77

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

CAMPUS-IZTACALA

DIFERENCIAS EN EL ISOTIPO DE ANTICUERPOS ANTI *Entamoeba histolytica* INDUCIDO EN SUERO, E INTESTINO DELGADO Y GRUESO POR LA INMUNIZACION LOCAL Y SISTEMICA DE TROFOZOITOS FIJADOS CON GLUTARALDEHIDO EN RATON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALDO ARTURO RESENDIZ ALBOR

IZTACALA

ASESOR: DRA. LETICIA MORENO FIERROS.

MEXICO, D. F.

2000

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo en la Unidad de Morfología y Función de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus Iztacala, y en el Laboratorio 17 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, bajo la asesoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto CONACyT 07973453PN y UNAM DGAPA PAPIIT IN209198.

Durante parte de la realización de esta tesis el alumno fue becario de UNAM DGAPA PAPIIT IN209198.

"LOS AVANCES EN LA CIENCIA NO SON EN BENEFICIO DEL INVESTIGADOR; EL GRAN BENEFICIO ES PARA LA TODA LA HUMANIDAD"

Louis Pasteur.

"Vivir, siempre alegres"
Don Bosco.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por haberme aceptado en su laboratorio, por sus enseñanzas, consejos y regaños (que en realidad fueron muy pocos, pero que sinceramente debieron haber sido más). MIL GRACIAS por toda la motivación a continuar en este campo tan padrísimo que es la INVESTIGACIÓN.

Al Maestro en Ciencias David González Pantaleón, por haberme impartido mis primeras clases de Inmunología.

A la Q.F.B Gloria Luz Paniagua Contreras por su paciencia y por todo lo que aprendí en el Laboratorio de Análisis Clínicos. (Sobre todo a la hora del café).

Al Dr. Rafael Jiménez Flores y la M. en C. Martha Salcedo Alvarez por la revisión de este trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio: Nora, Angie, Mónica, Iván, Carmen, Rita; gracias por su apoyo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Análisis Clínicos: Marú, Erick y Susana; gracias mil.

Al Biólogo Luis Barbo Hernández Portilla, gracias por ser mi mejor amigo.

DEDICATORIAS

A mis padres: Don Fernando que siempre me apoyo en todo y a mi mamichi Lourdes por todo el cariño y amor. A ustedes les debo todo.(LOS QUIERO MUCHO). A mi abuelita ELISEA por sus tiernos regaños.

A mis hermanitas: Jenny que siempre ha tenido una palabra de aliento y por todas esas risas interminables y a Isabelita que a iluminado mi vida los últimos ocho años. SON UN AMOR.

A mis hermanos Fher y José Luis Albor gracias por todos esos momentos fuera de la Universidad, los conciertos, party's, etc... pero sobre todo porque siempre me han apoyado y han tenido un buen consejo. SON GENIALES BROTHERS.

A Katty gracias por todo el amor, que pena que no puedas estar conmigo.

A mi prima Claudia, mi tía Irma por todo el apoyo.

A mis grandes amigos de toda la vida: Octavio, Rafa, Manolo, Moya y al Padre Bernardo.

A todos los compañeros de-geración: Luis, Victor, Jorge, Alfredo, Chucho, Lalo, Paco Lalo, Alejandro, Miguel, Carlos, Manuel I y II, Francisco, Jeronimo, Ali, Toño, Mario, Sergio, Ramiro, Alberto, Sergio Pata, Danny, Norberto, Moy, Krusty, Lola, Edith, Xóchitl, Verónica, Adriana, Yolanda, Antonio, Leonor, Nelly, Raquel y todos los que faltan ! GRACIAS !

A los compañeros de la selección de Basketball: Pedro, Oscar, Joe, Agustín, Iván; Sofia, Ivonne, Mónica, Alejandra, Jessica; que me hicieron olvidar por momentos lo padre que es la investigación. Y sobre todo a ti Antalya que eres y espero que sigas siendo la amiga más linda de este planeta; gracias por esa amistad tan padre.

Y sigue, y sigue.....

CONTENIDO

PAGINA

CONTENIDO.....i
INDICE DE FIGURAS.....ii
INDICE DE TABLAS.....ii

RESUMEN..... 1
I.-INTRODUCCION..... 3
II.-ANTECEDENTES GENERALES 6
A.-BIOLOGÍA DE *Entamoeba histolytica*..... 6
Epidemiología.....7
Ciclo vital de *E. histolytica*..... 8
B.-MORFOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO..... 9
Mucosa.....9
Submucosa.....9
Muscular.....9
Serosa o adventicia.....10
C.-SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA..... 11
Sitios inductores y efectores de la mucosa.....12
D.-ORGANIZACIÓN.....13
Placas de Peyer.....13
Células M.....13
Células en Domo.....14
Folículos linfoides.....14
E.-ENTRADA DE ANTÍGENO EN EL ORGANISMO..... 16
Captación de Antígeno por espacios mucosos..... 16
Captación de Antígeno por el intestino.....17
F.-INMUNOGLOBULINA IgA.....19
Función.....19
Polimerización de IgA.....19
Componente secretor.....19
Propiedades de la región Fc.....20
Exclusión inmunitaria.....20
Producción de otras inmunoglobulinas en la mucosa.....21
III.-ANTECEDENTES DIRECTOS..... 22
IV.-JUSTIFICACION.....25
V.-OBJETIVOS.....26
4.1 Objetivo General.....26
4.2 Objetivos Particulares.....26
VI.-METODOLOGIA.....27
VII.-RESULTADOS..... 32
6.1 ELISA.....32
6.2 Inmunoblot 36
VIII.-DISCUSION.....44
IX.-CONCLUSIONES.....54
X.-BIBLIOGRAFIA..... 56
XI.- APENDICE METODOLOGICO..... 67

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Ciclo vital de ***Entamoeba histolytica***.....08

Fig 2. Capas de la pared intestinal y componentes inductor y efector de la inmunidad local.....10

Fig 3. El papel del MALT en la inducción de la respuesta de IgA en la mucosa.....15

Fig 4. Representación esquematica de una placa de Peyer y en detalle una célula M.....18

Fig 5. Diagrama de flujo.....31

Fig 6. Detección de anticuerpos anti-amiba por el método de ELISA en suero.....32

Fig 7. Detección de anticuerpos intestinales anti-amiba por el método de ELISA en intestino delgado.....33

Fig 8. Detección de anticuerpos intestinales anti-amiba por el método de ELISA en intestino grueso.....34

Fig 9. Detección de anticuerpos totales anti-amiba por el método de ELISA en suero, intestinos delgado y grueso.....35

Fig 10. Análisis por inmunoblot de anticuerpos totales, IgA, IgG e IgM anti- ***E. histolytica*** en muestras de suero de ratones inmunizados con TFG.....37

Fig 11. Análisis por inmunoblot de anticuerpos totales, IgG, IgA e IgM anti- ***E. histolytica*** en muestras de líquidos intestinales de intestino delgado de ratones inmunizados con TFG.....39

Fig 12. Análisis por inmunoblot de anticuerpos totales, IgG, IgA e IgM anti- ***E. histolytica*** en muestras de líquidos intestinales de intestino grueso de ratones inmunizados con TFG.....40

TABLAS

Tabla 1. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos sericos.....41

Tabla 2. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos de intestino delgado.....42

Tabla 3. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos de intestino grueso.....43

RESUMEN

En estudios previos se ha reportado que mediante la inmunización intraperitoneal, rectal e intragástrica con amibas fijadas con glutaraldehído (TFG) en ratones Balb/c, se producían respuestas de anticuerpos anti-amiba a nivel local y sistémico de los tres isotipos mayoritarios. Indicando que tanto la inmunización local como sistémica con TFG era posible obtener respuestas locales y sistémicas, aunque la magnitúd de dichas respuestas variaba dependiendo de la ruta de inmunización. Sin embargo debido a que el peritoneo es considerado como un sitio de inducción de respuestas inmunes mucosas en el presente trabajo incluímos la ruta intramuscular como una vía de inmunización estrictamente sistémica para determinar si era capaz de inducir respuestas inmunes intestinales. Además se evaluó la respuesta tanto en **intestino delgado** (ID) como en el **grueso** (IG) ya que en trabajos anteriores solo se había analizado la respuesta en ID. Se inmunizaron grupos de 5 ratones Balb/c machos por las vías **intramuscular** (IM), **intraperitoneal** (IP) **rectal** (R) y **oral** (O). Los animales recibieron cuatro dosis de 500,000 TFG, semanales y fueron sacrificados siete días después de la última inmunización. Se determinó por **ELISA** la respuesta de anticuerpos anti-amiba IgA, IgG e IgM y por **Inmunnoblot** la identificación de proteínas amibianas que fueron reconocidas inmunodominantemente por los isotipos antes mencionados en las muestras de suero y de contenidos intestinales. Los resultados del ELISA indican que en suero no existen diferencias en la magnitud de las respuestas de anticuerpos anti-amiba entre las rutas IM, IP y R no mostraron diferencias; cabe mencionar que en suero el isotipo predominante fue IgM seguido de IgG e IgA. Además se encontraron diferencias en el patrón de anticuerpos anti-amiba inducido en ID e IG. En IG no se observó el predominio de ningún anticuerpo, los tres isotipos inducidos presentaron niveles similares por las rutas de inmunización R, IP e IM. En ID la respuesta amibiana, si varió dependiendo de la ruta de inmunización; y el isotipo IgA fue el isotipo predominante; producido por rutas locales y sistémicas. Además se encontró que mediante la inmunización sistémica (IM) con TFG se inducen elevadas respuestas de anticuerpos anti-amiba, mayores que los inducidos por la vía O y menores que los producidos por las vías R e IP. El análisis por inmunotransferencia mostró que los sueros de los ratones inmunizados por las vías R, IP, IM y O reconocen un gran número de proteínas amibianas. Los pesos moleculares de las principales proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos séricos fueron 230-220, 190, 124, 84, 56 y un doblete de 25-24 kDa; este último es reconocido inmunodominantemente por IgG en la rutas R,IP e IM. El isotipo IgM reconoce de manera inmunodominante un triplete de 35.3, 34-33 kDa por las vías de inmunización R,IP,IM y O. El isotipo IgA reconoce preferentemente la zona de peso molecular de 240-57 kDa, remarcando que por la vía IM se reconocen intensamente dos bandas de 143,130 kDa. Además de que existen

diferencias entre los antígenos amibianos reconocidos de manera inmunodominante por anticuerpos IgA, IgG e IgM. En contraste los anticuerpos de líquidos intestinales de ID e IG, reconocieron un número menor de proteínas amibianas y con menor intensidad; comparandolos con la respuesta observada en suero. Así mismo, los anticuerpos de líquidos intestinales de ID e IG reconocieron el doblete de 25-24 kDa, por las vías IP,R e IM; que se reconoció también en suero. En el IG se reconocieron mayor numero de bandas y con mayor intensidad por el isotipo IgG en relación con el intestino delgado. En el ID se reconocen mayor cantidad de proteínas amibianas y con mayor intensidad, en el isotipo IgA con respecto al IG. Las diferencias observadas en la respuesta inmune entre ID e IG, por vías locales y sistémicas sugieren que existe una compartamentalización de los sitios efectores de la mucosa.

INTRODUCCIÓN

La tercera parte de las muertes que ocurren, a nivel mundial es causada por enfermedades infecciosas. Tres cuartas partes de estas muertes son causadas por infecciones diarreicas y respiratorias. Estas enfermedades son provocadas por la colonización y daño de las superficies mucosas.

Las superficies mucosas, constituyen la principal ruta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos, vírales, bacterianos o parasitarios. El concepto del sistema inmune común de mucosas explica la observación de que una respuesta inmune originada en una superficie mucosa, resulta en una fuerte respuesta no sólo en el sitio de estimulación, sino tambien en las superficies mucosas distantes, y ésta respuesta no necesariamente está ligada con una fuerte respuesta inmune humoral sistémica (Mestecky,1994). En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a mucosas puede dividirse en tres compartimentos: agregados linfoides organizados como son las **placas de Peyer (PP)** y los folículos linfoides aislados, tejido linfoide difuso (**lámina propia**) y **linfocitos intraepiteliales**. Se cree que la estimulación de la inmunidad en las superficies mucosas ocurre en los agregados especializados de tejido linfoide denominados colectivamente tejido linfoide asociado a los bronquios (**BALT**) y tejido linfoide asociado al intestino (**GALT**). Una característica exclusiva de los sitios inductores **BALT** y **GALT**, es la de comunicar la información inmunogénica que surge en una superficie mucosa a otras superficies mucosas del cuerpo. De esta forma, por la estimulación antigénica de las PP, las celulas B precursoras de IgA y celulas T activadas, pueden diseminarse hacia los sitios efectores, constituidos por la lámina propia de los tractos intestinales, respiratorios y genitourinarios, y por las glándulas secretorias (Biewenga,1993;Miller,1992). Si se modulan exitosamente el **BALT** y el **GALT** pueden conferir inmunidad tanto mucosa como sistémica contra una gran variedad de patógenos y toxinas.

Es necesario desarrollar estrategias que permitan obtener **respuestas inmunes** protectoras en las superficies mucosas de los tractos **gastrointestinal**, **respiratorio** y **genitourinario**. La ruta de administración de la mayoría de las vacunas existentes es parenteral, sin embargo, por estas vías normalmente no se logran obtener buenas respuestas en las superficies mucosas.

Recientemente se han desarrollado diversas estrategias para optimizar las respuestas con vacunas orales entre las que se incluyen la conjugación química, el acoplamiento de antígenos a la toxina del cólera o a sus subunidades, la inmunización con bacterias, virus y plantas recombinantes, el uso de adyuvantes, avances tecnológicos en el empaquetamiento de antígenos como las microesferas biodegradables y los **ISCOMS**, sistemas de administración de antígeno preparados de polimeros naturales y sintéticos y la incorporación de antígeno a liposomas (Mestecky,1994; Kagnoff,1996). Sin embargo, no se ha utilizado el entrecruzamiento con glutaraldehído de antígenos para la inducción de respuestas inmunes en mucosas.

La eficacia de la inducción de la respuesta inmune en mucosas depende de la interrelación entre las propiedades fisicoquímicas del antígeno, con el ambiente gastrointestinal, además la presencia de adyuvantes y la forma de administración (Shalaby,1995). Los mecanismos que determinan la inmunogenicidad de las proteínas en las superficies mucosas no son claros. En general se ha observado que los microorganismos vivos, debido a su capacidad de adherirse a las superficies mucosas, son mejores inmunógenos que los antígenos bacterianos o virales muertos. Además la mayoría de los antígenos solubles, excluyendo a la toxina de cólera, son menos efectivos que los partículados para la inducción de la respuesta inmune en mucosas. Este fenómeno se atribuye a diferentes rutas de entrada del antígeno y a diferencias subsecuentes en los tipos celulares involucrados en el procesamiento del mismo. Los antígenos partículados pueden ser captados por las células M, especializadas en la captación de antígeno, del epitelio que recubre a las **PP**, y en el interior de la placa ser procesados por macrófagos y células dendríticas (Biewenga,1993). Por lo cual, en este proyecto se utilizo como inmunógeno, **amibas fijadas con glutaraldehído (TFG)** en vez de extractos amibianos solubles, ya que la fijación además de mantener a las amibas en forma particulada, evita la degradación gastrica (Moreno-Fierros,1994). En cambio los antígenos solubles administrados por vía oral, inducen tolerancia en vez de respuesta, lo cual se asocia a la degradación por las enzimas digestivas solo pueden captarse péptidos, o a una captación menos eficiente por las **PP** y en cambio una captación por las microvellosidades hacia la lámina propia. En este último compartimento los antígenos son procesados principalmente por los abundantes macrófagos que tienen un efecto supresor (Biewenga,1993). La comprensión de como estos

factores alteran la inmunogenicidad de un antígeno en particular será critica para la optimización de la estimulación de la respuesta inmune en mucosas. Recientemente se ha considerado que las células epiteliales que recubren a las superficies mucosas, podrían considerarse células presentadoras de antígeno por su capacidad de captar antígenos solubles, presentarlos y activar células T CD 8+ (Kagnoff,1996).

ANTECEDENTES GENERALES

BIOLOGÍA DE *Entamoeba histolytica.*

Las amibas son microorganismos primarios unicelulares. Su ciclo de vida es relativamente simple y consta de dos fases: en la primera, el parásito desarrolla su metabolismo nutritivo y presenta una motilidad activa (**trofozoíto**); la segunda es la fase infectiva, de resistencia e inactividad (**quiste**). La replicación se produce por fisión binaria; ruptura del trofozoíto o por el desarrollo de numerosos trofozoítos en el interior de los quistes maduros multinucleados. La motilidad de las amibas se realiza mediante la extensión de un **seudópodo** con la extrusión del ectoplasma celular y posterior avance del resto de la célula. Los trofozoítos amibianos permanecen activos mientras el medio ambiente sea favorable. La forma quística se desarrollará cuando desciendan la temperatura medioambiental o el nivel de la humedad (Murray, 1992).

La mayoría de las amibas que se encuentran en el hombre son organismos comensales. Sin embargo, ***E. histolytica***, es un patógeno que afecta en gran medida al ser humano.

Fisiología microbiana y estructura: Las heces de las personas infectadas presentan trofozoítos y quistes, también se pueden hallar trofozoítos en las criptas del intestino grueso. En heces líquidas pueden aparecer los trofozoítos con motilidad activa, mientras que en las heces formes los quistes suelen ser la única forma parasitaria detectada.

Patogenía: Tras la ingestión, los quistes pasan a través del estómago, donde la exposición al ácido gástrico estimula la liberación de los trofozoítos patógenos en el duodeno. El trofozoíto se divide y produce una extensa necrosis local en el intestino grueso. El fundamento de esta destrucción no se ha explicado completamente, aunque se atribuye a la producción de una citotoxina. La necrosis requiere del contacto directo con la amiba, de modo que las enzimas lisosomales (fosfolipasa A2) pueden desempeñar un papel importante. Las ulceraciones en forma de matraz de la mucosa intestinal se presentan junto con una inflamación, hemorragía e infección bacteriana secundaria. Se puede producir una

invasión de la mucosa profunda con extensión a la cavidad peritoneal (Fig 1). Otros órganos a los que puede afectar secundariamente, por lo general son el hígado, aunque también pueden hacerlo los pulmones, el cerebro y el corazón (Murray, 1992).

Los pacientes infectados con ***E. histolytica*** eliminan en sus heces trofozoítos no infecciosos junto con quistes, que sí son infecciosos. Los trofozoítos no pueden sobrevivir en el medio ambiente externo, ni tampoco al pasar por el estómago cuando son ingeridos. Por tanto, el foco principal de contaminación del agua y de los alimentos es el portador asintomático que libera quistes en sus deposiciones.

Epidemiología: La amibiasis es definida como una infección producida por el protozoario parásito *E. histolytica,* el cual se ha estimado que infecta aproximadamente a 500 millones de personas anualmente en el mundo (Walsh, 1986) y solamente cerca del 10% de éstas desarrolla la enfermedad sintomática en la forma de disentería amibiana, absceso hepático amibiano, ameboma, colitis ulcerativa amibiana, apendicitis amibiana y otras manifestaciones poco frecuentes, como infecciones cutáneas, pulmonares y cerebrales (García-Manzo, 1990).

La amibiasis invasiva produce entre 40 mil y 110 mil muertes por año, siendo la tercera causa de muertes por infecciones de parásitos después de malaria y schistosomiasis (Walsh, 1986). La amibiasis en México es un problema de salud pública cuyas complicaciones afectan en mayor proporción a sujetos del sexo masculino, con mayor frecuencia en edades de los 20-50 años, es decir, en la etapa más productiva de sus vidas (Cerecedo, 1996). Sin embargo, en los niños reviste una mayor gravedad, con una tasa de mortalidad que alcanzaba 26.9% hasta antes de 1970 y que para 1983 se redujo alrededor de 2% (Gómez, 1995). La amibiasis es una parasitosis frecuente en nuestro medio, se ha evaluado que del 27-30% de la población se encuentra infectada, se calcula que el 1% de ellos muere anualmente a causa de la enfermedad. Su presencia esta directamente relacionada con la higiene y la contaminación fecal del agua y los alimentos (Tay, 1996).

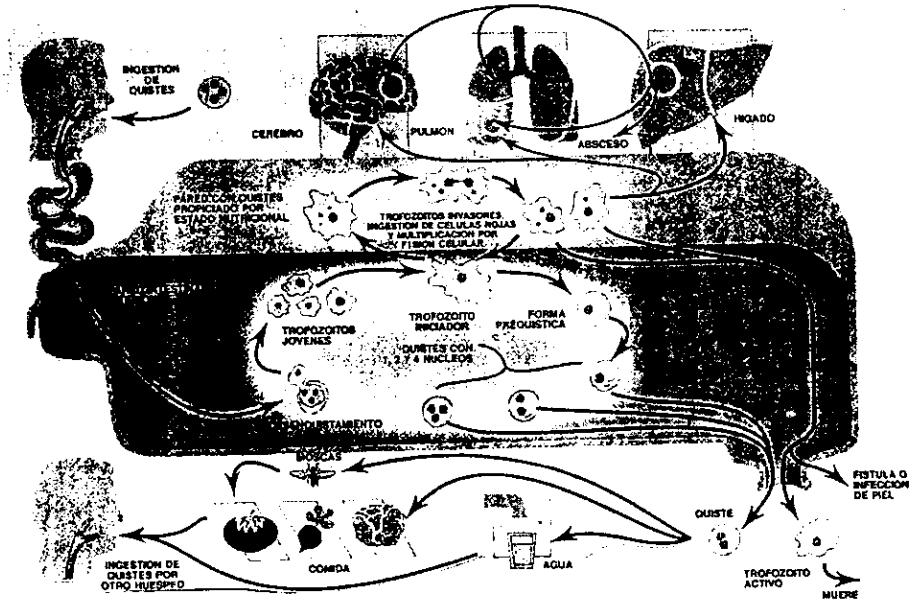

Fig 1. Ciclo vital de ***Entamoeba histolytica:*** los quistes son ingeridos por vía oral y se desenquistan en el íleon terminal; los trofozoítos formados invaden la pared del intestino grueso y generan úlceras. La invasión puede extenderse a otros órganos como el hígado, pulmón y cerebro. El enquistamiento de los trofozoítos ocurre en la luz del intestino grueso y puede eliminarse por las heces, que a su vez, contaminan el agua o los alimentos y son ingeridos por otro huésped.

MORFOLOGIA DEL TUBO DIGESTIVO

Aunque el tubo digestivo esta formado básicamente por cuatro regiones principales (esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso) separados entre sí por válvulas o esfínteres musculares, todos muestran cuatro capas características.

a) Mucosa: Esta formada de tres capas, 1) Una membrana epitelial superficial húmeda, lubricada por moco y que descansa sobre una lámina basal. 2) Una capa subyacente de tejido conectivo areolar laxo de sostén (lámina propia). 3) Una capa externa delgada de músculo liso (muscularis mucosae), dispuesta por lo general en dos estratos, uno interno circular y otro externo longitudinal.

En la lámina propia se encuentran abundantes capilares sanguíneos y linfáticos hacia los cuales pasan las sustancias alimenticias absorbidas. La mucosa produce anticuerpos, en especial IgA, como respuesta a antígenos y microorganismos que se encuentran en la luz del intestino. También pueden encontrarse grandes masas linfáticas dispersas en la submucosa, el tejido linfático difuso de la lámina propia se encuentra en el estómago y los intestinos, sus células que se identifican son: linfocitos, células plásmaticas y macrófagos y con frecuencia eosinófilos y células cebadas. La IgA y otros anticuerpos producidos en estas células se unen a una proteína secretada por las células epiteliales de la superficie mucosa (fragmento secretor) y pasan hacia la luz para combinarse con antígenos.

b) Submucosa: Esta formada por una trama de tejido conectivo aerolar con fibras elásticas muy notables. Permite la movilidad de la mucosa y contiene plexos de vasos sanguíneos mayores y nervios con algunas células ganglionares parasimpáticas amielínicas con algunas fibras preganglionares parasimpáticas del nervio vago. Este conjunto se denomina plexo submucoso de Meissner.

c) Muscular: Esta constituida de por lo menos de dos capas de fibras musculares lisas aunque las hay estriadas en la parte superior del esófago y en el esfínter anal. El músculo se dispone en una capa circular interna y una longitud externa (Ham,1975; Lesson,1987).

d) Serosa o adventicia: Es la capa más extensa y esta formada por tejido conectivo areolar relativamente denso y elástico. Con frecuencia se mezcla con tejido conectivo y se le llama adventicia, en otras regiones esta cubierta por peritoneo y se le llama serosa.(Fig.2)

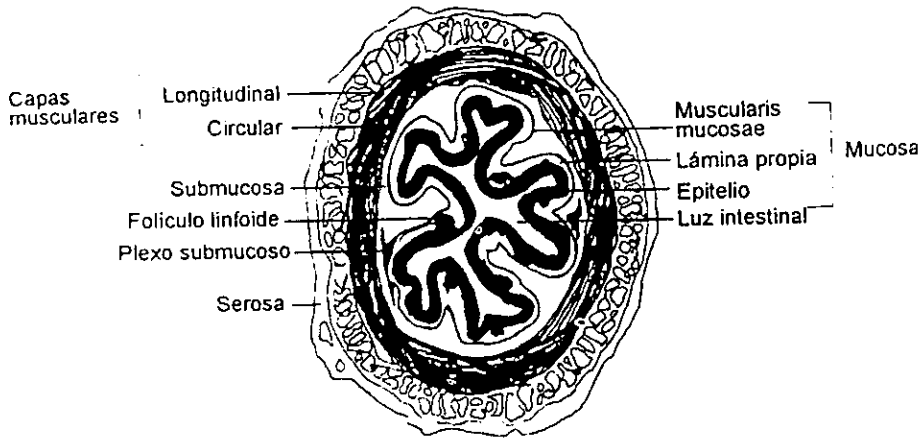

Fig 2. Capas de la pared intestinal y componentes inductor y efector de la inmunidad local. El tubo digestivo está formado por varias capas; la más interna es la mucosa, y determina la luz o espacio donde se encuentra el contenido intestinal; la más extensa es la serosa capa lisa y brillante formada por el peritoneo. La mucosa está formada por una sola capa de células epiteliales; por debajo de ella se encuentra la lámina propia, con un buen número de células maduras "efectoras" del sistema inmune de las mucosas, que se encargan de la defensa contra las infecciones causadas por agentes que penetran vía oral. Bajo la lámina propia se encuentra la capa submucosa y envolviendo a ésta se encuentra la capa muscular, formada por músculo liso responsable del peristaltismo. (Lesson, 1987)

SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA.

El sistema inmunitario de las mucosas se compone de tejidos linfoides esparcidos en las superficies mucosas del aparato digestivo, respiratorio y urogenital. Ha evolucionado bajo la influencia del ordenamiento antigénico complejo y característico que existe en áreas mucosas, y puede distinguirse del sistema inmune general por una serie de características particulares que son: 1) una inmunoglobulina relacionada con la mucosa, IgA; 2) un complejo de células T con propiedades reguladoras o capacidades efectoras específicas de mucosas y 3) un sistema de tráfico celular orientado a la mucosa para células inducidas de manera primaria en los folículos mucosos, para emigrar a tejidos linfoides mucosos difusos subyacentes al epitelio. Esta última característica ocasiona la segregación parcial de las células de la mucosa de las demás células inmunitarias sistémicas.

La función primaria del sistema inmune de la mucosa es la de proporcionar defensa al huésped a nivel de superficies mucosas. En esta función opera en combinación con varias barreras protectoras no inmunitarias, como a) flora bacteriana residente que inhibe la proliferación de patógenos; b) actividad motora de la mucosa (peristalsis y función ciliar) que mantiene la circulación de constituyentes mucosos, reduciendo la interacción de patógenos potenciales con las células epiteliales; c) sustancias como el ácido gástrico y sales biliares intestinales, que crean un microambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos; d) secreciones mucosas (glucocáliz) que forman una barrera entre patógenos potenciales y superficies epiteliales y, por último e) sustancias como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozimas que tienen efectos inhibidores sobre microorganismos específicos. La defensa óptima del individuo en la superficie mucosa depende por igual de respuestas inmunitarias de las mucosas intactas y de funciones protectoras no inmunitarias.

Una segunda función, de igual importancia del sistema inmune de la mucosa, es la de prevenir la entrada de antígenos a la mucosa y su paso a través de ella protegiendo así al sistema inmunitario general de una exposición antigénica inapropiada. Esto ocurre en la superficie mucosa, para evitar la entrada de materiales con potencial antigénico, y en la

circulación para depurar los antígenos por vía de eliminación hepática. Además el sistema inmune de la mucosa contiene células T reguladoras que controlan al disminuir las respuestas inmunes sistémicas a antígenos, que entraron en la barrera mucosa (Strober, 1988).

SITIOS INDUCTORES Y EFECTORES DE LA MUCOSA.

El sistema inmune de la mucosa puede dividirse en sitios donde el antígeno es encontrado y donde se induce una respuesta inicial (sitios inductores) y en áreas de superficie, donde se encuentran células plasmaticas y linfocitos T citotóxicos, y donde la producción de anticuerpos IgA secretores (S-IgA) resultan en una protección inmune local (sitios efectores) (Fig. 3). En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a mucosas puede dividirse en tres compartimentos: agregados linfoides organizados como son las **placas de Peyer (PP):** y los folículos linfoides aislados, tejido linfoide difuso (**lámina propia**) y **linfocitos intraepiteliales**. Se cree que la estimulación de la inmunidad en las superficies mucosas ocurre en los agregados especializados de tejido linfoide denominados colectivamente tejido linfoide asociado a los bronquios (**BALT**) y tejido linfoide asociado al intestino (**GALT**). Una característica exclusiva de los sitios inductores **BALT** y **GALT**, es la de comunicar la información inmunogénica que surge en una superficie mucosa a otras superficies mucosas del cuerpo. De esta forma, por la estimulación antigénica de las PP, las celulas B precursoras de IgA y celulas T activadas, pueden diseminarse hacia los sitios efectores, constituidos por la lámina propia de los tractos intestinales, respiratorios y genitourinarios, y por las glándulas secretorias (Biewenga,1993;Miller,1992). Si se modulan exitosamente el **BALT** y el **GALT** pueden conferir inmunidad tanto mucosa como sistémica contra una gran variedad de patógenos y toxinas. (Fig.3)

Placas de Peyer: Se trata de zonas especializadas de tejido linfoide en el tubo digestivo, que aparecen en el íleon. En animales de experimentación, las placas de Peyer son el principal lugar de entrada de antígeno dentro del sistema inmunitario mucoso. La incorporación del antígeno es realizada por las células M, que son células transportadoras de antígeno dentro del epitelio que cubre la cúpula de la placa de Peyer. Los procesos de las células M están ligados estrechamente a las células T_H subyacentes, de manera que dentro de la placa de Peyer existe sensibilización de linfocitos T y B. Además hay una subpoblación de células T conocida como células "switch", que controlan la diferenciación isotípica de las células B. Esto asegura que las células B que abandonan la placa de Peyer están ya previamente comprometidas a diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA cuando regresen a la lámina propia intestinal después de llegar a la circulación sistémica. De esta forma, la lámina propia se puebla con células T y B sensibilizadas a los antígenos intestinales. El mecanismo implicado en la localización selectiva depende de la interacción entre moléculas complementarias en el linfocito y en la célula endotelial local (Roitt,1994).

Células M: Son células epiteliales aplanadas que se caracterizan por bordes en cepillo poco desarrollados, glucocáliz delgado y un citoplasma rico en vesículas pinocíticas, pero que carece de la maquinaria proteolítica típica de células epiteliales para absorción. El transporte del antígeno por las células M consiste de: fijación inicial a la superficie de esta célula, captación en vesículas pinocíticas, transporte vesicular a través del cuerpo de la célula y por último, liberación de material en forma no degradada al área subepitelial. Esta forma de transporte es aplicable a partículas (virus, bacterias y protozoarios), además de proteínas solubles. Existen pruebas de que el transporte de bacterias por células M es inhibido por anticuerpos específicos, que interactúan con determinantes bacterianos necesarios para la fijación a la célula M. Este hecho explica por qué las células M no captan microorganismos residentes. La capacidad de captación de la célula M puede tener impacto sobre la virulencia de un microorganismo, por ejemplo la fijación y captación de un virus puede ser un medio obligado de entrada del microorganismo y, por lo tanto, un factor positivo de virulencia, en tanto que la

captación que conduce a la formación de anticuerpo y eliminación inmunitaria del invasor es un factor negativo en su virulencia (Sneller,M;1986).

Células en el domo: El área debajo del epitelio de los agregados linfoides (domo o boveda) es rica en células portadoras de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (macrófagos, células dendríticas, células B) y, por lo tanto, abundan las células capaces de presentar antígeno después de la exposición. Por esta razón, cualquier falta de respuesta después de la administración oral del antígeno no se debe a la carencia de células presentadoras de antígeno en los agregados linfoides mucosos. Las áreas del domo contienen también numerosas células T, aunque la mayoría de ellas tienen receptores CD4, cierto número carece de CD4 y CD8.

Folículos linfoides: Bajo el área en domo se encuentra la zona folicular que contiene los centros germinales, en esta región predominan los linfocitos B, aunque también existen células T esparcidas. Como en otros centros germinales, las células B están muy diferenciadas y portan IgD de superficie; no obstante, al contrario de linfocitos B de estos centros germinales, una gran fracción tiene IgA de superficie. Así, los agregados linfoides del sistema inmunitario mucoso forman el sitio de desarrollo de células B IgA, pero el folículo mucoso sobresale por la ausencia de células B IgA en etapa terminal de diferenciación (células plasmáticas IgA), quizá debido a que estas células abandonan el folículo antes de llegar a células plasmáticas.

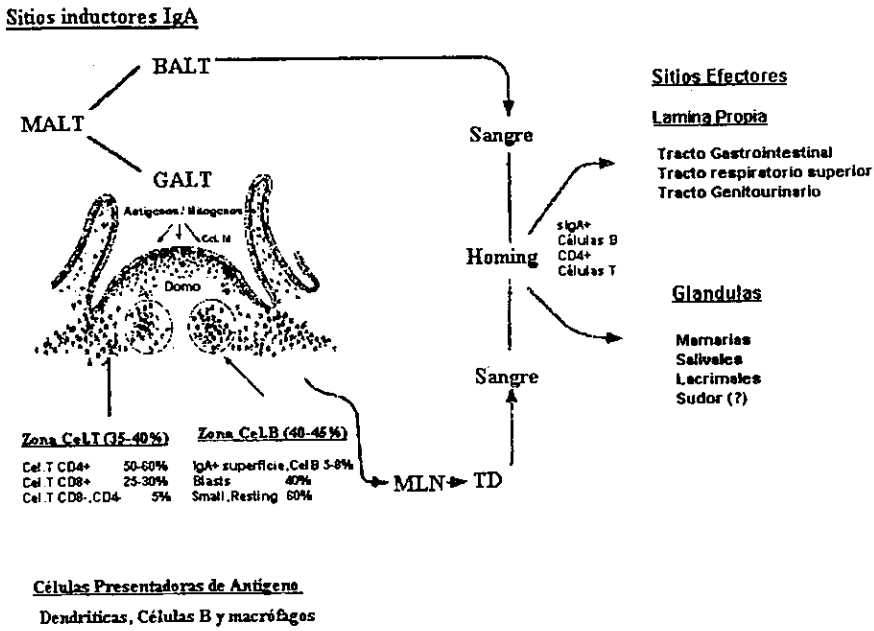

Fig 3. El papel del MALT en la inducción de la respuesta de IgA en la mucosa. El antígeno es captado por las células M en el GALT y BALT (MALT) y resulta en la inducción inicial de la respuesta inmune. El antígeno sensibilizado, precursor de células B sIgA+ y células Th CD4+ vía linfaticos eferentes, emigra a nódulos linfoides mesentericos (MLN) y dentro del ducto toracico (TD) se extiende a la corriente sanguínea. Esta migración de células entre los sitios efectores de IgA donde ocurre el transporte, sintesis y diferenciación terminal de S-IgA. Esta inducción en el MALT y la migración de células en los sitios efectores se denomina como "Sistema inmune común de mucosas". (Miller, 1992)

ENTRADA DE ANTIGENO EN EL ORGANISMO.

El epitelio de la piel y de las membranas mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital representan una gran área de superficie. Estos están constantemente expuestos a una gran variedad de microorganismos y otras substancias antígenicas. En las membranas mucosas que son sólo cubiertas por un escaso epitelio especializado, otros mecanismos semejantes a una función ciliar y factores antimicrobiales (mucinas y lisosimas) son encargadas en prevenir y combatir infecciones. Además, reacciones inmunes específicas juegan un papel importante. La característica de la inmunidad específica de la mucosa es la producción y acción de la IgA secretora, que manifiesta estas funciones en el espacio mucoso. Aquí el epitelio de la piel y las membranas mucosas son primariamente ocupadas en la exclusión del antígeno; y solo bajo condiciones patológicas (infecciones, heridas) existe un libre intercambio entre el medio ambiente interno y externo (Sminia.T,1989).

CAPTACÍON DE ANTIGENO POR ESPACIOS MUCOSOS.

Como se menciono la estructura de los espacios mucosos (uniones estrechas del epitelio y una capa de moco) son importantes en la exclusión del antígeno. Algunas macromoleculas se muestran en traspasar esta barrera por endocitosis. Granulocitos, macrofagos y células plasmaticas en la lámina propia interactúan con estos antígenos absorbidos, de éste modo forman una barrera secundaria de defensa contra la penetración de antígenos intraluminares en la circulación. Ciertas enfermedades o estados alterados (malnutrición, deficiencia en la vitamina A, alergia, disminución de la ácides gastrica) pueden permitir el aumento en la cantidad del transporte macromolecular. En adición a la barrera epitelial de la mucosa los espacios externos contienen una alta proporción de células linfoides y linfocitos intraepiteliales (LIE). Estas células son localizadas principalmente en el área basal del epitelio y llevan marcadores para células supresoras T citotóxicas y células T asesinas. En el intestino y los bronquios existe un sistema especializado en el transporte de antígeno que permite el transporte eficiente de

macromoleculas del lúmen, al tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). El epitelio cubierto por este tejido linfoide contiene un tipo especial de células epiteliales, llamadas células M que se encargan en particular en la captación de antígeno (Richman.L,1981)

CAPTACIÓN DE ANTIGENO POR EL INTESTINO

El intestino está constantemente expuesto a largas dosis de antígenos solubles y partículados. Aunque el intestino es altamente impermeable este posee un mecanismo especializado de transporte antigenico en las placas de Peyer (PP) y probablemente también en el epitelio velloso. La captación de proteínas marcadas, bacterias y partículas abióticas (latex) por las PP y por los folículos linfoides en las otras partes del intestino, incluido el apéndice, es bien conocido. El GALT es separado del lúmen intestinal por una simple capa de epitelio columnar, en el cuál se encuentran las células M. A la luz del microscopio estos niveles de células sólo pueden ser reconocidas por una estrecha asociación con los linfocitos intraepiteliales. Estás difieren del resto de las células epiteliales sin moco en aspectos histoquímicos y ultraestructurales. En ciertas secciones, las células M se pueden ver como un contorno del citoplasma apical formando un puente entre el espacio de las células epiteliales adyacentes (enterocitos). Las células M forman una especie de sombrilla dentro del espacio en el cuál los linfocitos y macrófagos son presentados como células dendriticas (Fig.4). El antígeno es absorbido en el lado apical de las células M; la absorción puede ser auxiliada por la ausencia de la "capa vellosa" y la falta de células con moco (goblet) del epitelio de las PP. Seguida de la absorción, el antígeno es endocitado y transportado dentro de las vesículas a la membrana celular lateral; por fusión el antígeno es liberado dentro del espacio lateral donde se pone en contacto con linfocitos y macrófagos/células dendriticas. Durante está ruta intracelular el sistema lisosomal es evitado, aquí el antígeno no sufre cambios biológicos y antígenicos durante el transporte del lumen intestinal a el tejido linfoide. En el lado lateral y basal de las células M, el antígeno es seleccionado arriba por macrófagos/células dendriticas y presentado a los linfocitos locales y transportado a él área de las células T interfoliculares de las PP o en los nódulos linfoides mesentericos donde el antígeno es presentado por las células interdigitales (IDC;

Fig 4). Esto sugiere que este antígeno presentado por las IDC se deriva de los macrófagos/células dendriticas que tienen seleccionado el antígeno en el interior del epitelio.

Esto indica que la captación de antígeno por las células M en el epitelio de las PP induce respuesta inmune local de IgA. Sugiriendo que parte de los antígenos intestinales (en particular antígenos solubles de bajo peso molecular) son absorbidos por los enterocitos del epitelio velloso. Los enterocitos, en particular los del intestino delgado expresan moleculas de histocompatibilidad clase II (MHC II) y se tiene demostrado que estas células son capaces de presentar antígenos. Estas indicaciones de que la presentación de antígenos por los enterocitos encabeza la generación de antígenos no específicos en células T supresoras que son envueltas en una supresión sistémica y una inducción de tolerancia. Estos hallazgos tienen implicaciones significantes en la respuesta inmune local intestinal y pueden explicar el fenómeno pobremente comprendido de la tolerancia oral y la supresión sistémica (Sminia.T,1989).

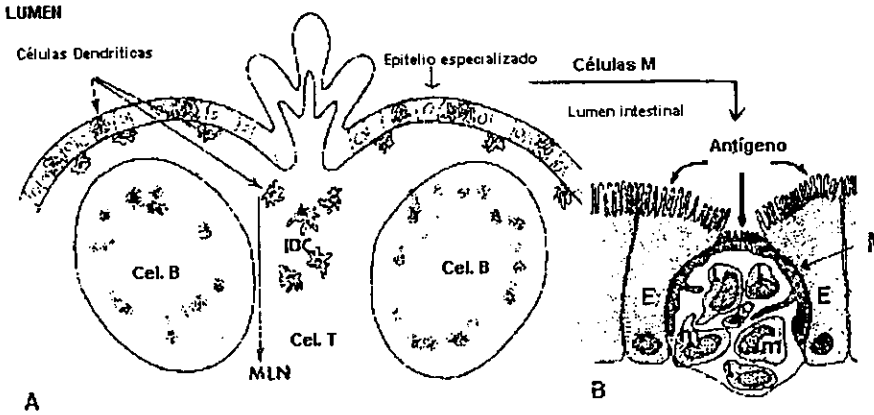

Fig 4. Representación esquematica de una placa de Peyer (A) y en detalle una célula M en el interior del epitelio de una placa de Peyer (B). Después de la captación y transporte transcelular por las células M, el antígeno es procesado por macrófagos/células dendriticas positivas Ia en el cuál (transformado dentro de las células interdigitales, IDC) presentan el antígeno en las áreas de las células T de los linfocitos de las placas de Peyer y nódulos linfoides mesénticos (MLN).
E: enterocito; L: linfocito; m: macrofago/célula dendritica. (Sminia, 1989)

INMUNOGLOBULINA IgA

La función central de IgA en la respuesta inmunitaria es una de las características distintivas del sistema inmunitario de las mucosas. Se basa en el hecho de que la IgA tiene varias propiedades que le permiten funcionar con mayor eficiencia que otras inmunoglobulinas en el espacio mucoso.

La IgA es, desde el punto de cuantitativo, la más importante de las inmunoglobulinas, con un índice de síntesis que excede al de las demás inmunoglobulinas combinadas, cuando se toman en cuenta la IgA secretora y la circulante.

POLIMERIZACIÓN DE IgA.

La cadena pesada de IgA en común con la cadena de IgM, presenta un residuo extra de cisteina en su dominio carboxilo terminal. Este dominio permite a la IgA interactuar con una molécula bivalente o multivalente, producida también por las células B, que es conocida como cadena J para formar dímeros y trímeros de IgA. Esta polimerización es importante para su función debido a que los polímeros de IgA (pIgA) tienen una capacidad mayor para unirse a los antígenos y aglutinarlos.

COMPONENTE SECRETOR.

Sólo la IgA dimérica puede reaccionar con el componente secretor, una proteína producida por las células epiteliales. El componente secretor actúa como un receptor de transporte para la IgA y se convierte en parte de la molécula IgA secretada; hace a la molécula inmunoglobulínica menos susceptible a la digestión proteolítica y más mucofílica, incrementando así su capacidad para interactuar con patógenos potenciales y para impedir su adherencia a la superficie epitelial. Además, la región de la bisagra de IgA contiene una zona glucosilada rica en prolina que generalmente es más resistente que IgG a la proteólisis por las proteasas de mamíferos. Sobre esta base, la supervivencia de IgA es mayor en la luz intestinal que la de IgG y de otras inmunoglobulinas.

PROPIEDADES DE LA REGIÓN Fc.

El dominio Fc de IgA se caracteriza por ciertas propiedades únicas, tanto positivas como negativas. Al contrario de la región Fc de IgM e IgG, la de la inmunoglobulina IgA no reacciona con los componentes de la vía clásica y alterna del complemento, quizá excepto cuando está muy polimerizada o en forma de complejo inmunitario; inclusive en el último caso no se une a C3b y, por lo tanto, no recluta células inflamatorias ni mediadores. Además, aunque la IgA facilita la fagocitosis y otras funciones de células fagocitarias en presencia de antígeno específico, en realidad regula disminuyendo la fagocitosis, en ausencia de antígeno.

Esto sugiere que la IgA libre tiene efectos antiinflamatorios. Desde luego esta es una propiedad muy útil en un área del cuerpo que esta repleta de materiales que pueden inducir respuestas inflamatorias excesivas,

La IgA tiene también ciertas características proinflamatorias. Su región Fc se une a lactoferrina y lactoperoxidasa y, por lo tanto, aumenta la función de estos elementos defensivos inespecíficos. Además, se tienen pruebas de que IgA puede interactuar por medio de su región Fc con receptores para este fragmento, para mediar reacciones citotóxicas celulares dependientes de anticuerpo.

EXCLUSIÓN INMUNITARIA.

La propiedad de IgA de experimentar transporte mediado por el componente secretor o por otros mecanismos de depuración, facilita el proceso de exclusión inmunitaria, donde el sistema inmunitario mucoso previene la entrada de moléculas antigénicas que provocarían respuestas inmunitarias nocivas potenciales. Primero las moléculas de IgA que llegan a las secreciones por transporte mediado por el componente secretor pueden unirse a antígenos en la superficie mucosa de modo que quedan atrapados en la capa de moco, para ser degradados por proteasas antes de fijarse y ser captados por las células epiteliales (Underdown B.J., 1986).

PRODUCCIÓN DE OTRAS INMUNOGLOBULINAS EN LA MUCOSA.

Es probable que otras inmunoglobulinas actúen también en el sistema inmunitario de las mucosas. La síntesis en la mucosa de IgM, que puede ser transportada a través de la célula epitelial por un mecanismo mediado por el componente secretor, es medible y tiene importancia fisiológica. Su capacidad para actuar como inmunoglobulina se nota por el hecho de que, en general, reemplaza apropiadamente a la IgA para producir inmunidad mucosa en personas con deficiencia selectiva de IgA. Por otra parte, la síntesis en la mucosa de IgG es bastante baja en la mayor parte de esas áreas y no puede transportarse a través del epitelio. No obstante, tiene una función en la mucosa. Se sintetiza en cantidad significativa en vías pulmonares a las que llega por difusión pasiva. La IgE también se sintetiza en tejidos mucosos, en particular durante infección parasitaria o en ciertos estados patológicos (alérgicos). Sin embargo, no existe localización preferencial de células B IgE en la mucosa, y el número de estas células que sintetizan IgE es pequeño, igual que en otros tejidos. Estudios recientes indican que la mucosa puede ser un sitio importante para la acumulación de células B IgE durante el desarrollo neonatal.

ANTECEDENTES DIRECTOS

La importancia de las inmunoglobulinas mucosas, en la protección inmune local contra infecciones virales y microbianas está bien establecida (Childers,1989; Mestecky,1989; Miller,1992). Sin embargo, no es claro aún, de que manera actúan los anticuerpos para limitar el crecimiento de los parásitos durante las infecciones parasitarias (Strober;1988). Los mecanismos por los cuales se establece y regula una respuesta inmune intestinal son en gran parte especulativos (Biewenga,1993). La **amibiasis,** infección causada por ***Entamoeba histolytica*** continúa siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo (Walsh,1986). ***E. histolytica***, como la mayoría de los patógenos infecciosos penetran al organismo vía las superficies mucosas. Los trofozoítos de este parásito son los que afectan el intestino grueso del humano causando disenteria y de ahí pueden diseminarse a otros órganos como el hígado y provocar la amibiasis extraintestinal. En relación al estudio de la respuesta inmune contra ***E. histolytica,*** la mayoría de los trabajos se han enfocado al estudio de la respuesta inmune sistémica (Kretschmer,1986) y en pocos reportes se han analizado las respuestas inmunes locales. En cuanto a la respuesta en mucosas, en humanos, se ha realizado la detección de anticuerpos, anti-amiba en heces, leche y saliva (Kretschmer,1986,1989), además se ha observado que la IgA anti-amiba producida en humanos, inhibe la adhesión de amibas en células animales in vitro (Carrero,1994). Aunque diversos antígenos de ***E. histolytica*** han sido expresados en bacterias atenuadas (Cieslak,1993; Beving,1996; Sultan,1998) y han sido probados en modelos animales como candidatos a vacunas orales o parenterales para la inducción de respuesta de anticuerpos en la mucosa para impedir la amibiasis invasiva (Stanley,1996; Zhang,1996) no se ha determinado cuál de ellos pueden impedir la enfermedad intestinal.

Se ha logrado la inducción de la respuesta antiamiba en la mucosa y ha sido observada en modelos experimentales usando diferentes estrategias de inmunización oral como la administración de un dodecapeptido, de la proteína rica en serina de ***E. histolytica*** (Ryan,1997), el peptido rico en cisteina de una lectina inhibible con galactosa ***E. histolytica*** (Beving,1996), y una bacteria atenuada recombinante expresando el peptido rico en serina fusionado cada uno a la subunidad B (Zhang,1996) o a él dominio A2 de la toxina de cólera

(Sultan,1998). Ya que la mucosa del intestino grueso es primariamente colonizada y dañada por los trofozoítos de ***E. histolytica*** para provocar amibiasis intestinal, y que la propagación de las amibas a otros órganos puede provocar la amibiasis extraintestinal, se requiere la caracterización de la inmunidad local antiamiba en el intestino grueso para el desarrollo de una vacuna efectiva antiamiba. Aunque existen claras diferencias entre la inmunidad sistémica y mucosa (Mowat,1997; Mestecky,1994), se conoce poco acerca de la compartamentalización de la respuesta inmune en los diferentes sitios efectores de la mucosa; en el caso de la inmunidad intestinal la cantidad e intensidad de las respuestas producidas en el intestino delgado y grueso pueden diferenciarse y cambiar con una inmunización local o sistémica.

Existen pocos reportes en los que se ha estudiado la inducción de la respuesta inmune intestinal y sistémica anti-***E.histolytica.*** Datos previos del laboratorio han mostrado que por la administración **local (intragástrica y rectal)** o **sistémica (intraperitoneal)** con trofozoítos fijados con glutaraldehído se inducen respuestas de anticuerpos anti-amiba, de los tres isotipos mayoritarios (**IgA, IgG** e **IgM**), a nivel **local (PP y líquidos intestinales)**, y a nivel **sistémico (bazo y suero)**. Aunque la magnitúd de dichas respuestas varió dependiendo de la ruta de inmunización (Moreno-Fierros,1995). Se analizó también, la cinética de la respuesta anti-amiba después de una sola inmunización con **GFT** (Moreno-Fierros,1996). Al comparar las respuestas entre sexos se encontró que en general la respuesta anti-amiba de las **hembras** fue **significativamente mayor** a la de los machos lo cuál podría ayudar a explicar la prevalencia de amibiasis invasiva observada en hombres (Webb,1989). Sin embargo ya que ***E.histolytica*** es un parásito entérico, es necesario realizar más estudios sobre la respuesta inmune intestinal.

Recientemente se realizo un análisis comparativo de los antígenos amibianos reconocidos inmunodominantemente por anticuerpos totales de **intestino delgado** y **suero**, en ratones inmunizados con amibas fijadas con glutaraldehído por las vías **oral, rectal e intraperitoneal**; encontrandose que existen diferencias en el número de antígenos que son reconocidos de manera predominante a nivel intestinal y sistémico (Moreno-Fierros,1996). Se observó también que el patrón de antígenos reconocidos a nivel local y sistémico por las vías intraperitoneal y rectal es muy similar, mientras que por la vía oral el reconocimiento de antígenos es muy escaso (Moreno-Fierros,1996).

Además se encontró que existen diferencias entre los antígenos que son reconocidos de manera dominante a nivel sérico por anticuerpos de diferentes isotipos. Estos hallazgos deben tomarse en cuenta para aquellos estudios encaminados a la identificación de antígenos inmunodominantes para la futura elaboración de vacunas, debido a que se destaca la importancia de analizar individualmente el reconocimiento mostrado por anticuerpos de diferentes isotipos y no de inmunoglobulinas totales, para asegurar la adecuada selección de antígenos que generen respuestas inmunes de los isotipos con mayor valor protector. Para el caso particular de la **vacuna amibiana**, es necesario realizar más investigación básica para conocer los mecanismos de inducción y regulación de la respuesta inmune en **intestino grueso**; ya que la respuesta inmune en mucosa en los sitios específicos varía dependiendo del antígeno, la ruta de administración y la especie analizada.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que las **muestras intestinales** son muy **lábiles**, en el estudio anterior (Moreno-Fierros,1996), no fue posible analizar la identificación de antígenos inmunodominantemente reconocidos por anticuerpos de diferentes isotipos en dichas muestras. Por tal motivo, para aportar información adicional al conocimiento de la compartamentalización de la respuesta inmune intestinal y sistémica anti *E.histolytica*, en el presente trabajo se analizaron los antígenos amibianos reconocidos por anticuerpos de diferentes isotipos en **suero** y en contenidos de **intestinos delgado** y **grueso**, de ratones inmunizados por las vías **oral, rectal, intraperitoneal** e **intramuscular**. La inclusión de la **ruta intramuscular**, se debe a que el **peritoneo** es considerado como un sitio **inductor** de **respuestas inmunes mucosas** (Biewenga,1993), por lo que es necesario esclarecer si la inmunización con amibas fijadas con glutaraldehído por una ruta estrictamente sistémica, es capáz de estimular también la respuesta en mucosas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias, a nivel de suero, e intestinos delgado y grueso en la respuesta de anticuerpos anti-*E. histolytica*, inducida por la inmunización local y sistémica con trofozoítos fijados con glutaraldehído.

OBJETIVOS PARTICULARES

Se determinará por **ELISA** si existen diferencias en cuanto a la magnitud del isotipo de anticuerpo inducido; y si la vía de inmunización influye en la respuesta de anticuerpos anti-amiba.

Se analizará por **Inmunoblot** si existen diferencias en el patrón de antigenos amibianos reconocidos predominantemente por anticuerpos de diferentes isotipos inducidos en suero, e intestino delgado y grueso.

METODOLOGÍA

Animales: Se usaron ratones machos de la cepa Balb/c hijos de ratones desparasitados de tres meses de edad, los cuales fueron mantenidos con agua, aserrín y alimento esterilizados antes y durante la experimentación.

Preparación de extractos de proteínas totales de *E. histolytica*: Se prepararon cultivos axénicos de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS en medio TYI, por 24-48 horas (Diamond,1978), se cosecharon los cultivos enfriando las botellas por 10 min. en hielo, se lavaron los trofozoítos tres veces con PBS a 4° C centrifugando a 1500 rpm por 5 min. La pastilla se resuspendió en un volumen 5 veces mayor al de la pastilla de PBS con un inhibidor de proteasas **p-hidroximercuribenzoato (pHMB)** 20 mM en Trizma-Base 150 Mm. La lisis se llevó al cabo por congelación y descongelación en CO_2 sólido-acetona y agua hirviendo, respectivamente. Finalmente los extractos amibianos se almacenaron a 4° C (Moreno-Fierros,1995).

Antígeno (trofozoítos fijados con glutaraldehído): Se contaron y se ajustaron a una concentración de un millón de células por mililitro, los trofozoítos se lavaron tres veces con PBS, y se fijaron con glutaraldehído al 0.25% en PBS por una hora a temperatura ambiente; después se lavaron seis veces por centrifugación con un volumen de PBS 10 veces mayor al de la pastilla y se almacenaron a 4°C (Moreno-Fierros,1995).

Rutas de Inmunización: Se administraron dosis de 500 mil trofozoítos fijados con glutaraldehído por diferentes rutas (Moreno-Fierros,1995). En las rutas intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM) los TFG fueron administrados en 100 µl de PBS. En la ruta IM las dosis fueron aplicadas en el muslo. En la ruta oral (O), se administraron 100 µl de TFG en PBS con 500 µl de suspensión de hidróxido de aluminio. Por la ruta rectal (R) el antígeno fue administrado en 20 µl de PBS, y la canula fue introducida suavemente 2 cm a través del recto, y el antígeno fue depositado en el intestino grueso. El grupo control (C) los ratones solo recibieron el vehículo utilizado para cada ruta.

Esquema de inmunización: Para cada ruta de inmunización empleada se utilizaron grupos de cinco ratones machos; estos recibieron 1 dosis semanal durante cuatro semanas de TFG por las rutas IP, IM, R y O; y los contenidos de suero, intestinos delgado y grueso fueron colectados siete días después de la ultima inmunización.

Obtención de secreciones: Para la obtención del **suero** se obtuvo por punción cardiaca directa la mayor cantidad de sangre posible, la cuál se dejo reposar unos minutos para centrifugarse durante 5 min. El suero se recupero y se almaceno en el congelador a -20°C hasta su uso. Una vez llevada a cabo la disección del organismo, se identificó el aparato digestivo y se procedio a la obtención de **líquidos intestinales**. El intestino delgado se corto en la región superior a nivel del píloro y a nivel inferior a nivel de la válvula ileocecal. El intestino grueso se diseco en la región distal a nivel del recto. Ambos intestinos se colocaron por separado en cajas Petri con 2-3 ml de medio RMPI 1640 con garamicina para evitar posibles contaminaciones de los líquidos intestinales. El contenido del intestino delgado y grueso se vacío con ayuda de la introducción de 5 y 3 ml de RPMI 1640 respectivamente, el desecho se recolecto en cajas de Petri.
Se aplicaron posteriormente 250 y 150 µl de pHMB (100 mM) en los líquidos de intestino delgado y grueso respectivamente, esto con el objeto de lograr la inhibición de proteasas que pudieran degradar los anticuerpos. Posteriormente se centrifugaron 10 min. a 5000 rpm. La pastilla se desecho y el sobrenadante se recupero y se almaceno en el refrigerador a -20°C hasta su uso(Moreno-Fierros,1994,1995).

Determinación de anticuerpos anti-amiba por el método de ELISA: Se realizaron ensayos de **ELISA** para la detección de anticuerpos Totales, IgG, IgM, IgA anti-amiba de suero, contenidos intestinales de intestino delgado y grueso de ratones inmunizados con TFG. Se recubrieron placas de poliestireno (Costar) de 96 pozos con extracto amibiano; en un volumen de 100µl de buffer de bicarbonato-carbonato pH 9.6; que contenían 10 µg de proteína total amibiana (100 µg prot/ml) por pozo de extracto amibiano, se incubaron toda la noche a 4 °C, y se lavaron tres veces con PBS-Tween 20, 0.05 % (PBS-T). Se bloquearon los sitios libres de la placa adicionando 100µl de leche descremada al 6% en PBS-T, se incubaron 2 hrs. y fueron lavadas tres veces con PBS-T. Se añadieron en cada

pozo 100 µl de las diluciones de suero y líquidos intestinales. Las muestras de suero fueron diluidas 1:100 (IgA) y 1:500 (IgG e IgM) con leche descremada al 3% en PBS-T. Los líquidos de intestino delgado y grueso fueron diluidos 1:2 con leche descremada al 6% en PBS-T; se adicionaron por duplicado 100 µl de las muestras de suero y líquidos intestinales. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Se añadieron 100 µl por pozo de la dilución adecuada de conjugado peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón, se incubaron 3 hrs. Los conjugados fueron diluidos con leche descremada al 3% en PBS-T de la siguiente forma: 1:1000 Anti IgA (anti cadena alfa Sigma Chemical Co; St.Louis,MO), 1:12800 Anti IgG (anti cadena Fc gamma Pierce, Rockford, IL) y 1:6400 Anti IgM (anti cadena Mu Pierce, Rockford, IL). Se revelaron con la solución de sustrato (H_2O_2/ortofenilendiamina) adicionando 100µl por pozo y se paro la reacción a los 10 min. añadiendo en cada pozo 25µl con ácido sulfúrico 2N. La absorbancia fue leída a 492 nm en un lector de ELISA. Los valores de absorbancia de cada isotipo se analizaron con la prueba de t de student para observar si existían diferencias significativas en cuanto a la magnitud de los isotipos producidos.

Electroforesis en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE): Se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli,1970). Las proteínas amibianas fueron tratadas con Buffer de muestra SDS, y con β-mercaptoetanol al 5 %. Las muestras del extracto amibiano y los marcadores de peso molecular pre-teñidos de GIBCO BRL (200,000 miosina, 97,400 fosforilasa b, 68,000 suero albúmina bovina, 43,000 ovoalbúmina, 29,000 anhidrasa carbónica, 18,400 β-galactosidasa, 14,300 lisosima) fueron hervidas en un buffer de muestra por 90 seg. Finalmente se corrió la electroforesis a 150 volts.

Método de Inmunoblot para el reconocimiento de antígenos amibianos (Western blot): Las proteínas separadas electroforeticamente fueron transferidas a papel de nitocelulosa de 0.45 µm de acuerdo al método descrito por Towbin et al, 1979. Una vez completa la electroforesis, los geles se equilibraron 20 min. en buffer de transferencia. Se realizó una tinción reversible con solución de rojo Ponceau 0.5 %, la cual fue lavada posteriormente con PBS-T. La membrana de nitrocelulosa se recorto en bandas, a las cuales se le agregaron 2 ml. de leche descremada al 3 % en PBS-T en donde permanecieron por un

lapso de 1 hr. a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente se añadieron las diluciones de los líquidos intestinales de intestino delgado y grueso (1:2) y el suero (1:100) con leche descremada al 6 % en PBS-T toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron tres veces en PBS-T. Se añadieron los conjugados marcados con peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón IgG e IgM (1:200) e IgA (1:1000) Sigma Chemical Co, y una mezcla de los tres conjugados (para la detección de inmunoglobulinas totales) en leche descremada al 3% en PBS-T, la incubación se llevó al cabo en un lapso de 2 hr. a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1:3 para eliminar el exceso de detergente. A las tiras se les agregó la solución del sustrato cromógeno (H_2O_2-diaminobenzidina) durante 15 min. a temperatura ambiente; finalmente se lavaron con agua destilada abundante para eliminar el exceso del sustrato(Moreno-Fierros,1996). El cálculo de los pesos moleculares de las proteínas amibianas obtenidas y reveladas se llevó al cabo considerando la distancia relativa de la proteína con respecto a un marcador previamente establecido.

METODOLOGIA

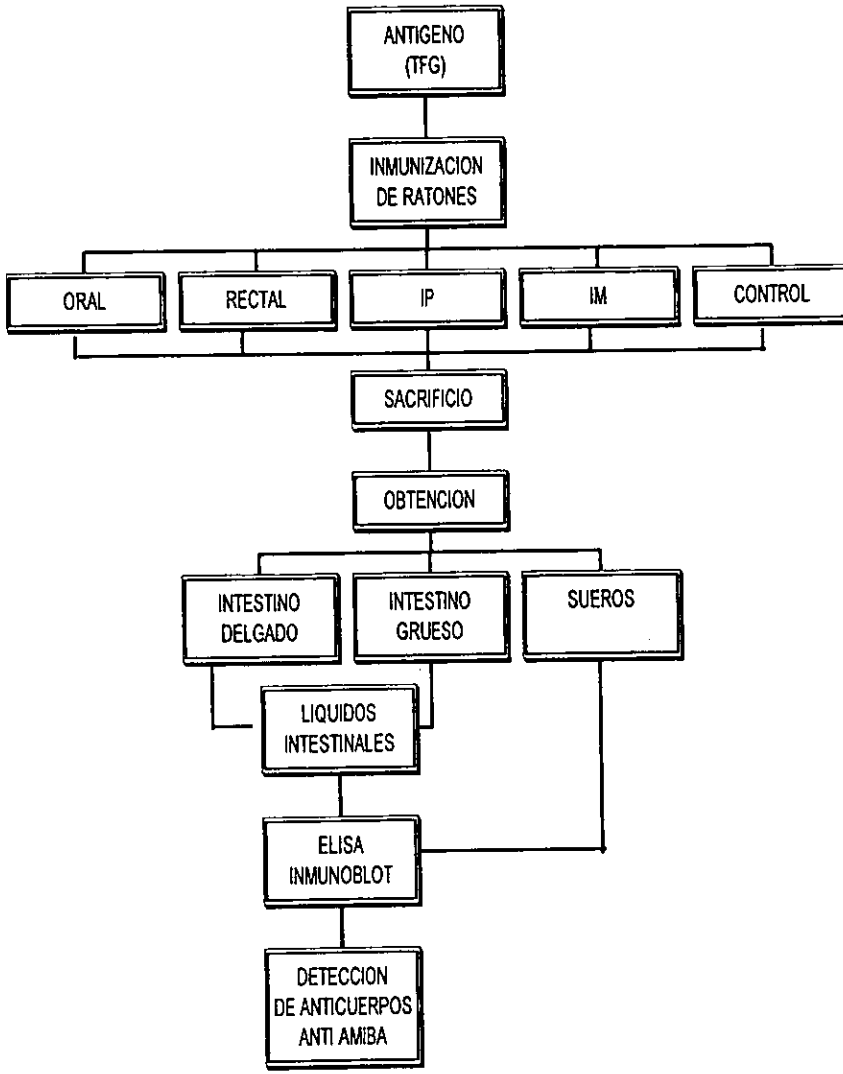

Fig 5. Diagrama de flujo, donde se representa la metodología realizada en este experimento.

El análisis por ELISA demostró que mediante la inmunización con TFG se inducen altas respuestas de anticuerpos anti-amiba en suero (Fig. 6) por las rutas de inmunización IP, IM y R de los tres isotipos IgM, IgG e IgA, y en la vía que se detecto la más baja respuesta fue en la oral; no encontrando diferencias significativas en esta última con el grupo control. El isotipo que predominó en las rutas de inmunización IP, IM y R fue IgM seguido de IgG y finalmente por una moderada respuesta de IgA. En general no se observaron diferencias en cuanto a la magnitud de la respuesta anti-amiba para cada isotipo en cada ruta de inmunización.

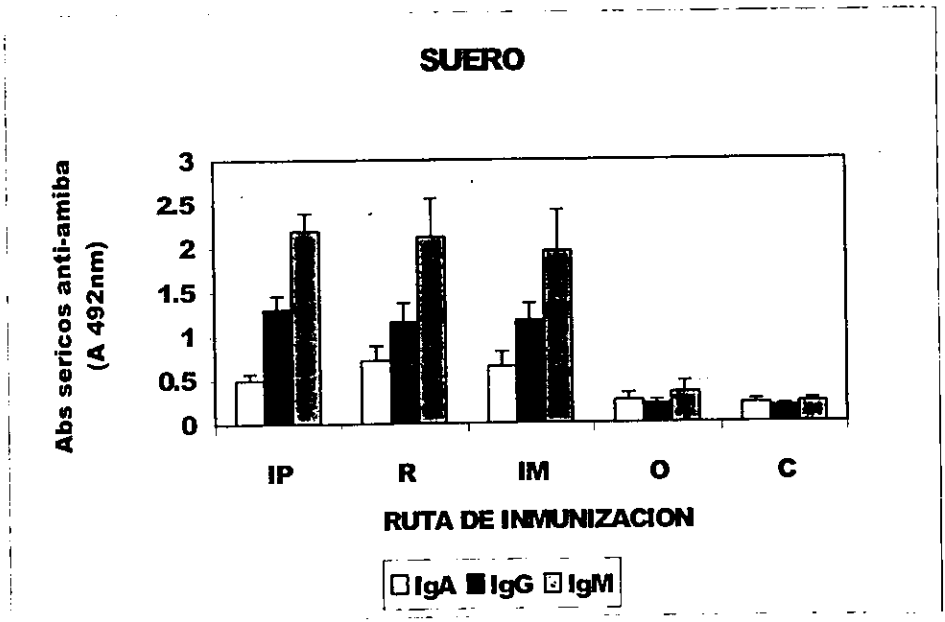

Fig 6. Detección de anticuerpos anti-amiba en suero. Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c machos que recibieron cuatro dosis de TFG por las rutas IP, IM, R, y O; y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. El grupo control, solo recibió el vehículo empleado para cada ruta. Las barras representan la media y la desviación estandar de las lecturas de A_{492} nm para cada grupo. Se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos IgA, IgG, e IgM anti-amiba. El suero fue diluido 1:500 para la detección de IgG e IgM y 1:100 para la detección de IgA.

La magnitud de la respuesta anti-amiba detectada en líquidos intestinales de intestino delgado varió de acuerdo a la vía de inmunización utilizada. En general IgA fue el isotipo que se detecto en mayor cantidad para todas las rutas de inmunización (Fig. 7). En las rutas R e IM la respuesta de IgA fue seguida por IgG y finalmente por IgM. Por otra parte la ruta IM generó una respuesta intestinal anti-amiba mayor que la inducida por la ruta oral, y menor que la producida por las vías IP y R. La respuesta de IgA producida por las vías IP y R fue alta y similar en su magnitud. Por la ruta R se observó una moderada respuesta de IgA pero mayor que la inducida en la ruta oral.

La respuesta de IgG en líquidos intestinales de intestino delgado inducida por las rutas de inmunización IP, IM y R fue moderada pero mayor que la inducida en la vía oral.

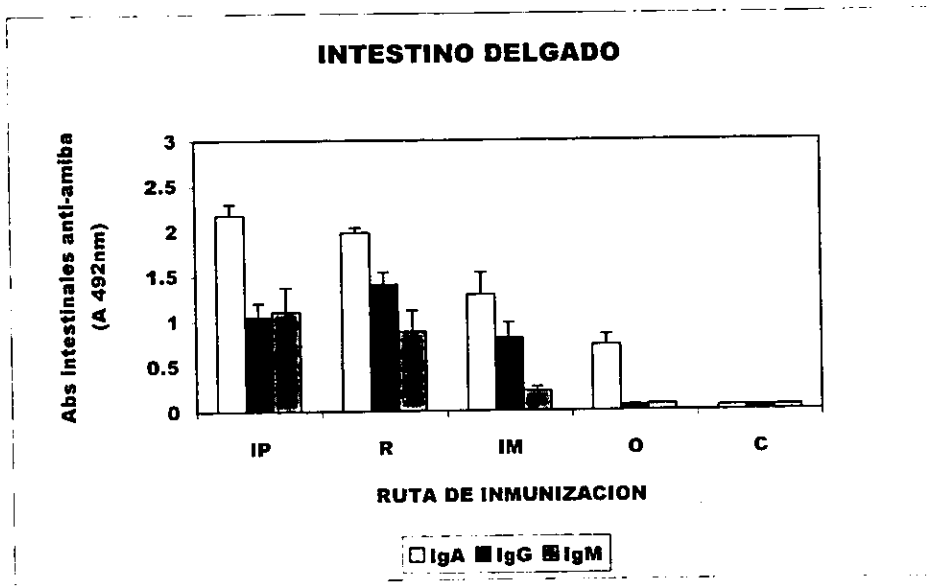

Fig 7. Detección de anticuerpos anti-amiba en intestino delgado. Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c machos que recibieron cuatro dosis de TFG por las rutas IP, IM, R y O; y fueron sacrificados siete días después de la última inmunización. El grupo control, solo recibió el vehículo empleado para cada ruta. Las barras representan la media y la desviación estandar de las lecturas de A_{492} nm para cada grupo. El contenido intestinal fue colectado en 5 ml de medio RPMI. Se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-amiba; los líquidos intestinales fueron diluidos 1:2.

En líquidos intestinales de intestino grueso los isotipos presentaron los mismos niveles de anticuerpos anti-amiba para todas las vías de inmunización empleadas (Fig. 8), con excepción de la ruta oral en la que únicamente se detectaron respuestas de anticuerpos anti-amiba del isotipo IgA tanto para intestino delgado y grueso. Por otra parte, por las rutas IP y O el isotipo que predominó fue IgA de manera similar a lo observado en ID. Mientras que por las rutas IM y R la respuesta de anticuerpos anti-amiba de los tres isotipos analizados fue similar.

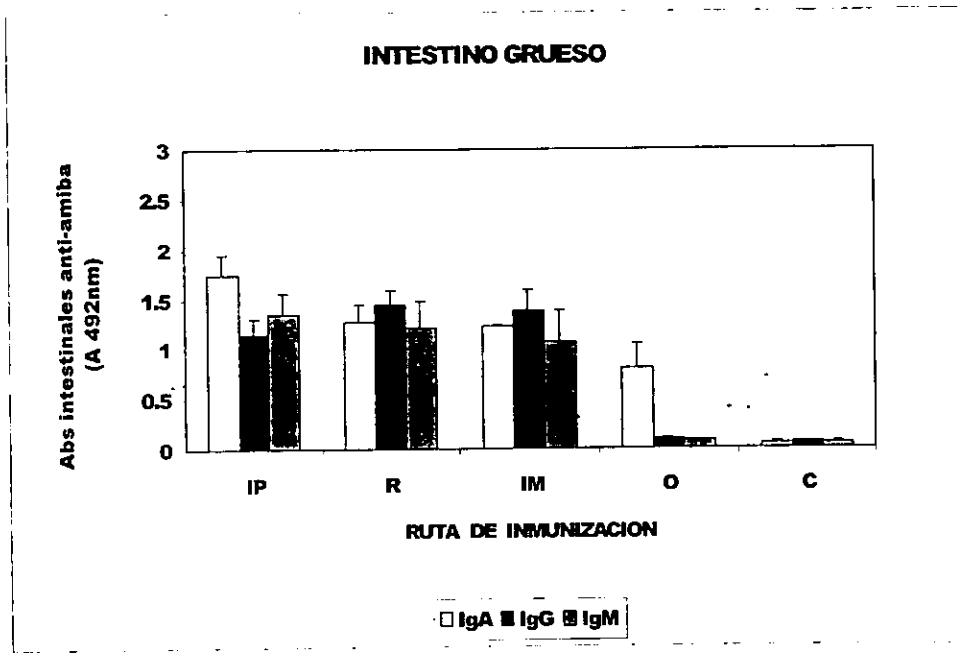

Fig 8. Detección de anticuerpos anti-amiba en intestino grueso. Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c machos que recibieron cuatro dosis de TFG por las rutas IP, IM, R, y O; y fueron sacrificados siete días después de la última inmunización. El grupo control, solo recibió el vehículo empleado para cada ruta. Las barras representan la media y la desviación estandar de las lecturas de A_{492} nm para cada grupo. El contenido intestinal fue colectado en 3 ml de medio RPMI. Se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-amiba; los líquidos intestinales fueron diluidos 1:2.

En lo que se refiere a la respuesta de anticuerpos totales anti-amiba producida en suero (Fig.9 A), se observó una fuerte respuesta en los ratones inmunizados por las vías IP, IM y R. La menor respuesta se detectó en el suero de ratones inmunizados por la vía oral no encontrándose diferencias significativas respecto al grupo control.

En relación con la respuesta total anti-amiba en intestino delgado se observó que en las vías IP y R una respuesta alta y similar entre ellas en cuanto a su magnitúd. Por su parte en la ruta IM la respuesta inducida fue moderada; pero significativamente mayor que la baja respuesta inducida por la vía oral (Fig. 9 B). Por su parte en intestino grueso la respuesta fue similar en su magnitúd para todas las rutas empleadas exceptuando la vía oral donde la respuesta de anticuerpos fue baja (Fig. 9 C).

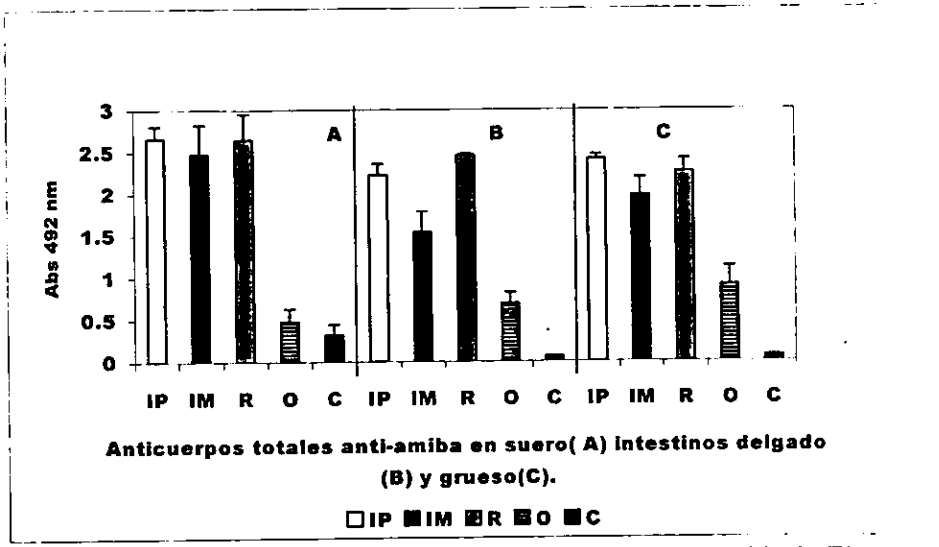

Fig 9. Detección de anticuerpos totales anti-amiba en suero (A), intestinos delgado (B) y grueso (C). Se inmunizaron grupos de cinco ratones Balb/c machos que recibieron cuatro dosis de TFG por las rutas IP, IM, R y O; y fueron sacrificados siete días después de la última inmunización. El grupo control, solo recibió el vehículo empleado para cada ruta. Las barras representan la media y la desviación estandar de las lecturas de A_{492} nm para cada grupo. Se determinaron por ELISA usando una mezcla de conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón IgA, IgG, e IgM. Las muestras de suero fueron diluidas 1:500 y los líquidos intestinales 1:2.

INMUNOBLOT

El análisis por inmunotransferencia, demostró que los sueros de los ratones inmunizados por las vías R, IP, IM y O reconocieron un gran número de proteínas anti-amiba, encontrando que existen diferencias en el patrón de proteínas reconocidas de manera inmunodominante por anticuerpos IgA, IgG e IgM respectivamente. El isotipo que presento un reconocimiento de menor la intensidad de las proteínas amibianas fue el correspondiente al IgA; reconociendo preferentemente la zona de peso molecular (PM) de 240-57 kDa, remarcando que por la vía IM para este isotipo, se reconocen intensamente dos bandas de 143, 130 kDa. Los dos isotipos que mostraron un mayor reconocimiento de proteínas amibianas fueron, sin duda, IgG e IgM (Fig.10), (Tabla 1). Comparando, las proteínas amibianas reconocidas para cada isotipo, en cualquiera de las vías de inmunización, se observa que todos son capaces de reconocer el rango de proteínas que va de 240-65, 150-84, 81-56, 54-39, 37-25 y 24-14 kDa, aunque en algunos casos son reconocidas de manera inmunodominante como es el caso del isotipo IgG que reconoce intesamente un doblete de proteínas amibianas de 25-24 kDa por las rutas R,IP e IM. Por otra parte es reconocido exclusivamente por el isotipo IgM un triplete de proteínas amibianas de 35.3, 34, 33 kDa por las vías de inmunización R, IP, IM y O. Además se observa que existen diferencias, en el reconocimiento de las proteínas amibianas por efecto de la ruta de inmunización, como es el caso de la ruta IM que reconoce de manera inmunodominante en el isotipo IgG; las proteínas de peso molecular de 136, 130, 90, 81, 60, 54, 31 kDa, tomando en cuenta que las vías de inmunización IP, R reconocen estas proteínas pero con menor intensidad, por lo cuál no se consideran como inmunodominantes. En el caso de la vía local (O) reconoce de manera intensa una proteína amibiana de 56 kDa en el isotipo IgG, esta banda no es reconocida por los isotipos IgA e IgM, remarcando que se reconocen mayor número de proteínas amibianas; y con mayor intensidad, por la ruta IM. Es importante, aclarar también que se observaron cambios en la respuesta a las diferentes vías; aún tratándose del mismo isotipo tal es el caso de la proteína reconocida por IgM, con un peso de 84 kDa que es reconocida por las vías R, IP y IM, más no así por la vía O.

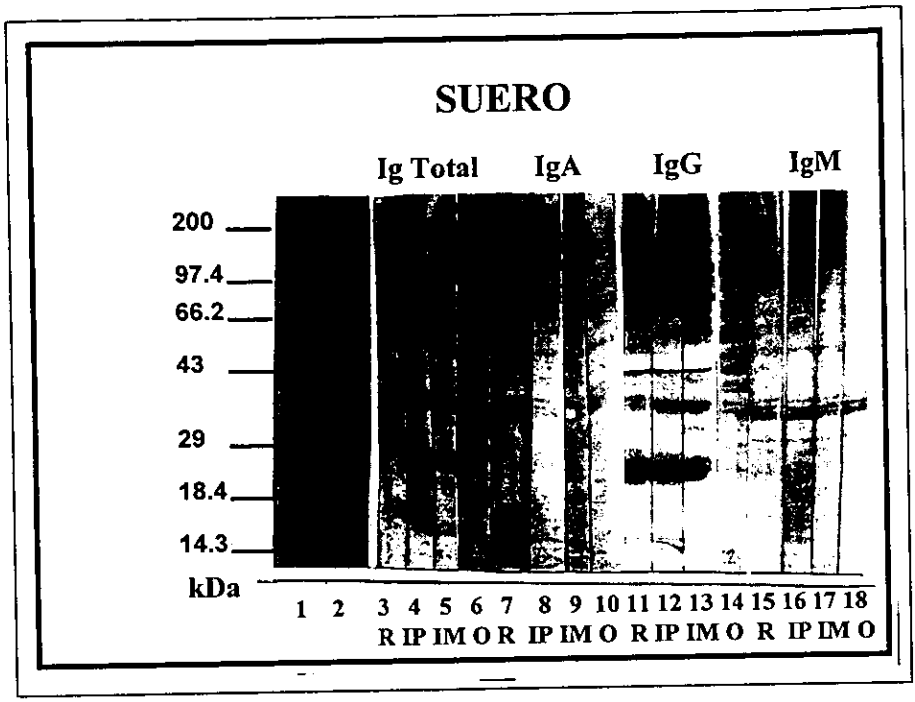

Fig 10. Análisis por inmunoblot de anticuerpos Totales, IgA, IgG e IgM anti *E.histolytica* en muestras de suero de ratones inmunizados con TFG. El carril 1 representa los marcadores de peso molecular GIBCO, el carril 2 muestra el patrón de proteínas del extracto amibiano teñido con Rojo Ponceau. Los carriles del 3 al 18 representan las proteínas del extracto amibiano incubadas con muestras de suero; los carriles del 3-6 se revelaron con un pool de anticuerpos totales, del 7-10 con anti-IgA, del 11-14 con anti-IgG y del 15-18 con anti-IgM. Los carriles 3, 7, 11 y15 representan la vía R; el 4, 8, 12 y 16 la vía IP, el 5, 9, 13 y 17 la vía IM y el 6, 10, 14 y 18 la vía O.

En contraste con los sueros, los anticuerpos de líquidos intestinales de intestino delgado (Fig. 11), (Tabla 2) y grueso (Fig. 12), reconocen menor número de bandas y con menor intensidad. En el, ID y en el IG, se observa el reconocimiento de manera intensa, del doblete de proteínas amibianas de 25, 24 kDa; por las rutas de inmunización IP, IM, y R que también fue reconocido por los anticuerpos sericos del isotipo IgG. Por otra parte el reconocimiento de proteínas amibianas por el isotipo IgA fue de mayor intensidad y con un mayor número de bandas, al compararlo con el comportamiento que se presento en el IG, correspondiendo a una zona de peso molecular elevado de 260-130 kDa. Haciendo notar que existen diferencias en el reconocimiento de antígenos amibianos de los diferentes isotipos, como es el caso del isotipo IgA, que reconoce los antígenos amibianos de 260, 227, 101, 76, y 59 kDa de manera inmunodominante. El isotipo, que presento un reconocimiento menor, en el número de proteínas amibianas fue el IgM.

En intestino grueso (Fig. 12), (Tabla 3) la mayor respuesta en el reconocimiento de proteínas amibianas fue en el caso del isotipo IgG, que reconoció un mayor número de bandas y con mayor intensidad, en comparación con el intestino delgado. Es importante hacer notar, que para todos los isotipos, la vía de inmunización con menor respuesta fue la O, de manera similar a lo observado en ID; incluso para el isotipo IgG e IgM fueron completamente nulas, en términos generales la ruta de inmunización sistémica (IM) presento un mejor comportamiento en el reconocimiento de antígenos amibianos, que lo observado para la ruta O. Además se reconocen mayor número de bandas de manera inmunodominante de peso molecular 220, 108, 55, 48, kDa por la vía R en el isotipo IgG. En este último también es reconocida una proteína amibiana de manera inmunodominante de 41.5 kDa, por las rutas de inmunización IP, IM, y R. En el caso de las vías IP e IM se observa un reconocimiento de poca intensidad de antígenos amibianos en la zona de 230-121, 73-40 kDa. En el caso del isotipo IgA se reconocen de manera inmunodominante por la vía IP las proteínas de alto peso molecular de 161, 150 kDa. Se observa una respuesta inmunodominante en el reconocimiento de proteínas amibianas del isotipo IgG con respecto a los isotipos IgA e IgM en las vías IP, R e IM.

Además se aprecia que existen diferencias, en el reconocimiento de los antígenos amibianos entre ID e IG, se observa que el isotipo IgA reconoce preferentemente las proteínas de 260, 101, 76 y 59 kDa, por las rutas de inmunización IP, IM, R y O; y una

proteína de 227 kDa por las vías IM, R y O; en líquidos intestinales de intestino delgado, en lo que se refiere al isotipo IgG, se reconoce por la vía IP, IM, y R; exclusivamente las proteínas de 187, 160 kDa, la ruta R, reconoce la de 128, 73 kDa, que no son reconocidas por IG, sin embargo este último reconoce de manera inmunodominante las proteínas de 220, 108, 55, 37, 35, 34 por la ruta R; y de 140, 121 y 28 kDa por la vía IP, en el isotipo IgG; observandose que existen diferencias, en el patrón de reconocimiento de los antigenos amibianos en líquidos intestinales de intestino delgado y grueso, por efecto de la vía de inmunización empleada en este experimento.

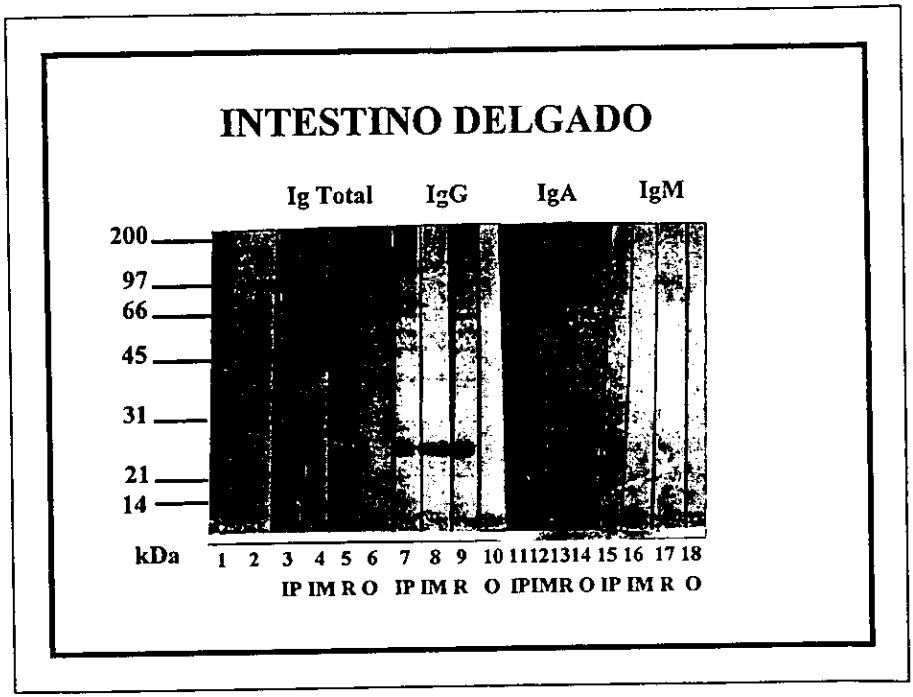

Fig 11. Análisis por inmunoblot de anticuerpos Totales, IgG, IgA e IgM anti *E.histolytica* en muestras de líquidos intestinales de intestino delgado de ratones inmunizados con TFG. El carril 1 representa el patrón de proteínas del extracto amibiano teñido con Rojo Ponceau, el carril 2 muestra los marcadores de peso molecular GIBCO. Los carriles del 3 al 18 representan las proteínas del extracto amibiano incubadas con muestras de contenidos intestinales de intestino delgado; los carriles del 3-6 se revelaron con un pool de anticuerpos Totales, del 7-10 con anti-IgG, del 11-14 con anti-IgA y del 15-18 con anti-IgM. Los carriles 3, 7, 11 y15 representan la vía IP; el 4, 8, 12 y 16 la vía IM, el 5, 9, 13 y 17 la vía R y el 6, 10, 14 y 18 la vía O.

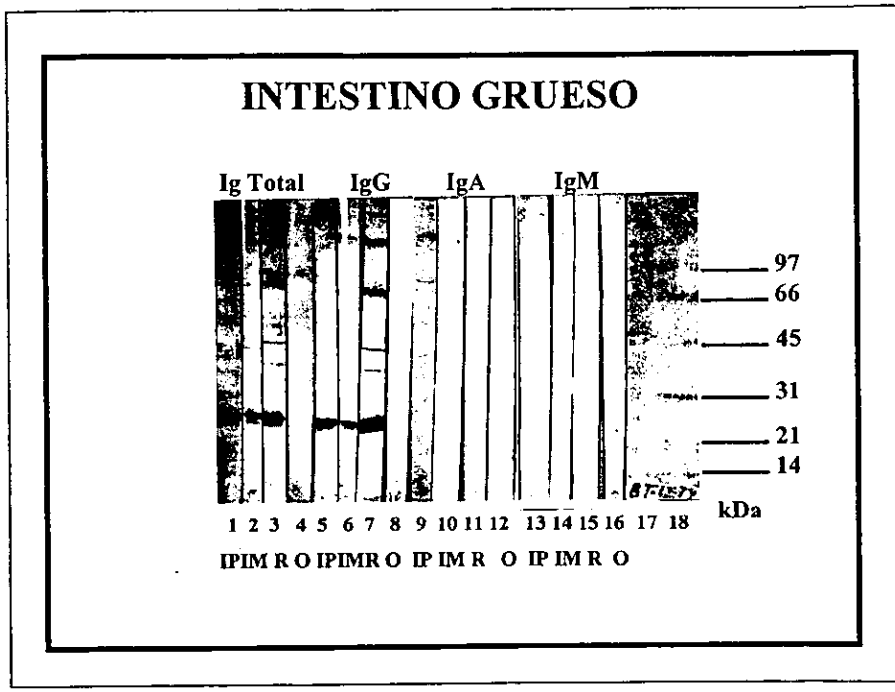

Fig 12. Análisis por inmunoblot de anticuerpos Totales, IgG, IgA e IgM anti *E.histolytica* en muestras de líquidos intestinales de intestino grueso de ratones inmunizados con TFG. Los carriles del 1 al 16 representan las proteínas del extracto amibiano incubadas con muestras de contenidos intestinales de intestino grueso; los carriles del 1-4 se revelaron con un pool de anticuerpos Totales, del 5-8 con anti-IgG, del 9-12 con anti-IgA y del 13-16 con anti-IgM. Los carriles 1, 5, 9 y13 representan la vía IP; el 2, 6, 10 y 14 la vía IM, el 3, 7, 11 y 15 la vía R y el 4, 8, 12 y 16 la vía O. El carril 17 representa el patrón de proteínas del extracto amibiano teñido con Rojo Ponceau y el carril 18 muestra los marcadores de peso molecular GIBCO.

Tabla 1. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos sericos.

IgA				IgM				IgG			
IP	IM	R	O	IP	IM	R	O	IP	IM	R	O
240	240										
230	230	230		230	230	230		230	230	230	230
220											
210		210		210	210		210	210	210	210	
							200				
	190			190	190	190		190	190	190	190
173	173	173		173	173	173		173	173	173	
	165	165							165	165	
150	150		150	150	150	150	150	150	150	150	
		143									
									136		136
	130	130		130	130	130		130	130	130	
			124					124	124	124	124
120	120	120		120	120	120					
								118	118	118	
113	113	113	113	113	113	113	113	113			
								107	107	107	107
									102		
	97.4			97.4	97.4	97.4					
								94			
90	90	90		90	90	90	90	90	90	90	90
87	87							87			
		84		84	84	84	84	84	84	84	84
			81						81	81	
79								79	79	79	
	75			75	75	75					
73		73	73	73	73	73		73	73	73	
70	70										
66	66	66	66					66	66	66	66
				64	64	64	64	64	64	64	64
62	62										
	60			60	60	60			60	60	
57								57			
		56	56	56	56	56	56	56	56		56
		54		54	54	54		54	54	54	54
	51								51	51	51
48	48	48	48		48					48	
	47	47	47	47	47	47	47				
					45						45
											44.5
41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5
								41	41	41	
40	40	40		40	40	40	40		40		
		39						39		39	39
		37							37	37	37
35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3	35.3
34		34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
33	33	33	33	33	33	33	33				33
		32	32	32	32	32	32	32	32	32	
		31						31	31		
		30.6		30.6	30.6	30.6			30.6		
29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
				27	27	27	27			27	
25	25	25		25	25	25	25	25	25	25	25
24	24	24		24		24	24	24	24	24	24
				20.6		20.6	20.6	20.6	20.6	20.6	
								19.6	19.6		
				18.3		18.3	18.3				
				17		17	17	17	17		
								16			
									15.4	15.4	
								14.6	14.6	14.6	
				14.4		14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	

Tabla 2. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos de intestino delgado.

IgA				IgM				IgG			
IP	IM	R	O	IP	IM	R	O	IP	IM	R	O
260	260	260		260							
				250		250					
								230		230	
	227	227	227	227							
				208							
					190						
								187	187	187	
161		161									
								160	160	160	
149		149									
				136	136	136					
									135	135	
130	130	130	130								
								128		128	
										121	
				115	115	115					
101	101	101	101								
						90					
84.6											
76	76	76	76								
								73	73	73	
								68.5	68.5		
								63.5	63.5	63.5	
59	59	59	59								
								57.4	57.4	57.4	
									55.1		
55	55	55									
								50	50	50	
								48		48	
								41.5		41.5	
41	41	41	41								
40								40	40	40	
								38.5	38.5	38.5	
								25	**25**	**25**	
								24	**24**	**24**	
								20.7		20.7	
								14.4		14.4	

Tabla 3. Peso molecular relativo (kDa) de algunas proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos de intestino grueso.

IgA				IgM				IgG			
IP	IM	R	O	IP	IM	R	O	IP	IM	R	O
								230		230	
				227	227	227					
								220		220	
					208	208					
				191							
161		161									
								160			
150		150	150	150	150	150					
								140	140		
136				136	136	136					
									135	135	
130	130	130									
								128			
								121	121	121	
										108	
				97.4							
				90	90	90					
84	84	84	84	84	84	84					
76	76										
								73			
								68.5			
						67.7					
								63.5	63.5	63.5	
						60					
59	59d	59	59								
								57.4		57.4	
55										55	
								52			
								50	50	50	
								48	48	**48**	
										45	
41.5								**41.5**	**41.5**	**41.5**	
						40		40	40	40	
								38.5			
									37	37	
									35	35	
								34	34	34	
								28			
								25	**25**	**25**	
								24	**24**	**24**	
								20.7		20.7	
								14.4		14.4	

Nota: Las proteínas que fueron reconocidas con menor intensidad están representadas en las tablas con gris (230) y las de mayor intensidad están marcadas con **negritas (220).**

DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra dos hallazgos principales. El primero indica que en los sitios efectores del sistema inmune de la mucosa intestinal, tienen diferencias regionales, debido a que se encontraron diferencias en el patrón de respuesta de isotipos anti-amiba producidos en el intestino delgado y grueso, después de una inmunización local y sistémica con TFG. Además excluyendo a la ruta oral, en suero e intestino grueso, para las rutas sistémicas (IP, IM) y locales (R) la magnitud de respuesta anti-amiba de cada isotipo fue muy similar; en tanto que la respuesta anti-amiba en intestino delgado varió de acuerdo con la ruta de inmunización empleada. El segundo y más importante resultado de este trabajo es la demostración de que mediante una inmunización sistémica (IM) con TFG se inducen altas respuestas de anticuerpos anti-amiba en intestinos delgado y grueso. Estos hallazgos son importantes debido a que la mayoría de los antígenos y microorganismos muertos que son empleados para el desarrollo de vacunas son sólo capaces de producir respuestas inmunes mucosas cuando son administrados por una ruta local y usualmente una inmunización por vía sistémica no produce respuestas inmunes mucosas (Mestecky,1987). La explicación de cómo se obtienen respuestas de anticuerpos intestinales por una ruta sistémica (IP) está bien documentada debido a que el peritoneo es considerado como un sitio inductor de respuestas inmunes mucosas (Biewenga,1993; Kroese,1994). En contraste es necesario realizar más trabajos para elucidar como se obtiene una respuesta intestinal después de una inmunización por una vía intramuscular con TFG.

Se han realizado, diversos estudios donde se obtuvieron respuestas inmunes mucosas después de una inmunización intramuscular con rotavirus (Conner,1993). Estudios de la cinética del virus en la respuesta específica de anticuerpos en tejidos linfoides intestinales y no intestinales se han realizado para determinar los posibles mecanismos por los cuales se genera una respuesta inmune humoral en espacios mucosos después de una inoculación intramuscular con rotavirus (Coffin,1997). En ambos casos, no se encontraron evidencias de que el virus entre al GALT o infecte pequeñas células epiteliales intestinales indicando que el virus no se disemina por la sangre en dirección al GALT y que estimula la respuesta inmune después de ser procesado por células presentadoras de antígeno, a nivel intestinal.

Ninguno de ellos encontró evidencias de que el virus pueda estimular la secreción de células plásmaticas específicas para el isotipo IgA provenientes del tejido linfoide sistémico y en direccíon hacia el GALT. Estos resultados indican que los linfocitos B activados especificamente por el virus pueden ser generados en nódulos linfoides, difundidos al GALT, y en presencia de citocinas apoyan la producción de IgA; y la diferenciación de células secretoras de IgA. Esta hipótesis fue apoyada por la observación de que el virus estimula la secreción de linfocitos especificos para IgM detectados en nódulos linfoides antes de detectar, la especificidad de los isotipos IgM, IgG e IgA en células secretoras en el GALT. Otra posibilidad es que después de la inoculación intramuscular, los APCs son capaces de presentar peptidos específicos para rotavirus y pueden ser generados en nódulos linfoides y circular hacia el GALT donde inician la producción de células productoras de anticuerpos específicos para estos antígenos. Estos hallazgos también se apoyan con la observación que la especificidad del virus para IgA fue primeramente detectada en PP y nódulos linfoides mesentericos; y solo más tarde detectada en lámina propia. Finalmente la administración parenteral del rotavirus vivo puede experimentar un ciclo abortivo de replicación en tejidos extraintestinales. (Coffin,1997).

En relación, a la poca respuesta de anticuerpos anti-amiba alcanzada por la ruta oral, esta se puede deber a una degradación enzimatica del antígeno debido al pH ácido del estómago, lo que ocasiona que se altere la estructura de los TFG. El principal problema al que se enfrentan las vacunas orales es que se puede generar a través de las diferentes inmunizaciones con el antígeno una tolerancia oral (tolerancia sistémica), es decir que el organismo no tenga una respuesta adecuada en contra del antígeno y lo reconozca como propio y no monte una respuesta inmune eficaz. Efectivamente en esta ruta la distribución del antígeno generalmente resulta en una pobre o corta respuesta de anticuerpos (Mestecky,1987; Jackson,1993) la mayoría de los antígenos incluidos los TFG no son capaces de producir respuestas sistémicas (Tomasi,1980;Jackson,1993;Moreno-Fierros,1996). Sin embargo la respuesta inmune intestinal registrada por la ruta oral fue la más pobre y solo el isotipo IgA fue producido igualmente en intestino delgado y grueso.

Si es bien conocido que la naturaleza y funciones del sistema inmune de las mucosas difiere de la inmunidad sistémica clásica: la estructura de las placas de Peyer y

otros tejidos linfoides organizados; poblaciones de linfocitos de la mucosa; patrones de migración de células inmunes entre varios tejidos mucosos; anticuerpos e inmunoglobulinas secretorias; y el hecho de que la inmunoregulación de los espacios mucosos se favorece bajo ciertos procesos (Mestecky, 1987; Underdown, 1994; Mowat, 1997). Además recientemente se reporto la evidencia de que la respuesta inmune intestinal y sistémica está compartamentalizada, debido a que se encontraron diferencias en el número de proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos en suero e intestino delgado (Moreno-Fierros,1996). Sin embargo, el conocimiento acerca de la compartamentalización de la inmunidad intestinal permanece, indefinida.

El predominio de IgA en la mayoría de las secreciones mucosas comparada con la sangre esta bien establecida. El isotipo IgA se presenta en secreciones mucosas en grandes concentraciones a diferencia de las que se presentan por otros anticuerpos (Mestecky,1994; Underdown,1994). En los tractos gastrointestinal y respiratorio superior, nariz, oído medio, vesícula biliar, mucosa uterina, saliva, leche materna, próstata y glándulas lacrimales, el isotipo IgA es producido localmente (Underdown,1994; Scicchitano,1988). En todos estos sitios, ha sido reportado que el número de células plasmaticas producen IgA en grandes cantidades que los producidos por otros isotipos (Underdown, 1994; Phillips, 1994; Brandtzaeg, 1994). Sin embargo existen marcadas diferencias, en especies animales con el predominio de IgA en ciertas secreciones mucosas notablemente en glándulas mamarias y bilis; y esto constituye un hecho para que se tenga un acercamiento más profundo al estudio de la inmunidad en mucosas en animales experimentales (Mestecky,1994). Además, en contraste con la inmunoglobulina IgA, no existe la información suficiente acerca del desarrollo de otras inmunoglobulinas en el espacio mucoso. No obstante cantidades considerables de anticuerpos IgG e IgM en secreciones externas de intestino y nasofaringe parecen ser sintetizadas localmente (Mestecky,1994). Por otra parte diversos trabajos han demostrado invariablemente que los anticuerpos IgA e IgG ambos se presentan en secreciones genitales, y el isotipo IgG parece ser la inmunoglobulina dominante (Parr,1994). Se han realizado estudios para inducir respuesta de anticuerpos anti-amiba en ratones inmunizados con trofozoítos de ***E.histolytica*** oral y sistémicamente, y parece ser que existe una correlación entre la ruta de administración empleada y el isotipo de inmunoglobulina producida en el intestino, la producción de IgA secretoria se favorece por

la administración oral de trofozoítos, en tanto que la IgG en mucosas parece ser realzada por la ruta de administración sistémica. Se demostró que ambas inmunizaciones son efectivas en la inducción de IgA secretora en el intestino, y cuando es empleada la inmunización sistémica, el incremento en los niveles de anticuerpos en los fluídos intestinales es lento, y la IgG es la clase predominante (Villareal,1992). Los resultados de este trabajo demuestran que el isotipo IgA no fue la inmunoglobulina predominante en la respuesta inducida en el intestino grueso y que una considerable cantidad de anticuerpos anti-amiba IgG e IgM se producen también en intestino delgado por las rutas intraperitoneal, intramuscular y rectal. El concepto del sistema común de mucosas se refiere al sistema específico de defensa que opera en espacios mucosos externos y que algunas funciones independientemente de la reactividad inmunologica se dan en los sitios sistémicos. En muchos modelos experimentales, la estimulación antígenica local en espacios mucosos han demostrado resultados en la producción de anticuerpos específicos, no solo en el sitio de estimulación sino también en secreciones externas (Mestecky,1994; Phillips1994). No obstante aunque la existencia del sistema común de mucosas esta bien documentado, existe la evidencia de que la exposición local al antígeno puede resultar en altos niveles de IgA secretora específicamente en la región de exposición del antígeno que la respuesta que se da en los sitios distantes (Haneberg,1994, Hopkins,1995; Nedrud,1987; Ogra,1969). Indudablemente en el intestino, la administración de la toxina de cólera en segmentos próximos o distantes provocan altos niveles específicos de antitoxina IgA en el segmento de exposición al antígeno (Pierce,1975), y que anticuerpos de poliovirus son muy abundantes en la región del colon que selectivamente ha sido inmunizada (Ogra,1969). De igual forma nuestros datos soportan el concepto del sistema común de mucosas y la natural regionalización de la respuesta inmune en mucosas, en contraste nosotros no observamos respuestas altas de anticuerpos anti-amiba en la mucosa del sitio más próximo a la aplicación del antígeno. Pero debe tomarse en cuenta que la respuesta inmune en mucosas en sitios específicos varía de acuerdo a el tipo de antígeno, la ruta de administración y la especie estudiada (Haneberg,1994;Hopkins,1995) (Lehner,1992). La respuesta inmune contra el antígeno del Lipopolisacarido y el virus core de la hepatitis B varía en la relación a la ruta de administración (Hopkins,1995). Estos hallazgos sugieren mecanismos separados, que determinan la respuesta inmune contra los dos antígenos después de la

inducción en diferentes sitios. Sin embargo, contrario a otros estudios nosotros no encontramos respuesta exclusiva para el isotipo IgA en las secreciones intestinales analizadas. No obstante en diversos estudios solo el isotipo IgA es analizado en muestras mucosas, y los otros isotipos, que por lo general no se analizan (Haneberg, 1994; Hopkins, 1995). Diversos autores han reportado que se encontraron altas respuestas anti-toxina de cólera (CT) de células productoras de IgA y una moderada respuesta de células productoras de IgG (Jackson,1993;Lycke,1986) e IgM (Lycke,1986) en células de lamina propia del intestino delgado y observaron una moderada respuesta de IgG en muestras fecales (Jackson,1993). Una posibilidad por la que la respuesta de otros isotipos no ha sido detectada en otros estudios quizás se deba a la mayor labilidad a las proteasas en relación con el isotipo IgA (Underdown,1994).

El concepto original del sistema inmune común de mucosas del tejido linfoide asociado al intestino y el tejido linfoide asociado a los bronquios; puede ser un origen para la formación de células plásmaticas precursoras de IgA de todas las glandulas y tejidos mucosos (Mestecky,1994). Sin embargo, diversos estudios incluidos los nuestros tienen considerada una posible compartamentalización del sistema inmune común de mucosas porque tejidos linfoides adicionales pueden cumplir con esa función (Mestecky,1994). Los sitios inductivos mucosos adicionales, el anillo Waldeyers del tejido orofaringeo (amígdalas nasales, palatinales, y linguales), el tejido linfoide rectal y las células B Ly-1+(CD_5+B-1) de la cavidad peritoneal también pueden contribuir al pool de células precursoras que preferentemente habitan los tractos respiratorio superior, intestinal y genital (Mestecky,1994;Kroese,1994).

De acuerdo con nuestros datos, estudios inmunohistoquímicos pueden apoyar además la idea de que existen diferencias regionales inmunoregulatorias del sistema inmune de la mucosa (Underdown, 1994; Brandtzaeg, 1994). En humanos, las células producen subclases de IgA: IgA_1 e IgA_2, y muestran diferencias regionales en su distribución. Por ejemplo las células de IgA_1, predominan sobre las de IgA_2 en el bazo, nódulos linfoides perifericos y en la mayoría de los tejidos mucosos, nódulos linfoides mesentericos, amígdalas, estomago y duodeno, el número de células productoras de las dos subclases son más equivalentes en glándulas lacrimales y la lactancia, e IgA_2 contiene células predominantemente en el intestino grueso y tracto genital femenino (Crago, 1984;

Kett, 1986; Kutteh, 1988). También ha sido reportado que la proporción de IgA_1 e IgA_2 varía en secreciones individuales (Underdown,1994). Estudios similares de células productoras de IgG en la mucosa del tracto respiratorio superior, así como en el íleon y el colon nos muestran que IgG_1 es la subclase predominante así como también lo es para muestras de suero (Brandtzaeg, 1994). Sin embargo las células de IgG_2 son generalmente más frecuentes que las células de IgG_3 en mucosa intestinal distante contrario a lo que con frecuencia se observa en el tracto respiratorio superior de la mucosa (Brandtzaeg,1994). Esta desigualdad en las subclases de IgG, soportan también la idea de que los cambios en las células B se diferencian en varias regiones del sistema inmune de la mucosa. La respuesta en suero de las subclases de IgG está bien documentada y puede ser influenciada por la naturaleza del antígeno estimulador (Papadeu,1989). Algunos carbohidratos, y antígenos bacteriales inducen preferentemente respuesta de IgG_2, en tanto que las proteínas, que son claramente antígenos dependientes de células T, generan una coordinada respuesta de IgG_1 e IgG_3 (Brandtzaeg,1994, Papadeu,1989). Factores regionales ambientales pueden contribuir a las diferentes proporciones de células productoras de subclases de IgG vistas en el tracto respiratorio superior y en la mucosa distal del intestino. Tal influencia ambiental es probable, que explique la desigualdad observada para células productoras de subclases de IgA y también el porque proteínas estimulan principalmente IgA_1 donde antígenos en forma de carbohidratos, particularmente un lipolisacarido de ***Escherichia coli,*** tiende a favorecer la respuesta de IgA_2(Brown,1985,Mestecky,1986;Tarkowski,1990). Se conoce poco acerca de la inmunoregulación, la desigualdad de ambas clases de IgD/IgM y las subclases de IgA_1/IgA_2 e IgG_2/IgG_3 los patrones de expresión se muestran por inmunocitos asociados a la mucosa en varias regiones del cuerpo, pero la microbiota local tiene un gran impacto (Brandtzaeg,1994).

La regionalización del sistema inmune de la mucosa es más evidente en la mucosa del tracto genital, que en los intestinos. En particular, diversas características básicas de la inmunidad en la mucosa intestinal no se presentan o son inconspicuas en el tracto genital, incluido el transporte de antígenos en células epiteliales (células M), nódulos linfoides de la mucosa, y el predominio de la inmunoglobulina IgA en secreciones. Diversos trabajos nos demuestran que las inmunoglobulinas IgA e IgG se presentan en las secreciones genitales y que el isotipo IgG parece ser la inmunoglobulina dominante(Parr,1994).

Diversos trabajos se han realizado para el diseño y desarrollo de vacunas aplicadas localmente. Regularmente las vacunas pueden ser aplicadas directamente en el espacio mucoso de relevancia, desde aquí existe un entrecruzamiento en la migración de algunas células T y B; y esto puede ser más convenientemente aplicado en el espacio mucoso de la nariz, en el intestino y con este apunte le confieren protección en otros sitios mucosos (Mestecky,1994;1987;Underdown1994;Mowat,1997).

El análisis de Western blot, ha sido utilizado en diversos parásitos protozoos, para identificar proteínas que puedan relacionarse con la inducción de la inmunidad del huésped. Se ha realizado la inmunodetección de los antígenos totales de ***E.histolytica*** transferidos a papel de nitrocelulosa con anticuerpos IgA presentes en muestras de suero y calostro de mujeres en puerperio y en muestras de suero de pacientes con el diagnóstico de absceso hepático amibiano. Se observo, que las adhesinas putativas no fueron reconocidas frecuentemente por IgA de los sueros puerperales y los calostros, en tanto que la IgA de los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano reconoció la de 118 kDa (112 kDa en otros estudios) en el 80 % de los casos (Berber; 1990). Diversos estudios, se han realizado donde analizan la respuesta inmune secretora en saliva de pacientes con amibiasis intestinal contra antígenos obtenidos de la membrana de ***E. histolytica***, el análisis de Western blot indica que la saliva de los pacientes contiene anticuerpos IgA secretorios contra antígenos de un rango de peso molecular de 170 a 24 kDa y demostraron que algunos de estos antígenos, también son reconocidos por sujetos sanos. No obstante, los antígenos de 170, 125, 46, y 37 kDa se reconocen con mayor frecuencia por IgA secretora de pacientes con amibiasis intestinal; que la de los pacientes sanos (Ortiz-Ortiz,1998). Por lo tanto, anticuerpos IgA de saliva, de ***E. histolytica*** pueden contribuir, al diagnosis de la amibiasis intestinal invasiva o asintomática, que coloniza el intestino en el humano y que puede inducir respuesta de IgA secretora. La actividad de anticuerpos de IgA secretora en humanos puede diferenciarse de la IgA sérica (Lue; 1994) porque el sistema inmune sistémico y secretor son en gran parte independientes (Czerkinsky; 1987). El sistema inmune secretor comprende sitios inductivos del tejido linfoide asociado a la mucosa y sitios efectores con células dispersas productoras de inmunoglobulinas. Se ha reportado, que anticuerpos secretores de ***E. histolytica*** se presentan en leche en humanos, y se ha propuesto que estos anticuerpos podrían ser evaluados en estudios epidemiológicos de la

amibiasis intestinal. Sin embargo, los anticuerpos de leche o calostro son relevantes solo en mujeres lactantes (Grundy M.S, 1983). Además de la IgA secretora, las secreciones humanas también contienen una cantidad variable de IgG (Tomasi, 1976), que sé considera usualmente derivada del suero. En efecto, anticuerpos séricos IgG parecen ser transportados a lo largo del epitelio de los pulmones (Pabst, 1992), y la mucosa nasal (Wagner, 1987). En suero, de pacientes con absceso hepático se ha encontrado una reacción predominante del isotipo IgG, con diversas bandas de PM aproximado de 250-150, 100, 80, 60, 35, 30, 20 kDa (Schulz T.F, 1987). Estudios similares, se han realizado con pacientes infectados con ***Giardia lamblia*** detectando la respuesta inmune secretora usando muestras de saliva, las principales proteínas reconocidas por los pacientes fueron de 170, 105, 92, 66, 32, 29, 14 kDa. Estos antígenos no fueron reconocidos por muestras de saliva de individuos sanos (Rosales-Borjas, 1998). Este tipo de ensayos puede ser importante en futuros estudios de protección en infecciones que se presentan por parásitos extracelulares. En este trabajo, se encontraron diferencias entre los antígenos amibianos reconocidos inmunodominantemente por anticuerpos de diferentes isotipos; en líquidos intestinales de intestino grueso se reconocieron mayor número de bandas y con mayor intensidad por el isotipo IgG, que en los de intestino delgado y en los líquidos intestinales de este último se reconocen mayor número de bandas y con mayor intensidad por el isotipo IgA, que en el intestino grueso. Los patrones de especificidad del isotipo IgG a antígenos de ***Streptococus pyogenes*** en suero y secreciones autologas se han comparado con el propósito de determinar si la IgG encontrada en secreciones humanas es exclusivamente de origen sérico o también puede ser producida localmente, por el sistema inmune sistémico. Los resultados indican que las mayores variaciones fueron observadas entre el suero y las secreciones, y también entre estas últimas, los resultados fueron a favor de la IgG asociada a la inmunidad local dentro del compartimento de diferentes tejidos indicando que la IgG local es normalmente producida por células largamente independientes del sistema inmune sistémico (Berneman, 1998). Recientemente se detectaron proteínas amibianas que fueron predominantemente reconocidas por anticuerpos IgG pero no por la inmunoglobulina IgM y viceversa (Moreno-Fierros,1996). Del mismo modo, en ***Toxoplasma gondii,*** 3 proteínas han mostrado reactividad con IgM humana, y otras 17 proteínas del parásito reaccionan solo con IgG inmune (Sharma,1983). Ciertas inmunoglobulinas son más eficientes que

otras en activar complemento o en receptores ligados a monocitos. La importancia de la inmunoglobulina IgA; el isotipo más predominante en secreciones, en la inmunoprotección contra patógenos en la mucosa, es bien conocida (Mestecky,1994;Biewenga,1993).

El papel de la respuesta inmune en la protección contra la amibiasis es aun incierto. Los modelos animales y la baja recurrencia de la amibiasis invasiva, apoyan la hipótesis de que la inmunización puede conferir inmunoprotección contra ***E. histolytica.*** Sin embargo los animales utilizados en dichos estudios presentan una marcada inmunidad natural contra la amiba (Kretschmer, 1990). La identificación y aislamiento de antígenos de ***E. histolytica*** efectivos como agentes inmunoprofilacticos es un prerrequisito para el diseño de una vacuna anti-amiba (Isibasi,1990). Sin embargo la mayoría de los trabajos en los que se han identificado antígenos amibianos inmunodominantes se han realizado utilizando sueros de pacientes con amibiasis invasiva (Espinosa-Cantellano, 1991). La identificación de las principales proteínas amibianas reconocidas por el suero de estos pacientes puede ser valioso para estudios epidemiológicos y para la elaboración de pruebas de serodiagnostico en la amibiasis (Joyce,1988;Aust-Kettis,1983;Kretschmer,1990). Sin embargo este enfoque puede ser engañoso para la identificación de antígenos inmunoprotectores relevantes tomando en consideración el hecho de que estos pacientes presentaron la enfermedad invasiva a pesar de tener altos niveles de anticuerpos contra estos antígenos amibianos inmunodominantes. Tal vez estos sujetos producen anticuerpos contra antígenos irrelevantes en el sentido inmunoprotector. De acuerdo con está especulación, en la mayoría de los portadores asintomaticos, que representan alrededor del 90 % de los individuos infectados con ***E. histolytica*** se cree que existe como comensal inofensivo en el intestino. Estas personas pueden tener inmunidad natural o adquirida, como en el ratón, en la infección amibiana; no obstante, no se han realizado comparaciones para determinar si el suero de individuos con amibiasis intestinal contienen anticuerpos contra diferentes proteínas amibianas que los que presentan enfermedad invasiva. Los niveles y la especificidad de anticuerpos locales, en estos individuos son desconocidos. Este tipo de estudios puede realizarse, tomando en consideración la importancia del suero y los líquidos intestinales de estos portadores que podrían usarse para la identificación de antígenos amibianos inmunoprotectores. Modelos animales apoyan el concepto que con la inmunización con ***E. histolytica*** puede proveer protección contra la amibiasis invasiva. Sin

embargo los animales usados en estudios semejantes muestran un remarcado grado de inmunidad natural a *E. histolytica* (Kretschmer,1990).

No obstante, nuestros resultados demuestran que la respuesta inmune entre el intestino delgado y grueso está compartamentalizada en los sitios efectores de la mucosa, y las diferencias que se observaron en el patrón de antígenos amibianos de líquidos intestinales de intestino delgado y grueso apoyan la regionalización de la respuesta inmune intestinal. En intestino grueso se observo un mayor número de bandas reconocidas por IgG de 220, 140,121, 108,41.5 (estas dos últimas se reconocieron con mayor intensidad) 37, 35, 34 kDa y en intestino delgado se observo un mayor número de bandas reconocidas por el isotipo IgA que reconoció preferentemente las proteínas de 260, 101, 76 y 59 kDa, por las rutas de inmunización IP, IM, R y O; y una proteína de 227 kDa por las vías IM, R y O; en lo que se refiere al isotipo IgG, se reconocieron por la vía IP, IM, y R; exclusivamente las proteínas de 187, 160 kDa, la ruta R, reconoció la de 128, 73 kDa, que no son reconocidas por IG, sin embargo este último reconoció de manera inmunodominante las proteínas de 220, 108, 55, 37, 35, 34 por la ruta R; y de 140, 121 y 28 kDa por la vía IP, en el isotipo IgG. De la misma manera, a lo observado en el análisis del ELISA se confirmo que la vía de inmunización IM, tanto en ID como en el IG tuvo una mayor respuesta y un mayor reconocimiento de proteínas amibianas que la vía local (O) para los isotipos IgA e IgG respectivamente. Estos resultados, nos demuestran que para valorar los estudios diseñados para la futura elaboración de vacunas en el espacio mucoso se debe de enfatizar la importancia de incluir, el análisis individual de anticuerpos de diferentes isotipos en las muestras de la mucosa donde residen los distintos agentes infecciosos, con el objeto de evaluar exactamente si el candidato a vacuna induce respuesta de anticuerpos con un alto valor protector en los sitios adecuados, en lugar de limitar el análisis de la respuesta de anticuerpos totales en suero, o respuestas de muestras mucosas distantes que podrían no reflejar exactamente la clase de respuesta producida en el espacio mucoso donde los agentes infecciosos atacan. En el caso de la amibiasis intestinal, este tipo de estudios, son de vital importancia; para el desarrollo de vacunas porque incluyen el análisis de la respuesta de anticuerpos de diferentes isotipos en muestras de intestino grueso que pueden brindar protección en el espacio mucoso donde este parásito reside con más frecuencia y con eso prevenir el avance hacia la enfermedad invasiva.

CONCLUSIONES

•Se demostró que existen diferencias en la respuesta de anticuerpos anti-amiba entre ID e IG, ya que en el ID predominó la respuesta de IgA; mientras que en el IG la respuesta de anticuerpos fue similar, sin encontrarse diferencias entre los isotipos analizados.

•Se demostró que mediante la inmunización sistémica (IM) con TFG se inducen elevadas respuestas de anticuerpos anti-amiba, mayores que los inducidos por la vía O y menores que los producidos por las vías R e IP en suero, intestinos delgado y grueso.

•El análisis por inmunotransferencia demostró que los sueros de los ratones inmunizados por las vías R, IP, IM y O reconocen un gran número de proteínas amibianas;

•Los pesos moleculares de las principales proteínas amibianas reconocidas por anticuerpos séricos fueron 230-220,190,194,84,56 y un doblete de 25-24 kDa; este último es reconocido de manera inmunodominante por IgG en las rutas R, IP e IM.

•Los anticuerpos de líquidos intestinales de ID e IG en comparación con el suero, reconocieron un número menor de bandas y con menor intensidad, aunque ambos reconocen el doblete que se presenta también en suero.

•El análisis por inmunoblot, también confirma una mayor respuesta de la vía IM en el reconocimiento de antígenos amibianos en él ID, e IG que el que presento la ruta O.

•Se demostró que existen diferencias en el patrón de antígenos amibianos reconocidos por líquidos intestinales de ID, que reconoció preferentemente proteínas amibianas por el isotipo IgA y en IG sé, reconocieron mayor número de bandas y con mayor intensidad por el isotipo IgG.

•Se demostró que existen diferencias en el patrón de antígenos amibianos reconocidos de manera inmunodominante, a nivel local y sistémico por anticuerpos IgA, IgG e IgM.

•Estos datos en conjunto indican que existe una regionalización de la respuesta inmune intestinal anti-amiba.

BIBLIOGRAFIA

•ABBAS K. A; LICHTMAN H.A. POBER S.J. (1994) Cellular and Molecular Immunology. WB.Saunders Company. United States of America. p.p 256-264.

•AUST-KETTIS. A, THORSTENSSON R. AND UTTER G., (1983). Antigenicity of *Entamoeba histolytica* strain NIH 200: A survey of clinically relevant antigenic components. Am J. Trop. Med.Hyg. **32**:512-522

•BERBER AC, ESCOBAR A, ZAMORA M, ACOSTA G. (1990) Identification of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgA class human antibodies in sera and calostra of puerperal women using immunoblotting techniques. Arch. Invest. Med **21** Suppl 1:97-101.

•BERNEMAN A, BELEC L, FICHETTI V.A., and BOUVET J.P (1998). The Specificity Patterns of Human Immunoglobulin G Antibodies in Serum Differ from Those in Autologous Secretions. Infection and Immunity. Vol.**66(9)**: 4136-4168.

•BEVING D.E, SOONG C J & RAVDIN J I. (1996) Oral immunization with a recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has in vitro adherence inhibition activity. Infection and Immunity **64**: 1473-1476.

•BIEWENGA J; VAN REES E.P and SMINIA T. (1993). Clin Immunology Immunopathology. Induction and regulation of IgA responses in microenvironment of gut. **67**:1-7.

•BRANDTZAEG P. (1994) Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.e. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienestock (Eds). 251-261, Academic Press Inc.

•BROWN T.A. and J. MESTECKY (1985) Immunoglobulin A Subclass Distribution of Naturally Occurring Salivary Antibodies to Microbial Antigens. Infect. Immunol. **49**: 459-462.

•CARRERO J C, DIAZ M Y, VIVEROS M et al. (1994). Human secretory immunoglobulin A anti- *Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. Infection and Immunity. **62**: 764-767.

•CERECEDO-CORTINA,B.V. CERECEDO, O.J.F. Y CASTILLO, R.G. (1996). Amibiasis : Estudios endoscópicos. Acta Médica. **31**: 21-27.

•CZERKINSKY, C., PRINCE S.J., MICHALEK S.M, JACKSON S, RUSELL, M.W, MOLDOVEANU Z, McGHEE J.R., and MESTECKY J. (1987). IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**:2449-2453.

•CHILDERS N. K; BRUCE M.G. and McGHEE J. R. (1989). Molecular mechanisms of immunoglobulin A Defense Annual Review of Microbiology. **43**:503-536.

•CIESLAK P R, TONGHAI Z & STANLEY J S. L. (1993) Expression of a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen in a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. Vaccine **11**: 773-776.

•CRAGO S.S., W.H. KUTTEH, I MORO, M.R. ALLANSMITH, J RADL, J.J. HAAIJMAN AND J MESTECKY.(1984) Distribution of IgA 1-, IgA 2- and J Chain-containing cells in Human Tissues. J. Immunol. **132**: 16-18.

•COFFIN,S.E, C.A.MOSER, S. COHEN, H.F. CLARK AND P.A. OFFIT. (1997). Immunologic correlates of protection against rotavirus challenge after intramuscular immunization of mice.J.Virol **71**:7851-7856.

•CONNER,M.E., S.E. CRAWFORD, C.BARONE AND M.K. ESTES.(1993).Rotavirus vaccine administered parenterally induces protective immunity.J.Viro.167:6633-6641.

•DIAMOND L.S; HARLOW DR. CUNNICK CC. (1978). A new medium for the axenic cultivation *of Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432.

•ESPINOSA-CANTELLANO M. and MARTINEZ-PALOMO. (1991). The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dinamics. Bioll. Cell. 72: 89-100

•GARCIA-MANZO, N.T. (1990). Clinical spectrum of amebiasis in adults. In Kretschmer, R.R. Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica.* CRC Press Boca Raton, Florida. U.S.A. pp.191-208.

•GÓMEZ, A.A.V. SOTO, H.B. RIVERA, G.J.L. Y GONZÁLEZ, S.E. (1995) Tratamiento del absceso hepático amibiano en niños. Revisión de 20 casos. Rev. Med. IMSS (Méx.); 33: 67-72.

•GRUNDY MS, CARTWRIGHT-TAYLOR L, LUNDIN L, THORS C, HULDT G. (1983) Antibodies against Entamoeba histolytica in human milk and serum in Kenya. J Clin Microbiol. 17: 753-758.

•HAM.A.W.(1975).Tratado de Histología.Ed.Interamericana.Septima Edición.México.D.F. pp.608-610

•HANEBERG B, KENDALL D, AMEROGEN H.M., APTER F.M., KRAENBUHL J.P., and NEUTRA M.R. (1994) Induction of Specific Immunoglogulin A in the small Intestine, Colon-Rectum, and Vagina Measured by a New Method for Colection or secretions from Local Mucosal Surfaces. Infect. Immun. 62: 15-23.

•HOPKINS S, KRAEHENBUHL J.P, SCHEDEL F, POTTS A, PETERSON D, DE GRUNDI P and NARDELLI-HAEFLIGER D. (1995). A recombinant Salmonella typhimurium Vaccine Induces Local Immunity by Four Different Routes of Immunization. Infect. Immun. **63**:3279-3286.

•ISIBASI I, and KUMATE J, (1990). Amebiasis: Infectious and Disease by *Entamoeba histolytica.* R.R. Kretschmer (Ed), 61-79, CRC Press, Boca Raton.

•JACKSON R.J, K. FUJIHASHI, J. XU-AMANO, H. KIYONO, C.O. ELSON and J.R. McGHEE. (1993) Optimizing Oral Vaccines: Induction of Systemic and Mucosal B-Cell and Antibody Responses to Tetanus Toxoid by Use of Cholera Toxin as an Adjuvant. Infect. Immun. **61**:4272-4279.

•JOYCE P. and RAVDIN J.I. (1988). Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from Liver Abscess patients. Am. J.Trop.Med. Hyg. **38**:74-80.

•KAGNOFF M. F. (1996) Mucosal immunology: new frontiers. Immun Today **17**:57-59.

•KETT K., P. BRANDTZAEG, J. RADL and J. HAAIJMAN, (1986) Different subclass distribution of IgA-Producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. J. Immunol. **136**: 3631-3635.

•KRETSCHMER R.R. (1986). Immunology of amebiasis. In "Amebiasis Human Parasitic Diseases Series.Vol.2".(A.Martinez- Palomo, Ed) pp 95-167. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

•KRETSCHMER R.R. (1990). Amebiasis: Infectious and Disease by *Entamoeba histolytica.* R.R. Kretschmer (Ed), 59-, CRC Press, Boca Raton.

•KRETSCHMER R.R. (1990). Immunology of Amebiasis. Introduction. In Amebiasis. pp 59 CRC Press. USA.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

•KROESE F.G.M, A.B. KANTOR and L.A. HERZENBERG. (1994) Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.e. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienestock (Eds), 217-223, Academic Press Inc.

•KUTTEH W.H., K.D. HATCH, R.E. BLACKWELL and J. MESTECKY. (1988) Secretory immune system of the female reproductive tract.I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. Obstet. Gynecol. 71: 56-60.

•LAEMMLI,U.K.(1970).Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage.Nature. 227:680-685.

•LEESON,C.R. LEESON,T.S.PAPARO,A.A.(1987).Histología.Ed.Interamericana.Quinta Edición.México D.F. pp. 346-348.

•LEHNER T.C, L.A. PANAGIOTIDI, T. BERGMEIER, R. PING, BROOKES and S.E. ADAMS. (1992) A comparison of the immune response following oral, vaginal, or rectal route of immunization with SIV antigens in nonhuman primates. Vaccine Res. 1:319-330.

•LUE,C., VAN DEN WALL BAKE, A.W.L., PRINCE S.J. et al. (1994). Intraperitoneal immunization of human subjets with tetanus toxoid induces specific antibody-secreting cells in the peritoneal cavity and in the circulation, but fails to elicit a secretory IgA response. Clin. Exp. Immunol. 96:356-363.

•LYCKE N.(1986) A sensitive method for Detection of Specific Antibody production in Different Isotypes from single Lamina Propria Plasma Cells. Scan. J. Immunol. 24: 393-403.

•MESTECKY J. and MW. RUSSELL (1986) IgA subclasses. Monogr. Allergy. 19:277-301.

•MESTECKY J. and J.R. McGHEE. (1987) Immunoglobulin A (IgA): Molecular and Cellular Interactions Involved in IgA Biosynthesis and Immune Response. Adv. Immunol.**40**:153-254.

•MESTECKY J. and McGHEE J.R. (1989). Oral immunization: past and present. Current Topics in Microbiology and Immunology. **146**:1-11

•MESTECKY J, ARAHAM R and OGRA P.L. (1994). In handbook of mucosal immunology. (PL OGRA, W STROBER, J MESTECKY M LAMM Mc GHEE JR and BIENESTOCK Ed) pp 357-371. Academic Press Inc, USA.

•MILLER C.J; McGHEE J.R. and GARDNER M.B. (1992). Biology of disease. Mucosal immunity, HIV transmission, and AIDS. Lab. Invest. **68**: 129-145.

•MORENO-FIERROS L.,DOMINGUEZ-ROBLES M.C. and ENRIQUEZ RINCON F. (1994). The use of an ELISPOT assay to evalute intestinal and systemic antibody responses to local administered *E. histolytica* in mice. Arch. Med Res **25**:183-187.

•MORENO-FIERROS L.,DOMINGUEZ- ROBLES M.C. and ENRIQUEZ RINCON F. (1995). "*Entamoeba histolytica*: Induction and isotype analysis of antibody producing cell responses in Peyer's patches and spleen after local and systemic immunization in male and female". Exp. Parasit. **80**:541-549.

•MORENO-FIERROS L.,DOMINGUEZ-ROBLES M.C. and ENRIQUEZ RINCON F. (1996)."Quantification and Isotype analysis of the serum anti-amebic Response produced after Mucosal and Systemic immunization in Male and Female Mice".Folia Biol.(Phra).**42**:28-32.

•MORENO-FIERROS L, DOMINGUEZ-ROBLES M.C. and ENRIQUEZ-RINCON F. (1996).Immunodominant *Entamoeba histolytica* antigens recognized by serum and intestinal antibodies after local or systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. Life Sci. Vol.59:1283-1295.

•MOWAT A.M.I. and J.L.VINEY. (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol. Rev. **156**: 145-166.

•NEDRUD J.G, X.P. LIANG, N. HAGUE and M.E. LAMM. (1987) Distribution of Poliovirus Antibody in Serum, Nasopharinx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. J. Immunol. **139**:3484-3492.

•OGRA P.L, and T. KARZON. (1969) Distribution of Poliovirus Antibody in Serum, Nasopharinx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. J. Immunol. **102**: 1423-1430.

•ORTIZ-ORTIZ L, MORÁ N; ZAMBRANO-VILLA SA, CARRERO JC, SANCHEZ-ZERPA M, OSUNA A, ROSALES-BORJAS DM. (1998). Secretory immune response in patients with intestinal amoebiasis. **20 (10)**: 503-507.

•PABST. R, (1992). Is BALT a major component of the human lung immune system?. Immunol. Today **13**: 119-122.

•PAPADEAU C. and I.J. CHECK. (1989) Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: Biochemical, genetic and clinical aspects. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **27**: 27-58.

•PARR M.B, and E.L. PARR. (1994) Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.e. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienestock (Eds), 677-689, Academic Press Inc.

•PHILLIPS J.M, QUAGLIATA and M. E. LAMM. (1994) Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.e. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienestock (Eds), 225-239, Academic Press Inc.

•PIERCE N, and J GOWANS. (1975) Cellular Kinetics of the intestinal Immune response to Cholera toxoid in Rats. Exp. Med. **2**:1550-1563.

•RICHMAN,L.K,GRAEFF AS,STROBER W.(1981).Antigen presentation by macrophage-enriched cells from the mouse Peyer's patch.Cell Immunol.**62**:110.

•ROITT M. I. (1994). Essential Immunology. Blackwell Scientific publications. Australia.

•ROSALES-BORJAS DM, DIAZ-RIVADENENEYRA J., DONA-LEYVA A., ZAMBRANO-VILLA SA, MASCARO C, OSUNA A, ORTIZ-ORTIZ L. (1998). Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. Infection Immun. **66(2)**:756-759.

•RYAN E T, BUTTERTON J R, ZHANG T et al. (1997). Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V.cholerae* antibody responses in mice. Infection and Immunity **65**: 3118-3125.

•SCHULZ TF, KOLLARTSCH H, HENGSTER P, STEMBERGER H, SCHEINER O, WIEDEMANN G, DIERICH MP. (1987). Molecular weight analysis of Entamoeba histolytica antigens recognized by IgG and IgM antibodies in the sera of patients with amoebiasis. **38 (3)**: 149-152.

•SHARMA D, MULLENAX J, ARAUJO F.G., ERLICH H.A, AND REMINGTON J,. (1983). Western blot analysis of the antigens of Toxoplasma gondii recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immunol. **130**: 2407-2412.

•SCICCHITANO R, A. STANISZ, P. ERNST and J. BIENESTOCK. (1988) Migration and Homing of Lymphoid Cells A. J. Husband (Ed), Vol.II, 3-34, CRC Press, Boca Raton .

•SHALABY W.S.W. (1995). Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: Barriers and Novel strategies. Clin. Immun. Immunopath. **74**:127-134

•SMINIA. T,VAN DER BRUGGE-GAMELKOORN G.J,JEURISSEN SHM.(1989).Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT).Critical Review in immunology.Vol 8, pp 119-150.Boca Raton, FL:CRC Press.

•SNELLER. MC, STROBERW.(1986).M cells and host defense.J.Infect.Dis.**154**:737.

•STANLEY,S.L,Jr.(1996).Progress towards an amebiasis vaccine.Parasitol.Today.**12**:7-13.

•STITES,P.DANIEL,ABBA I. TERR.(1993).Inmunología humana y básica.Manual Moderno.Primera Edición.México D.F.pp.279-297.

•STROBER W. and BROWN W.R. (1988). The mucosal Immune System In "Immunological Diseases" (M. Samster, De), pp .79-139. Little Brown and Co, Boston.

•SULTAN F, JIN L L, JOBLING M G et al. (1998) Mucosal immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A2 domain of cholera toxin. Infection and Immunity. **66**: 462-468.

•TARKOWSKI, C.LUE, Z. MOLDOVENAU, H. KIYONO, JR McGHEE AND J MESTECKY.(1990) Immunization of humans with polysaccharide vaccines induces systemic, predominantly polymeric IgA2-subclass antibodie response. J. Immunol. **144**: 3770-3778.

•TAY, J. GUTIÉRREZ, M. ALVAREZ, T. (1996). Frecuencia de las parasitosis intestinales en cuatro escuelas de Morelia, Michoacán. Rev. Fac. Med. (UNAM); **39**: 41-43.

•TOMASI Jr T.B. (1980) Oral tolerance. Transplantation **29**: 353-356.

•TOMASI Jr T.B. (1976) General characteristics of the secretory immune system. In Tomasi Jr T.B.(ed), The immune system of secretions. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. pp:6-12.

•TOWBIN H.,STACHELIN. T.,GORDON T.(1979).Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**76**:4350-4354.

•UNDERDOWN B.J, and SCHIFF JM. (1986). Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. Ann. Rev. Immunol. **4**: 389-397.

•UNDERDOWN B.J, and J. MESTECKY. (1994) Handbook of Mucosal Immunology, P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.e. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienestock (Eds), 79-97, Academic Press Inc.

•VILLAREALL BB, MELENDRO EI, RAMOS F, XIMENEZ C.(1992). Local and systemic antibody response in Balb/c mice immunized with *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch Med Res.**23(1)**:69-72.

•WAGNER D.K., CLEMENTS M.L., REIMER C.B., SNYDER M, NELSON D.L., and MURPHY B.R. (1987). Analysis of immunoglobulin G antibody responses after administration of live and inactivated influenza A vaccines indicates that nasal wash immunoglobulin G is a trasudate from serum. J. Clin. Microbiol. **25**: 559-562.

•WALSH J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238.

•WEBB T.H, LILLEMOE K.D and PITT H.A.(1989). Liver Abscess. Hosp. Physician. 25:46-54.

•ZHANG.T., SAMUEL.L,STANLEY Jr.(1996). Oral immunization with an Attenuated Vaccine Strain of *Salmonella typhimurium* Expressing the Serine-Rich *Entamoeba histolytica* Protein induces an Antiamebic Immune Response and Protects Gerbils from Amebic Liver Abscess. Infection and Immunity.Vol.**64** No.5:1526-1531.

APENDICE

Geles de poliacrilamida al 10 %.

	Gel Separador. (15ml.)	Gel Concentrador (5ml)
Acrilamida 30 %	5 ml	850 µl
Bisacrilamida	2 ml	350 µl
Tris 1M (pH 8.8)	5.6 ml	620 µl
SDS 20%	75 µl	25 µl
H_2O	2.2 ml	3.4 ml
Temed	6.5 µl	5 µl
APS (persulfato de amonio) 10%	45 µl	25 µl

Solución de Laemmli (Amortiguador de muestra 5 x)

Trizma base	2.44 g
H_2O	25 ml
ph(ajustarlo)	6.8
SDS	5 g
Glicerol	5 ml
Azul de bromofenol	0.05 g

***Aforar a 50ml. Preparación de la muestra: A 500µl de la muestra (con 2 mg/ml) se le adicionan 125 µl del amortiguador de muestra y se hierve 2 min. Posteriormente se agrega β-mercaptoetanol para una concentración final del 5 % (31µl) y se hierve 1 min. más.**

Amortiguador de corrida

Glicina	14.42 g/l
Tris	3.03 g/l
SDS	1 g/l

***Amortiguador Tris-Glicina 25 mM (pH 8.3) conteniendo glicina 250 mM y SDS al 10 %.**

Solución para teñir

Etanol 50 %	125 ml
Ácido acético 50 %	25 ml
H_2O 40 %	100 ml
Azul de Comassie 0.1 %	0.25 g

Solución para desteñir

Acido acético	100 ml
Metanol o Etanol	100 ml

Solución Amortiguadora de transferencia

Glicina		11.5 g/l
Trizma base		2.46 g/l
Metanol		200 ml
H_2O	cbp	1 litro

Solución de tinción transitoria

Acido acético	2 %
Rojo Ponceau	0.5 %

***Disolver 0.5 g de Rojo Ponceau en 1 ml de ácido acético glaciar, y aforar a 100 ml de agua destilada.**

Buffer de fosfatos salinos PBS (10 x)

NaCl (.14 M)	80 g
KCl (1 mM)	2 g
KH_2PO_4 (1.5 mM)	2 g
$NaHPO_4$ (8.1 mM)	11.46 g

PBS Tween 0.05 %

0.5 ml de PBS-Tween aforar a un litro de agua destilada.

Azul de Comassie

Etanol o Metanol	10 ml
Ácido acético	10 ml
Azul de Comassie	0.1 %

***Aforar a un litro de agua destilada.**

Solución DAB/$NiCl_2$

Disolver 20 mg de DAB en 100ml de PBS 1:3 y tapar con papel aluminio, agitar 15 min. agregandole 30 mg de cloruro de niquel y 30mg de cloruro de cobalto; disolver en 3 ml de H_2O y agregar gota a gota a la DAB (posteriormente se mezcla y se filtra). Se prepara una solución de 33 µl de H_2O_2 y 967 µl de H_20, se le agregan 0.5 ml a la solución anterior.