1981). Estas preparaciones "de mucosa intestinal" consisten de segmentos intestinales a los que se les desprenden las capas musculares, por lo que en realidad contienen la capa epitelial, la *lamina propria* y la *muscularis mucosae*.

Como en nuestro modelo deseáramos poder estudiar la inmunidad local del intestino, de entrada nos propusimos tratar de emplear preparaciones con todas las capas de la pared intestinal.

Estas preparaciones parecen comportarse de manera diferente que las preparaciones clásicas, ya que sus valores iniciales promedio fueron 5-8 mV para DP y 30-35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  para Icc y alcanzaron valores nulos entre 120 y 140 min (Fig. 3). En las preparaciones clásicas se han encontrado valores iniciales de 20 mV y 82  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Schultz et al., 1977) hasta 3-4 mV y 38  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Edmonds y Marriott, 1968) para DP e Icc, respectivamente. En las preparaciones de Edmonds y Marriott, los valores indicados se mantienen alrededor de 20 min y declinan gradualmente durante las siguientes 2-3 h. Nuestras preparaciones completas de colon mantienen por tanto sus propiedades eléctricas de manera similar que las preparaciones clásicas.

En los epitelios mucosos las propiedades eléctricas dependen del transporte neto de sodio (Frizzell et al., 1976). Esta característica ha sido mostrada en preparaciones clásicas mediante bloqueadores del transporte de sodio que causan una caída de DP e Icc (Frizzell y Turnheim, 1978; Schultz et al., 1981). Para probar la funcionalidad de nuestras preparaciones usamos por una parte amilorida (bloqueador del intercambiador sodio-protones localizado principalmente en la parte apical de las células epiteliales) y ouabaina (bloqueador de la bomba de sodio-potasio localizada en la parte basolateral de las células epiteliales).

En preparaciones clásicas, amilorida  $10^{-6}$  M provoca una caída inmediata de Icc; sin embargo en nuestras preparaciones este fármaco causa una caída gradual de DP e Icc, llegando a valores nulos en 88 min. Por otro lado, los valores de RE se matuvieron durante todo el experimento (Fig. 4), de manera similar a lo reportado por otros autores (Frizzell y Turnheim, 1978; Schultz et al., 1981). Este efecto sobre nuestras preparaciones

puede ser debido a (i) que la concentración de amilorida no fue suficiente para provocar una caída inmediata; (ii) que haya permitido una mayor actividad en la bomba de sodio-potasio, para compensar el bloqueo apical.

La ouabaína  $10^{-6}$  M, colocada en ambas hemicámaras, provocó una caída inmediata de los valores de DP e Icc de las preparaciones completas de manera similar al ocurrido en preparaciones clásicas, mientras que los valores de RE se mantuvieron prácticamente inalterados (Fig. 5). Por estos resultados pensamos que en las preparaciones completas parece contribuir más el transporte de sodio a través de la ATPasa de sodio-potasio, aunque no podemos descartar que las concentraciones usadas de ouabaína y su utilización en ambas hemicámaras hayan permitido un bloqueo más eficiente del transporte de sodio que la amilorida.

Los trofozoítos de *E. histolytica* pierden su integridad y viabilidad cuando son colocados en medios salinos, pero son mantenidas en medio de cultivo (i.e. medio TP, TYI) (Cano-Mancera y López-Revilla, 1989); además son dañados por el oxígeno (Band y Cirrito, 1979). Como inicialmente estábamos interesados en ver el efecto de los trofozoítos enteros necesitábamos preparaciones que mantuvieran sus propiedades eléctricas al ser burbujeadas solo del lado seroso y no del lado mucoso (donde íbamos a colocar las amibas), además de que pudieran sobrevivir y funcionar aceptablemente en el medio TP. Cuando probamos nuestras preparaciones bajo estas condiciones encontramos que mantenían sus propiedades eléctricas hasta 120 min (Fig. 6) aunque su velocidad de caída fue más rápida que en Ringer (Fig. 2). Cuando las preparaciones fueron mantenidas en medio TP sin burbujear (hipoxia) los valores de DP e Icc cayeron inmediatamente (Fig. 7), de manera similar a lo reportado en preparaciones clásicas por Edmonds y Marriott (1968), donde además evaluaron el efecto de 2,4-dinitrofenol, cianuro y yodacetato. Estos resultados y los nuestros sugieren que el mantenimiento de la DP colónica depende del metabolismo oxidativo y que el tejido tiene relativamente poca reserva de fosfatos de alta energía disponibles para mantener la DP.

## B. Aspecto microscópico de los segmentos de colon

A diferencia de otros modelos de amibiasis intestinal (Takeuchi y Phillips, 1975; Ghadirian et al., 1984; Anaya-Fernández et al., 1985) el nuestro permite, sin necesidad de una búsqueda a lo largo del colon, detectar la zona de daño que se localiza en el área de 6 mm de diámetro que es expuesta a los lisados y donde además obtenemos el registro electrofisiológico.

En nuestras preparaciones mantenidas en medio TP y montadas en las cámaras de Ussing no observamos daño morfológico, ya que mantuvieron su integridad desde la mucosa hasta la serosa (Fig. 10) de manera similar a las preparaciones mantenidas en Ringer (Fig. 9). Esto ocurrió a pesar de que las muestras fueron fijadas al final del experimento, es decir, aproximadamente 120 min después de estar montadas en la cámara de Ussing. Las preparaciones mantenidas con medio TP sin burbujeo (hipóxicas) sí mostraron daños, caracterizado por la formación de vacuolas translúcidas, asociadas con la separación de la capa epitelial de la lamina propia (Fig. 11); además este daño se produjo a los 70 min de montadas las preparaciones.

Por tanto, el daño morfológico provocado por la hipoxia correlacionó con el efecto electrofisiológico, ya que estas preparaciones alcanzaron valores nulos a los 70 min, cuando fueron fijados para microscopía. Las preparaciones normales fueron fijadas a los 120 min (cuando alcanzaron sus valores nulos) y no mostraron daño morfológico. El daño morfológico mostrado por estas preparaciones hipóxicas fue similar al reportado para la necrosis intestinal causado por hipoxia en la enterocolitis necrosante debido a isquemia intestinal en ratas recién nacidas (Caplan et al., 1990).

### C. Efecto de los lisados amibianos

McGowan et al. (1988) mostraron que lisados de 100,000 trofozoítos/ml de (100,000/ml) de *E. histolytica* HM1 alteran el transporte de electrólitos, caracterizado por un incremento en la lcc. También muestran que provoca una disminución en el transporte neto de sodio, sin embargo, se ha demostrado que un incremento de la lcc es debido a un incremento en transporte neto de sodio (Frizzell et al., 1976; Schultz, et al., 1981; Thompson et al., 1981). Por otro lado, en las manos de McGowan et al (1983) los efectos causados por los lisados amibianos ocurren solamente cuando éstos son colocados del lado seroso de las preparaciones y como ellos usan preparaciones clásicas, las amibas son colocadas en la *lamina propria* en la base de las células epiteliales del intestino y no en la parte apical, por donde naturalmente invaden la mucosa intestinal. Esto podría representar un modelo tardío de la enfermedad, cuando la *lamina propria* ha sido invadida.

Con nuestro modelo estamos interesados en observar los efectos iniciales de la interacción de las amibas con la mucosa del intestino grueso para poder estudiar la respuesta inmune local. Por ello los lisados fueron colocados en la hemicámara mucosa de preparaciones completas de colon. La adición de lisados de 50,000 trofozoítos de *E.*

*histolytica* HM1 (20,000/ml) a preparaciones de colon mantenidas en medio TP provocaron una caída inmediata en los valores de DP, Icc y RE (Fig. 14), mientras que la adición de la misma dosis de lisados de *E. invadens* PZ no tuvieron efecto. Un dato interesante es que los lisados de *E. histolytica* causaron una caída de DP más rápida que la de Icc ya que esto provoca (por la ley de Ohm) que haya una caída de la RE. Esta caída en la RE (Fig. 16) sugirió que los lisados provocan daño estructural en la capa epitelial y no un bloqueo del transporte de sodio, como ocurre con la amilorida y la ouabaina (Figs. 4 y 5) donde la caída de DP y Icc ocurre simultáneamente, lo que permite que no haya una caída aparente en la RE.

Por otro lado analizamos la morfología de los segmentos que estuvieron en contacto con los lisados de *E. histolytica* 90 min y encontramos que tenían características similares a las preparaciones hipóxicas: formación de vacuolas translúcidas asociada con separación de la capa epitelial de la *lamina propria* (Fig. 17). Lo efecto electrofisiológicos de los lisados correlacionaron con los de la hipoxia, lo que nos sugiere que los lisados de podrían afectar el metabolismo oxidativo que afecta la DP, como el efecto sugerido por Edmonds y Marriott (1968) para la falta de oxígeno.

Cuando agregamos las mismas dosis de lisados de *E. histolytica* a preparaciones mantenidas en Ringer (para eliminar el efecto que pudiera causar la mezcla de los lisados en medio TP), estas dosis provocaron una caída inmediata en las propiedades eléctricas de las preparaciones. Además encontramos una amplificación del efecto, ya que se alcanzaron valores nulos a los 80 min y la velocidad de caída fue más pronunciada (Fig. 18). Por otro lado, el efecto fue más evidente porque las preparaciones no tratadas en Ringer mantienen mejor sus propiedades eléctricas que en medio TP (Fig. 5). Estos datos sugieren que uno de los componentes del medio TP bloquea parcialmente el efecto de los lisados y hace que sea más lento que en Ringer. Avila et al. (1985) reportaron que la principal actividad proteolítica de *E. histolytica* es debida a una actividad de cisteín-proteasa (CP) inhibible con pHMB y en nuestro laboratorio se ha encontrado que hay una semejanza entre las cinéticas de autólisis amibiana en medio de cultivo (TYI) y en PBS-pHMB y que en PBS solo la autólisis es mayor, lo que sugirió que algún componente del medio TYI inhibe la actividad de CP (Jiménez-Delgado, 1990).

La microscopía de las preparaciones mantenidas en Ringer y tratadas con lisados mostraron el mismo daño (Fig. 20) que las preparaciones mantenidas en medio TP y tratadas con lisados, solo que en menos tiempo (80 min).

Los efectos de los lisados de *E. histolytica* sobre las preparaciones de colon mantenidas en Ringer fueron dependientes de la dosis. A mayor dosis, mayor velocidad de caída de las propiedades eléctricas (Fig. 21), principalmente en la DP, y como consecuencia, en la RE (Fig. 22). Estos cambios en la velocidad de caída de las propiedades eléctricas, dependientes de la dosis de los lisados correlacionaron con el daño morfológico observado con cada dosis. A dosis menores (25,000 trofozoítos) el daño se caracterizó por la presencia de pequeñas vacuolas entre la capa epitelial y la *lamina propria* (Fig. 23A). Con 50,000 trofozoítos hubo daño intermedio, que consistió en edema y separación entre la capa epitelial y la lamina propria, así como pérdida de la integridad de las células epiteliales interglandulares (Fig. 23B). Con 100,000 trofozoítos el daño fue mayor, caracterizado por destrucción total de la capa epitelial en las zonas interglandulares (Fig. 23C).

Los cambios ultraestructurales también dependieron de la dosis. Lisados de 25,000 trofozoítos deformaron la parte basal de las células epiteliales (Fig. 24). Con lisados de 50,000 trofozoítos hubo separación intercelular de las células epiteliales con deformación de columnares a cuboidales y deformación del núcleo. El daño con lisados de 100,000 trofozoítos se caracterizó por destrucción de las células epiteliales, principalmente las interglandulares, incluyendo pérdida de uniones intercelulares y de microvellosidades.

Conociendo la correlación entre el efecto electrofisiológico y el daño morfológico de los lisados de *E. histolytica* sobre el colon, tratamos de analizar el curso temporal de ambos efectos. Como las preparaciones tratadas con lisados de 50,000 trofozoítos alcanzan valores nulos de DP e Icc en 80 min con las consecuencias morfológicas descritas, decidimos saber qué ocurría morfológicamente a los 15 y 40 min (Fig. 25). A los 15 min hubo formación de pequeñas vacuolas entre la capa epitelial y la *lamina propria* y zonas incipientes de desprendimiento de las células epiteliales; a los 40 min habían principalmente edema y cuando se anularon los valores de las propiedades eléctricas (80 min) el daño consistió en edema, separación de la capa epitelial de la *lamina propria* y pérdida de la integridad de las células epiteliales interglandulares.

De la misma manera, el análisis de la ultraestructura mostró la secuencia de los efectos de los lisados sobre las preparaciones. A los 15 min encontramos edema intracelular en la parte basal de las células epiteliales que pareció permitir la formación de vacuolas entre la membrana basal y dichas células epiteliales. A los 45 min las vacuolas estaban más hinchadas, además del edema observado en la *lamina propria*.

A los 80 min la separación intercelular era clara y la capa epitelial se había desprendido de la *lamina propria* (Fig. 25).

Por tanto los lisados parecen:

- 1) Afectar el transporte de sodio (5 min; caída de DP e Icc).
- 2) En consecuencia afectar el transporte de agua (Sandle et al., 1990)
- 3) Permitir el edema y la deformación en la parte basal de las células epiteliales
- 4) Causar la formación de pequeñas vacuolas entre la capa epitelial y la membrana basal (15 min) que originan la separación de la capa epitelial de la *lamina propria*
- 5) Causar el edema (40 min) permitiendo que la separación entre la capa epitelial y la *lamina propria* sea mayor.
- 6) Causar la pérdida de la integridad de las células epiteliales interglandulares (80 min).
- 7) Permitir que las células cambien de forma de columnares a cuboidales causado por la presión de la "burbuja" por debajo de las células epiteliales
- 8) Causar una separación entre las células epiteliales (80 min) que en sus inicios (aprox 60 min) causan una caída en la RE.
- 9) Causar pérdida en la integridad de las células epiteliales interglandulares
- 10) Llevar a la muerte celular y por tanto a la destrucción de la capa epitelial que ocurre con dosis mayores.

Los intentos preliminares de análisis del efecto del suero inmune sobre la actividad de los lisados indicaron que un elemento del suero no sólo contrarresta la caída de la RE sino la aumenta, aunque no contrarresta la caída de la DP y la Icc. Por tanto, el suero no evita el bloqueo del transporte de sodio y los lisados en presencia de suero parecen actuar como la amilorida y la ouabaina, que provocan una caída en la DP y la Icc pero no en la RE.

Nuestro modelo *in vitro* permite analizar efectos inmediatos (5-80 min) de lisados de trofozoitos de *E. histolytica* sobre la fisiología (propiedades eléctricas dependientes del transporte de sodio) y la morfología de preparaciones de colon. Por tanto es útil para caracterizar tanto el mecanismo patogénico de *E. histolytica* como la inmunidad local en la amibiasis intestinal, así como de otros parásitos patogénicos del tracto intestinal.

Este modelo probablemente nos permitirá estudiar la inmunidad local del intestino contra las amibas, en especial el papel de la inmunidad en los efectos electrofisiológicos y morfológicos de *E. histolytica* sobre el colon.

## REFERENCIAS

- Acosta,G; Campos,R; Barranco,C; Isibasi,A; Kumate,J (1983): Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Ann NY Acad Sci* 409, 760-765.
- Ahluwalia,N; Misra,RC; Saha,K; Agarwal,SK; Gupta,PS (1982): Depression of jejunal IgA and peripheral T-cell counts in patients of amoebic liver abscess. *Indian J Med Res* 75, 734-738.
- Al-Awqati,Q; Cameron,JL; Greenough III,WB (1973): Electrolyte transport in human ileum: effect of purified cholera exotoxin. *Am J Physiol* 224, 818-823.
- Alikhan,Z; Meerovitch,E (1968): Serological characterization of  $\tau$ M (19S) and  $\tau$ G (7S) rabbit antibodies in response to *Entamoeba histolytica* antigens. *Can J Microbiol* 14, 1317-1323.
- Alvarez-Alva,R; De la Loza,A (1971): Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del IMSS de la República Mexicana. *Arch Invest med (Mex)* 2(Suppl. 1), 327-332.
- Anaya-Velázquez,F; Martínez-Palomo,A; Tsutsumi,V; González-Robles,A (1985): Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strain of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 34, 723-730.
- Arias-Negrete,S; Calderón,J (1980): La participación de linfocitos T en la respuesta inmune anti-*Entamoeba histolytica* en hamsters. *Arch Invest med (Mex)* 11(Suppl. 1), 211-215.
- Avila,EE; Sánchez-Garza,M; Calderón,J (1985): *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: sulphhydryl-dependent proteolytic activity. *J Protozool* 32, 163-166.
- Band,RN; Cirrito,H (1979): Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide and oxygen. *J Protozool* 26, 282-286.



Binder,HJ; Sandle,GI (1987): Electrolyte absorption and secretion in the mammalian colon. In: Physiology of Gastrointestinal tract. Vol. 2. (Ed: Johnson,LR) Raven, New York, 1389-14-18.

Bos,HJ (1979): Entamoeba histolytica: cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extract; isolation and characterization of an intracellular toxin. Exp Parasitol 47, 369-377.

Campos-Rodríguez,R; Andrade,P; Acosta,G; Barranco,C; Isibasi,A; Kumate,J (1986): Inducción de una respuesta inmune humoral contra antígenos de Entamoeba histolytica. Arch Invest med (Mex) 17(Suppl. 1), 273-276.

Canales,L; Tsutsumi,V; Ramirez-Rosales,A; Martínez-Palomo,A (1986): Amibiasis hepática experimental en cobayos: un modelo de resistencia. Arch Invest med (Mex) 17(Suppl. 1), 223-228.

Cano-Mancera,R; López-Revilla,R (1989): Maintenance of integrity, viability, and adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites in different incubation media. J Protozool 35, 470-475.

Capín,R; González-Mendoza,A; Ortiz-Ortiz,L (1980): Disminución de la actividad del sistema fagocítico mononuclear en hamsters infectados con Entamoeba histolytica. Arch Invest med (Mex) 11(Suppl. 1), 235-240.

Caplan,MIS; Sun,XM; Hsueh,W (1990): Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rat: the role of platelet-activating factor (PAF-acether). Gastroenterology 99, 979-986.

Castro,GA (1982): Immunological regulation of epithelial function. Am J Physiol 243, G321-G329.

Castro,GA (1989): Immunophysiology of enteric parasitism. Parasitology Today 5, 11-19.

Castro,GA; Harari,Y; Russell,D (1987): Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. Am J Physiol 253, G540-G548.

Castro,GA; Hessel,JJ; Walen,G (1979): Anaphylatic-like reaction of small intestinal epithelium in parasitized guinea-pigs. *Parasite Immunol* 1, 259-266.

Civan,MM (1983): Epithelial Ions and Transport. Application of biophysical techniques. 1st ed. Vol. 4. (Series Ed: Bittar,EE. Transport in the Life Sciences.) John Wiley & Sons, New York. 204 pages.

Coviello,A; Elson,G; Fernandez,FM (1976): Effect of angiotensin II on short-circuit current in amphibian membranes. *Biochem Pharmacol* 25, 106-107.

Craig,CF (1927): Observations upon the hemolytic, cytolytic and complement-binding properties of extracts of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 7, 225-240.

Dawson,DC (1991): Ion channels and colonic salt transport. *Ann Rev Physiol* 53, 321-339.

Dawson,DC; Richards,NW (1990): Basolateral K conductance: Role in re regulation of NaCl absorption and secretion. *Am J Physiol* 259, C181-C195.

Debnam,ES; Snart,RS (1975): Water transport response of toad bladder to prolactin. *Comp Biochem Physiol* A52, 75-76.

Diamantstein,T; Klos,M; Gold,D; Hahn,H (1981): Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extract for human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 126, 2084-2086.

Donowitz,M; Asarkof,N; Pike,G (1980): Calcium dependence of serotonin-induced changes in rabbit ileal electrolyte transport. *J Clin Invest* 66, 341-352.

Edmonds,CJ; Marriott,J (1968): Electrical potential and short circuit current of and in vitro preparation of rat colon mucosa. *J Physiol* 194, 479-494.

Fasano,A; Hokama,Y; Russell,R; Morris,JG (1991): Diarrhea in ciguatera fish poisoning: preliminary evaluation of pathophysiological mechanisms. *Gastroenterology* 100, 471-476.

Fasano,A; Kay,BA; Russell,RG; Maneval,DR; Levine,MM (1990): Enterotoxin and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58, 3717-3723.

Feria-Velasco,A; O'Shea,S (1974): Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie de *E. histolytica*. II. Por técnicas inmunoquímicas de alta resolución. *Arch Invest med (Mex)* 5(Suppl. 2), 315-324.

Feria-Velasco,A; Treviño-García,MN (1972): Actividad de fosfatasa ácida en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Estudio ultraestructural. *Patología (Méx)* 10, 125-134.

Feria-Velasco,A; Treviño-García,MN; Ruiz de Chávez,I (1972): Mucopolisacáridos en el glicocálix de *Entamoeba histolytica*. Estudio citoquímico de alta resolución. *Arch Invest med (Mex)* 3(Suppl. 2), 303-310.

Field,M (1971): Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3',5'-AMP. *Am J Physiol* 221, 992-998.

Field,M (1974): Intestinal secretion. *Gastroenterology* 66, 1063-1084.

Field,M (1979): Intracellular mediators of secretion in the small intestine. In: *Mechanisms of intestinal secretion*. (Ed: Binder,HJ) Alan R Liss Inc, New York, 83-92.

Frizzell,RA; Koch,MJ; Schultz,SG (1976): Ion transport by rabbit colon. I. active and pasive components. *J Membrane Biol* 27, 297-316.

Frizzell,RA; Turnheim,K (1978): Ion transport by rabbit colon. II. Unidirectional sodium influx and the effects of amphotericin B and amiloride. *J Membrane Biol* 40, 193-211.

Gadasi,H; Kessler,E (1983): Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 39, 528-531.

Ghadirian,E; Kongshavn,PAL (1984): Genetic control of susceptibility of mice to infection with *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 74, 424-430.

Ghadirian,E; Meerovitch,E; Kongshavn,PAL (1983): Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect Immun* 42, 1017-1019.

Gil-Recasens,ME; Cats,S; Rosenstein,YJ; Cervera,J; Kretschmer,R (1982): Liberación in vitro de histamina leucocitaria provocada por antígeno amibiano y por concavalina en pacientes con amibiasis invasora. *Arch Invest med (Mex)* 13(Suppl. 3), 277-280.

Guerrant,RL; Brush,J; Ravdin,JI; Sullivan,JA; Mandell,GL (1981): Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 143, 83-93.

Hall,WJ; O'Regan,MG (1975): Effect of prostaglandin E1 and other factors on the electrical excitability of isolated frog skin (*Rana temporaria*). *Gen Pharmacol* 6, 151-154.

Halm,DR; Dawson,DC (1984): Potassium transport by turtle colon: active secretion and active absorption. *Am J Physiol* 246, C315-C322.

Handler,JS; Stoff,JS; Orloff,J (1973): Effect of aldosterone on cyclic-AMP metabolism in the urinary bladder of the toad. *Exp Eye Res* 16, 235-240.

Healy,GR; Cahill,KM; Elsdon-Dew,R; Juniper,K; Powell,SJ (1971): Panel discussion: the serology of amebiasis. *Bull NY Acad Med* 47, 494-507.

Jackson,TFHG; Duursma,J; Simjee,AE (1984): Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78, 342-345.

Jiménez-Delgadillo,BMG (1990): Caracterización de la autólisis de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Maestría en Ciencias Tesis, CINVESTAV-IPN. 98 p.

Kessel,JF; Lewis,WP; Kim,H (1961): Preliminary report on a hemagglutination test for *Entamoeba histolytica*. *Proc Soc Exp Biol Med* 106, 409-413.

Knight,R; Bird,RG; McAaul,TF (1974): Fine structural changes at *Entamoeba histolytica* rabbit kidney cell (RK 13) interface. *Ann Trop Med Parasitol* 69, 197-202.

Koefoed-Johnsen,V; Ussing,HH (1958): The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42, 298-308.

Kretschmer,R; Salinas-Carmona,MC; López-Osuna,M; Avila,ME (1980): Efecto de *Entamoeba histolytica* sobre la quimiotaxis de monocitos humanos. *Arch Invest med (Mex)* 11(Suppl. 1), 147-151.

Krupp,I (1970): Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 19, 57-62.

Kumate,J; Gutiérrez,G (1978): Amibiasis. In: *Manual de Infectología*. Sexta ed. (Ed: Hospital Infantil) Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México, 56-57.

López-Osuna,M; Contreras,BA; Kretschmer,R (1986): In vitro interaction of polymorphonuclear leucocytes and *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest med (Mex)* 17(Suppl. 1), 247-249.

López-Revilla,R; Said-Fernández,S (1980): Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am J Trop Med Hyg* 29, 209-212.

Lushbaugh,WB; Hofbauer,AF; Pittman,FE (1984): Relationship of cytotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence. *Gastroenterology* 86, 1488-1495.

Lushbaugh,WB; Kairalla,AB; Cantey,JR; Pittman,FE (1979): Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 139, 9-17.

Lynch,EC; Rosenberg,IM; Gitler,C (1982): An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *E.M.B.O.J.* 1, 801-804.

Martínez-Cairo,CS; Gorab,A; Muñoz,O; Reyes,M (1979): Coproanticuerpos en amibiasis intestinal. *Arch Invest med (Mex)* 10, 121-126.

Martínez-Palomo,A (1982): Cell Biology. In: *The Biology of Entamoeba histolytica*. (Ed: Martínez-Palomo,A) Research Studies Press, Chichister, 5-50.

Martínez-Palomo,A (1989): Biología de la Entamoeba histolytica. In: Amibiasis. 1st ed. (Ed: Martínez-Palomo,A) Editorial Médica Panamericana S.A., México, 17-41.

Mattern,CFT; Keister,DB; Caspar Natovitz,P (1980): Entamoeba histolytica 'toxin': fetuin neutralizable and lectin-like. Am J Trop Med Hyg 29, 26-30.

McGowan,K; Donowitz,M (1988): Secretagogues of entamoeba histolytica: Role in Diarrea. In: Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica. 1st ed. (Ed: Ravdin,JI) John Wiley & Sons, USA, 283-296.

McGowan,K; Guerina,V; Wicks,J; Donowitz,M (1985): Secretory hormones of Entamoeba histolytica. CIBA Found, Symp 112, 139-154.

McGowan,K; Kane,A; Asarkof,N; Wicks,J; Guerina,V; Kellum,J; Baron,S; Gintzler,AR; Donowitz,M (1983): Entamoeba histolytica causes intestinal secretion:role of serotonin. Science 221, 762-764.

McGowan,K; Piver,G; Stoff,JS; Donowitz,M (1990): Role of prostaglandins and calcium in the effects of Entamoeba histolytica on colonic electrolyte transport. Gastroenterology 98, 873-880.

Muñoz,ML; Calderón,J; Rojkind,M (1982): The collagenase of Entamoeba histolytica. J Exp Med 155, 42-51.

Muñoz-Espinosa,LE; Hernandez,MP; Salazar,OG; Cavazos,R; Silva,JB (1986): Serum or plasma levels of C3 factor H y C3d in patients with amebic liver abscess. Arch Invest med (Mex) 17(Suppl. 1), 297-301.

Neal,RA; Robinson,GL; Lewis,WP; Kessel,JF (1968): Comparison of clinical observations on patients infected with Entamoeba histolytica, with serological titers of their sera and virulence of the amoeba to rats. Trans R Soc Trop Med Hyg 62, 69-75.

Orozco,ME; Fernández-Castelo,S; Martínez-Palomo,A (1982): Detección del daño celular temprano producido por Entamoeba histolytica sobre epitelios. Arch Invest med (Mex) 13(Suppl. 3), 169-175.

Ortiz-Ortiz,L; Capín,R; Capín,NR; Sepúlveda,B; Zamacona,G (1978): Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clin Exp Immunol* 34, 10-18.

Ortiz-Ortiz,L; Zamacona,G; Sepúlveda,B; Capín,NR (1975): Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin Immunol Immunopathol* 4, 127-134.

O'Shea,S; Feria-Velasco,A (1974): Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. I. Por inmunofluorescencia con IgG humana específica. *Arch Invest med (Mex)* 5(Suppl. 2), 307-314.

Palmer,JM; Tamura,K; Wood,JD (1988): Electrical and synaptic properties of myenteric plexus neurons from guinea-pigs small intestine during infection with *Trichinella spiralis*. *FASEB J* 2, A325.

Pérez-Tamayo,R (1989): Patología de la amibiasis. In: *Amibiasis*. 1st ed. (Ed: Martínez-Palomo,A) Editorial Médica Panamericana S.A., México, 42-78.

Prasad,AK; Das,SR; Sagar,P (1982): Haemolysis: an in vitro model to investigate tissue necrotic activity of *Entamoeba histolytica*. *Indian J Exp Biol* 20, 721-725.

Prathap,K; Gilman,R (1970): The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. *Am J Pathol* 60, 229-245.

Ravdin,JI; Croft,BY; Guerrant,RL (1980): Citopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152, 377-390.

Ravdin,JI; Guerrant,RL (1982): A review of the parasite cellular mechanism involved in pathogenesis of amebiasis. *Rev Infect Dis* 4, 1185-1207.

Rosenbaum,RM; Wittner,M (1970): Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J Cell Biol* 45, 367-382.

Sandle,GI; Higgs,N; Crowe,P; Marsh,MN; Venkatesan,S; Peters,TJ (1990): Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 99, 97-105.

Sapirstein,VS; Scott,WN (1975): Binding of aldosterone by mitochondria-rich cells of toad urinary bladder. *Nature* 257, 241-243.

Scholze,H; Werries,E (1984): A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 11, 293-300.

Schultz,SG; Frizzell,RA; Nellans,HN (1977): Active sodium transport and the electrophysiology of rabbit colon. *J Membrane Biol* 33, 351-384.

Schultz,SG; Thompson,SM; Suzuki,Y (1981): On the mechanism of sodium entry across the apical membrane of rabbit colon. In: *Epithelial Ion and Water Transport*. (Eds: Macknight,ADC; Leader,JP) Raven Press, New York, 285-294.

Sepúlveda,B (1982): Amebiasis: Host-pathogen biology. *Rev Infect Dis* 4, 1247-1253.

Sepúlveda,B; Martínez-Palomo,A (1982): Immunology of amoebiasis by *Entamoeba histolytica*. In: *immunology of Parasitic Infections*. 2nd ed. (Eds: Cohen,S; Warren,KS) Blackwell, Oxford, 170-191.

Sepúlveda,B; Tanimoto-Weki,M; Calderón,P; de la Hoz,R (1974): Inducción de inmunidad pasiva antiamebiana en el hamster por la inyección de suero inmune. *Arch Invest med (Mex)* 5(Suppl. 2), 451-456.

Sharma,P; Krishna-Preasda,BN; Dutta,GP (1978): Coproantibodies in intestinal amoebiasis using axenic *Entamoeba histolytica* antigen. *Indian J Med Res* 68, 423-427.

Spooner,PM; Edelman,IS (1976): Effects of aldosterone on Na<sup>+</sup> transport in the toad bladder. I. Glycolysis and lactate production under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta* 444, 653-662.

Szulc,R; Knapowski,J (1975): The comparative evaluation of methoxiflurane and diethyl ether action upon an active sodium transport across isolated frog skin preparation. *Curr Probl Clin Biochem* 4, 135-139.



Takeuchi,A; Phillips,BP (1975): Electron microscopic studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. *Am J Trop Med Hyg* 24, 34-38.

Tantisira,MH; Jodal,M; Lundgren,O (1990): Effects of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin on intestinal alkaline secretion and transepithelial potential difference in rat intestines in vivo. *Scand J Gastroenterol* 25, 19-28.

Thompson,SM; Suzuki,Y; Schultz,SG (1981): Current-voltage properties of the active sodium transport pathway across rabbit colon. In: *Ion Transport by Epithelia*. (Ed: Schultz.SG) Raven Press, New York, 47-59.

Toswill,JHC; Ridley,DS; Warhust,DC (1980): Counterimmunoelectrophoresis as a rapid screening test for amebic liver abscess. *J Clin Pathol* 33, 33-35.

Triviño-García,MN; Feria-Velasco,A; Ruiz de Chávez,I; De la Torre,M (1971): Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest med (Mex)* 2(Suppl. 1), 179-186.

Trissl,D (1982): Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev Infect Dis* 4, 1154-1184.

Trissl,D; Müller,R; Ries,R; Rathman,M (1986): Anti-surface antibodies to *Entamoeba histolytica* and their role in complement lysis. *Resúmenes del X Seminario de Amibiasis*, 35.

Ussing,HH; Zerahn,K (1951): Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23, 110-127.

Vinayak,VK; Chitkara,NL (1976): Selective ability of *Entamoeba histolytica* to haemolyse red blood cells. A preliminary communication. *Indian J Med Res* 64, 1443-1445.

Vinayak,VK; Sawhney,S; Jain,P; Chugh,S; Naik,SR; Chakravarti,RN (1981): Virulence of *Entamoeba histolytica* in rat and its comparison with the serological responses of the amoebic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75, 32-37.

Vinayak,VK; Sawhney,S; Jain,P; Chugh,S; Naik,SR; Chakravarti,RN (1982): Immunosuppression and experimental amoebiasis in guinea pigs. *Ann Trop Med Parasitol* 76, 309-316.

Walsh,JA (1986): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8, 228-238.

Welsh,MJ; Smith,PL; Fromm,M; Frizzell,RA (1982): Crypts are the site of intestinal fluid secretion. *Science* 218, 1219-1221.

Wiesmann,WP; Sinha,S; Klahr,S (1976): Insulin stimulates active sodium transport in toad bladder by two mechanism. *Nature* 260, 546-547.

Wilkinson,DJ; Dawson,DC (1989): Cholinergic modulation of apical Na channels in turtle colon: current fluctuation analysis. *FASEB J* 4, A447.

Wood,AW; Tomlinson,RWS (1974): The effect of catecholamines on ion transport in the toad bladder. *Biochim Biophys Acta* 367, 375-384.

Young,JDE; Young,TM; Lu,LP; Unkeless,JC; Cohn,ZA (1982): Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 156, 1677-1690.