



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

EFFECTO DE LA TOXINA DEL COLERA EN LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL Y SISTEMICA ANTI-Entamoeba histolytica. EN RATONES Balb/c.

278935

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOLÓGICO PRESENTA: ANGELICA MA. MARTINEZ HURTADO



ASESOR: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo en la Unidad de Morfofisiología y Función de la ENEP-*Iztacala*. UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros

Durante la realización de dicho trabajo se recibió el apoyo de CONACyT 0797-13453 PN y PAPIIT DGAPA IN-209198

*<< Ustedes saben que los jefes de las
naciones se portan como dueños de ellas
y que los poderosos las oprimen*

*Entre ustedes no será así; al
contrario, el que aspire a ser
más que los demás,
se hará servidor de ustedes.*

*Y el que quiera ser el primero, debe
hacerse esclavo de los demás.*

*A imitación del Hijo del hombre, que
no vino para que lo sirvieran, sino
para servir y dar vida
como rescate de una muchedumbre.>>*

Dedicatorias

A mis padres:

José Martínez y María Hurtado de Martínez, por haberme otorgado la vida, y sobre todo por el gran sacrificio que hicieron al darme una carrera Universitaria. Porque este trabajo no lo hubiera realizado sin su ayuda...

LOS AMO.

A mis hermanos:

José, Jesús, Martín, Andrés, Carlos y Miguel A. Por alentarme para superarme día con día, por sus consejos y por su valiosa ayuda.

Les dedico este trabajo muy especialmente...

.. Gracias.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a DIOS, el haberme permitido vivir y el poder disfrutar de todo cuanto ha hecho en este mundo.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su asesoría y valiosa ayuda.

A mis amigos de la carrera: Norma, Juan, Israel, Estela y Miriam; por brindarme su compañía, apoyo y haberme dado sus consejos siempre que los necesite durante la carrera y aún después.

A mis amigos del CBTiș 160: Verónica. E, Miriam, Juan Alfaro y Javier, por todos los momentos inolvidables.

A mis compañeros del laboratorio: Mónica, Rita y muy en especial a Aldo por su disponibilidad.

A Angel Lara por ser un gran Biólogo y compañero, así mismo por su desinteresada y valiosa ayuda en la realización de esta tesis.

Y sobre todo a una persona muy especial, por estar conmigo en los momentos más difíciles de superar y por comprenderme...

S. M. M | 7. 2. M

CONTENIDO

Indice de Figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
I. Introducción	1
1.1 Antecedentes Generales	
1.2 Antecedentes directos	
II. Objetivos	11
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Particulares	
III. Estrategia Experimental	12
IV. Material y Métodos	13
V. Resultados	21
VI. Discusión	31
VII. Conclusiones	42
VIII. Apéndice	44
IX. Bibliografía	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la toxina del cólera.

Figura 2. Estrategia experimental.

Figura 3. Esquema de la técnica de ELISA indirecto.

Figura 4. Gráficas de la respuesta de anticuerpos anti-amiba en suero.

Figura 5. Gráficas de la respuesta de anticuerpos anti-amiba en el líquido intestinal.

Figura 6. Gráficas de la respuesta de anticuerpos anti-amiba en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos intraepiteliales.

Figura 7. Gráficas de la respuesta de anticuerpos anti-amiba en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos de la lámina propia.

Figura 8. “Immunoblot” que muestra el reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos de clase IgG.

Figura 9. “Immunoblot” que muestra el reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos totales.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difisfato.
APCs	Células presentadoras de antígenos.
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CT	Toxina del cólera.
CTA	Toxina del cólera subunidad A.
CTB	Toxina del cólera subunidad B.
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetracético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino.
GMI	Monogangliosido.
HA	Virus de la influenza inactivado
HBc	Virus de la hepatitis B.
HbsAg	Antígenos de superficie de la hepatitis B.
Ig's	Inmunoglobulinas.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina B.
IgM	Inmunoglobulina M.
ID	Intestino delgado.
IEP	Células intraepiteliales.
IG	Intestino grueso.
I.P	Intraperitoneal.
I.M	Intramuscular.
I.N	Intranasal.
ISCOMS	Complejos inmunoestimuladorio.
Kda	Kilodaltones.
KLH	Hemocianina.
L.P	Lámina propia.
LPS	Lipopolisacaridos.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
OVA	Ovoalbúmina.
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos.
PBS-T	Solución amortiguadora con fosfatos y Tween.
PHMB	Parahidroximetil benzoato.
P.P	Placas de peyer
Pnup 27F	Polisacarido de Streptococcus pneumoniae tipo 27F
rCTB	Toxina del cólera subunidad B recombinante
R	Rectal.
S	Suero.
SNTS	Sobrenadantes.
SFB	Suero fetal bovino.
TFG	Trofozoitos fijados con glutaraldehído
T.T	Toxoide tetánico.
V	Venosa

RESUMEN

En estudios previos se han descrito los efectos de la toxina del cólera (CT) sobre la respuesta inmune, pero esta se ha evaluado básicamente en modelos en los que se coadministra con antígenos solubles como la hemocianina (HLK) donde actúa como un potente inmunógeno y adyuvante en la respuesta intestinal de anticuerpos IgA e IgG a nivel sistémico, pero se desconoce el efecto que puede causar en la respuesta inmune humoral con un antígeno complejo como los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* fijadas con glutaraldehído (TFG). El objetivo del presente trabajo fue determinar si la toxina del cólera modifica el isotipo de la respuesta de anticuerpos anti-amiba y el patrón de antígenos amibianos reconocidos a nivel local y sistémica. Los ratones recibieron 4 inmunizaciones de 500, 000 TFG con y sin 10ug de CT. La CT se coadministró con los TFG por las vías oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM) en ratones Balb/c; la respuesta de anticuerpos se analizó por el método de ELISA indirecto y el patrón de antígenos amibianos reconocidos por el método de "immunoblot" en muestras de suero (S), líquidos de intestino delgado (ID) y grueso (IG) así como en los sobrenadantes de cultivos de células de lámina propia (SNTS L.P) e intraepiteliales (SNTS IEP). Los resultados indican que la toxina del cólera no tuvo efecto en la respuesta inmune sistémica inducida por la administración local y sistémica de TFG. Ya que no incremento la magnitud de la respuesta de anticuerpos de los diferentes isotipos, ni modifico el patrón de antígenos reconocidos predominantemente en suero. Sin embargo en líquidos del ID hubo un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos IgA, siendo mayormente favorecida que los isotipos restantes. El efecto de la toxina del cólera en la respuesta de anticuerpos varió dependiendo de las rutas de inmunización y del isotipo. Además se observaron marcadas diferencias en la respuesta de anticuerpos tanto a nivel de ID e IG. Por la vía intramuscular la CT incremento la respuesta de IgA e IgM en ID así mismo IgM en IG. Por la vía oral la CT incremento la respuesta de IgG en IG. Por otra parte en sobrenadantes de linfocitos intraepiteliales la CT no presento ningún efecto en la respuesta de anticuerpos. Para el caso de sobrenadantes de la lámina propia se observo un efecto adyuvante de CT al incrementar la IgM por la vía IP, tanto a nivel de ID e IG. El análisis por "immunoblot" mostró que por la vía oral CT, modifico el patrón de reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos séricos los cuales reconocieron un número mayor de bandas con gran intensidad. Además, tanto en suero como en SNTS de LP e IEP de ID e IG la CT modifico el patrón de reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos de clase IgG. Ya que por la vía oral con la toxina del cólera se reconoció predominantemente una proteína de 97 kDa por anticuerpos IgG, del mismo modo observamos que al emplear dos vías distintas de inmunización con anticuerpos totales el reconocimiento de antígenos varia. Nuestros resultados indican: 1) La respuesta inmunointestinal esta compartamentalizada a nivel de los sitios efectores e inductores, 2) que el efecto adyuvante de la toxina del cólera vario del isotipo analizado, así como

de la vía de inmunización, y 3) que por la vía oral la CT modifica la inmunogenicidad de las proteínas ambientales predominantemente por anticuerpos IgG a nivel sistémico e intestinal.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES.

Una de las principales causas de muerte a nivel mundial se le atribuye a las enfermedades infecciosas, tales como; respiratorias, genitourinarias y diarreicas que ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en países subdesarrollados. Estas enfermedades son causadas por patógenos adherentes que colonizan y dañan las superficies mucosas.

La mayoría de los agentes infecciosos, virales, bacterianos o parasitarios, penetran al organismo por las superficies mucosas. Sin embargo a pesar de que la importancia de la IgA en la protección inmune local los mecanismos por los cuales se establece y se regula la respuesta en las superficies mucosas son en gran parte especulativos. El concepto del sistema inmune común de mucosas explica la observación de una respuesta inmune originada en una superficie mucosa, la cual no solo resulta a nivel del sitio de estimulación, sino también en las superficies mucosas distantes, y ésta no necesariamente está ligada con una fuerte respuesta inmune sistémica (Mestecky, y cols, 1994). En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a mucosas se puede dividir en tres compartimentos: agregados linfoides organizados como son las placas de Peyer y los folículos linfoides aislados, tejido linfoide difuso (lámina propia) y linfocitos intraepiteliales. Se cree que la estimulación de la inmunidad de mucosas ocurre en los agregados especializados de tejido linfoide denominados colectivamente tejido linfoide asociado a los bronquios y al intestino (BALT y 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. De esta forma, por la estimulación antigénica de las placas de Peyer (PP), las células B productoras de IgA y células 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, y cols, 1993; Miller, y cols, 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. Numerosos trabajos se han enfocado en diseñar estrategias de inmunización oral, sin embargo, las vacunas orales tienen la limitante de que se requieren dosis múltiples para estimular y mantener la respuesta inmune. Las estrategias de inmunización oral incluyen la conjugación química, el acoplamiento de antígenos a la toxina del cólera (CT) 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 polímeros naturales y sintéticos y la incorporación de antígenos a liposomas (Mesteckey, y cols, 1994; Kagnoff, 1996). Además, los esfuerzos para estimular la inmunidad por la vía oral, pueden inducir tolerancia (Shalaby, 1995). La eficacia de la inducción de la respuesta inmune en las mucosas depende de la interrelación entre las propiedades fisicoquímicas del antígeno, el ambiente gastrointestinal, la presencia de adyuvantes y la forma de administración (Shalaby, 1995). La comprensión de como estos factores alteran la inmunogenicidad de un antígeno en particular será crítica para la optimización de la estimulación de la respuesta inmune en las mucosas.

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 CT, son menos efectivos que los particulados para la inducción de la respuesta inmune en las mucosas. Este fenómeno se atribuye a las diferentes rutas de entrada del antígeno y a diferencias subsecuentes en los tipos celulares involucrados en el procesamiento del antígeno. Los antígenos particulados pueden ser captados por las células M, especializadas en la captación de antígenos, del epitelio que recubre a las PP, y en el interior de la placa ser procesados por macrófagos y células dendríticas. En cambio los antígenos solubles administrados por vía oral, inducen tolerancia en vez de respuesta, lo cual se atribuye a que debido a la

degradación por las enzimas digestivas solo pueden captarse péptidos, o a una captación menos eficiente por las PP y en cambio pueden captarse 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, y cols, 1993). La comprensión de como se captan los antígenos en las superficies mucosas es fundamental para entender como se induce la respuesta inmune en las mucosas. Recientemente se ha considerado que las células epiteliales que recubren a las superficies mucosas, podrían actuar como células presentadoras de antígeno por su capacidad de captar antígenos solubles, presentarlos y activar células T CD8+ (Kagnoff 1996).

La CT es una de las proteínas solubles más inmunogénicas a nivel de las mucosas, que además posee propiedades adyuvantes en ellas cuando se coadministra con proteínas solubles contra las que de manera individual no se logran inducir respuestas inmunes. Esta enterotoxina es producida por el *Vibrio cholerae*, y está conformada por dos clases de subunidades una subunidad A tóxica (PM=27,215 Da), unida covalentemente a la subunidad B (PM=11,677 Da). La subunidad CTB, es un homopentámero que se adhiere al epitelio intestinal y a otras células de la superficie que presentan a su receptor, el gangliósido GM1. Esta unión induce cambios conformacionales en la membrana celular, permitiendo la entrada de la subunidad A, la cual inicia su actividad proteolítica ocasionando la ADP ribosilación y activación de la adenil ciclasa, originando un incremento del AMP cíclico (cAMP) intracelular. Como consecuencia de esto y otros factores asociados al incremento de las prostaglandinas de las células dañadas se provoca un desequilibrio en la bomba de sodio-potasio, provocando un flujo masivo de agua y electrolitos que se acumulan en el lumen intestinal, y posteriormente muerte celular (Lycke, N. 1991; Nocerino, A. 1995). Una vez observado dicho efecto se realizaron investigaciones en las que se inmunizaba con la CT acoplada a un antígeno por vía oral, observando un aumento en la producción de IgA en las secreciones. Por lo que se llego a la conclusión de que la CT puede fungir como un buen inmunógeno y adyuvante en modelos de inmunidad en las mucosas (Elson, y cols, 1995)

La resistencia y susceptibilidad hacia ciertos parásitos se correlaciona con las subpoblaciones de células T. La selección entre inmunidad humoral o mediada por células depende de la forma del antígeno, de la ruta de inmunización y del adyuvante. Analizando predominantemente la respuesta humoral anti-amiba sin abordar la celular. Por ello, es necesario determinar si la respuesta inmune inducida por la inmunización con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* fijados con glutaraldehído (GFT), depende de la participación de las células Th1 o Th2. Acerca de la participación de las células Th en la amibiasis, únicamente se ha reportado que a nivel sistémico la lectina amibiana de 220 Da de PM, provoca la activación de las células Th2 (Talamás-Rohana, y cols, 1995). Pero, se desconoce que tipo de respuesta Th se induce durante la infección amibiana, aunque se sabe que otros parásitos inducen ya sea respuestas Th1 o Th2.

Los estudios recientes encaminados al desarrollo de vacunas mucosas, se han enfocado a tres aspectos principalmente: 1) Optimizar los sistemas de administración del antígeno, 2) Establecer rutas óptimas de su administración, así se han ensayado otras rutas de inmunización además de la oral, como la nasal y la rectal, obteniéndose en varios casos mayores respuestas, y 3) Tratar de manipular las respuestas de células Th1, Th2, linfocitos citotóxicos y anticuerpos del huésped. Se ha demostrado la importancia de la elección del vector de la vacuna o del adyuvante, para dirigir la respuesta del huésped, usando el toxoide tetánico (TT), como modelo. En animales inmunizados con péptidos del TT expresados en salmonelas recombinantes, la respuesta predominante fue Th1. En contraste, cuando el TT se administró con la CT como adyuvante las respuestas fueron Th2. La relevancia de manipular "in vivo" la respuesta inmune en las mucosas se ha apreciado en un modelo de ratón infectado con el virus respiratorio sincytial en el que se observó que la patología del pulmón era dependiente de la respuesta de citocinas del huésped (Kagnoff 1996). Se ha descrito a la toxina del cólera como el adyuvante mucoso más efectivo y mejor estudiado, sin embargo aún no se conocen bien los mecanismos responsables de su función adyuvante. Se ha reportado que la inmunización oral con hemocianina (KLH) junto con la CT y seguida de la inducción "in vitro" estimula tanto a las células T CD4+ productoras

tanto de linfocinas Th1, como Th2 (Hornquist, y cols, 1996). En contraste, Xu-Amano, y cols, (1993) reportaron que, "in vivo", la CT induce selectivamente las respuestas Th2 en ratones C57b1/6 inmunizados con el TT. Sin embargo, usando la CT sistémicamente como adyuvante para el mismo antígeno, estos autores encontraron la estimulación de células T CD4+ tanto de Th1 como de Th2, sugiriendo que la ruta de inmunización más que la presencia de CT era la responsable del patrón de linfocinas inducido.

La inmunización oral de la hemocianina más el adyuvante CT provoca mayor respuesta de células productoras de anticuerpos anti KLH y de la respuesta de células T CD4+ productoras de interferón gamma en lámina propia de ratones CD8-/- comparados con las respuestas de los ratones normales C57B1/6. Sin embargo no se encontraron diferencias en las respuestas sistémicas de células T y B hacia la KLH entre ratones CD8-/- y normales, sugiriendo que las células T CD8+ tienen una función de regulación negativa de las respuestas inmunes mucosas, la cual podría existir a nivel de los sitios inductores (placas de Peyer) o de los sitios efectores (lámina propia), o en ambos sitios en los ratones normales. De lo anterior, se puede apreciar que hay controversia en relación al papel modular de la toxina de cólera como adyuvante, sobre las respuestas de células Th, ya que no se sabe si el tipo de respuesta Th depende de la ruta de inmunización o del antígeno "per se".

ANTECEDENTES DIRECTOS

Para proveer protección contra la gran variedad de patógenos que invaden, vía alguna superficie mucosa, en diferentes sitios, sería ideal el poder diseñar estrategias de inmunización mediante las cuales se pudiera inducir IgA secretoria específica en los sitios deseados. La amibiasis; la infección causada por *E. 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 penetra al organismo vía las superficies mucosas. Los trofozoitos de este parásito son los que afectan al intestino grueso del humano causando disentería y de ahí pueden diseminarse a otros órganos como el hígado y provocar la amibiasis extraintestinal. El estudio de la respuesta inmune anti-amiba se ha enfocado al análisis de la respuesta inmune sistémica. En cuanto a la respuesta en las mucosas, en humanos, se ha realizado la detección de anticuerpos anti-amiba en heces, leche y saliva (Kretschmer 1986, 1989). En reportes previos (Moreno-Fierros, y cols, 1992a, 1992b, 1994, 1995, 1996a), analizó en el ratón, la respuesta inmune humoral intestinal y sistémica inducida por la administración local y sistémica de trofozoitos de *E. histolytica* fijados con glutaraldehído (GFT). Encontrando que por la administración local (intragástrica y rectal) o sistémica (intraperitoneal) se inducen respuestas de anticuerpos anti-amiba, de los tres isotipos mayoritarios (IgA, IgG e IgM), a nivel local (placas de Peyer y líquidos intestinales), y a nivel sistémico (en bazo y suero); Aunque la magnitud de dichas respuestas varió dependiendo de la ruta de inmunización. Se analizó también, la cinética de la respuesta anti-amiba después de una sola inmunización con GFT y al comparar las respuestas entre ambos sexos se encontró que en general la respuesta anti-amiba de las hembras fue significativamente mayor a la de los machos, lo cual podría ayudar a explicar la mayor prevalencia de amibiasis invasiva observada en hombres (Webb 1989).

El papel de la respuesta inmune contra la amibiasis es aún incierto. Los modelos animales y la baja recurrencia de la amibiasis invasiva, apoyan la hipótesis de que la inmunización podría conferir inmunoprotección contra *E.*

histolytica. Sin embargo los animales utilizados en dichos estudios presentan una marcada inmunidad natural contra la amiba (Kretschmer 1986, 1990). La identificación y aislamiento de antígenos de *E. histolytica* efectivos como agentes inmunoprolácticos es un prerrequisito para el diseño de una vacuna anti-amibiana (Isibasi y Kumate 1990). Sin embargo, la mayoría de trabajos en los que se han identificado antígenos amibianos inmunodominantes se han realizado utilizando sueros de pacientes con amibiasis invasiva (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 1991); y no se han determinado si los sueros y los coproanticuerpos de los portadores asintomáticos que representan el 90% de individuos infectados con *E. histolytica*, contienen anticuerpos contra diferentes proteínas amibianas a las reconocidas por los pacientes con amibiasis invasiva. Tampoco, en los modelos amibianos en los que se ha reportado inmunoprotección por inmunización, se han analizado los antígenos amibianos reconocidos inmunodominantemente por los sueros o los contenidos intestinales de los animales utilizados. Para diseñar una vacuna anti-amibiana efectiva será necesario que esta sea capaz de brindar protección duradera contra el parásito en el intestino grueso. Sin embargo, existen todavía muchos aspectos de la respuesta inmune en las mucosas que no se han analizado, como la adecuada selección de antígenos inmunoprotectores a nivel mucoso, que serán críticos para lograr la inmunoprotección local, y para mejorar las vacunas contra otros patógenos mucosos. Para el caso particular de la vacuna anti-amibiana, es necesario realizar más investigación básica para conocer los mecanismos de la inducción y regulación de la respuesta inmune en intestino grueso; ya que la respuesta inmune mucosa en los sitios específicos varía dependiendo del antígeno, la ruta de administración y la especie analizada. Hopkins, y cols, (1995) inmunizaron ratones por diferentes rutas locales con una salmonella recombinante que codifica un antígeno del núcleo (core) del virus de la hepatitis B, y evaluaron la respuesta contra lipopolisacáridos (LPS) y hepatitis B (Hbc) en diferentes secreciones. Ellos encontraron que existían diferencias en la respuesta contra LPS y Hbc con relación a la vía de inmunización, por ejemplo, por la vía nasal se observaron altas respuestas mucosas y sistémicas contra Hbc pero bajas respuestas contra LPS. En contraste por la vía vaginal se indujeron

altas respuestas sistémicas contra LPS pero bajas respuestas contra Hbc. Estos resultados sugieren mecanismos que, controlan la respuesta inmune contra dos diferentes antígenos después de la inducción en sitios diferentes. En general la respuesta inmune en mucosas se ha estudiado, analizando la respuesta contra antígenos simples. Recientemente Moreno-Fierros, y cols, 1996b realizaron un análisis comparativo de los antígenos amibianos reconocidos inmunodominantemente a nivel de intestino delgado y del suero, en ratones inmunizados con amibas fijadas con glutaraldehído por las vías oral, rectal e intraperitoneal; teniéndose que existen diferencias en el número de antígenos que son reconocidos de manera predominante a nivel intestinal y sistémico. Observaron 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. Concluyeron que existen diferencias entre los antígenos que son reconocidos de manera dominante a nivel sérico por anticuerpos de diferentes isotipos. Además la aparente diferencia encontrada en la selección de antígenos inmunodominantes a nivel sistémico y mucoso sugiere que la identificación de antígenos inmunodominantes amibianos, debe incluir el análisis de muestras intestinales de pacientes con amibiasis intestinal y de portadores asintomáticos, en vez de restringir el enfoque al análisis de sueros de pacientes con amibiasis invasiva. Recientemente se realizó un estudio en el que se determinó la respuesta de anticuerpos anti-amiba en suero y en los líquidos intestinales (intestino delgado y grueso), después de la inmunización local (oral y sistémica) y sistémico (intraperitoneal e intramuscular) de trofozoitos fijados con glutaraldehído, resultando que en el intestino delgado el isótipo predominante por las cuatro vías fue la IgA seguida de la IgG y finalmente la IgM. Por otra parte, en el intestino grueso, no se encontró predominancia de algún isótipo en particular, ya que la magnitud de los tres isotipos analizados fue similar, estos resultados sugieren que el sistema inmune asociado a mucosas, está compartamentalizado a nivel de los sitios efectores. En cuanto al suero el isótipo con mayor respuesta fue la IgM seguida de la IgG e IgA. Por otra parte la inmunización intramuscular indujo respuestas anti-amiba en intestino delgado y grueso, por lo que se concluye que la

inmunización sistémico de trofozoitos de *E. histolytica* puede inducir respuestas a nivel de mucosas. Esto puede aportar conocimiento básico a los estudios encaminados al desarrollo de vacunas para la estimulación de anticuerpos en las mucosas contra agentes infecciosos resistentes.

Los efectos de la toxina del cólera se han evaluado básicamente en modelos en los que la coadministran con antígenos solubles, por lo que no se sabe que ocurre con la respuesta humoral y celular cuando la toxina se coadministra con antígenos particulados complejos como las amibas fijadas con glutaraldehído. Además, existen parámetros de la respuesta inmune sobre los que no se ha evaluado el efecto de la CT. Por lo tanto, en el presente trabajo utilizaremos a la CT como adyuvante de la respuesta inmune intestinal y sistémica inducida mediante la administración local y sistémica de TFG, con el propósito de determinar si la CT influye sobre alguno de los diferentes parámetros que analizaremos de la respuesta inmune: 1) ¿Si se modifica el patrón de antígenos amibianos reconocidos de manera inmunodominante por anticuerpos de diferentes isotipos a nivel intestinal y sistémico?, 2) ¿Qué isotipo se induce predominantemente a nivel intestinal y sistémico?, 3) ¿Varía el efecto de la CT dependiendo de la ruta de inmunización (local o sistémica) utilizada?. En ésta parte del trabajo pretendo ayudar a esclarecer si el tipo de respuesta de los diferentes isotipos inducido a nivel intestinal depende del adyuvante, de la naturaleza del antígeno, de la ruta de inmunización (compartimentalización de los sitios inductores a nivel local o mucoso), o es el resultado de una combinación de factores.

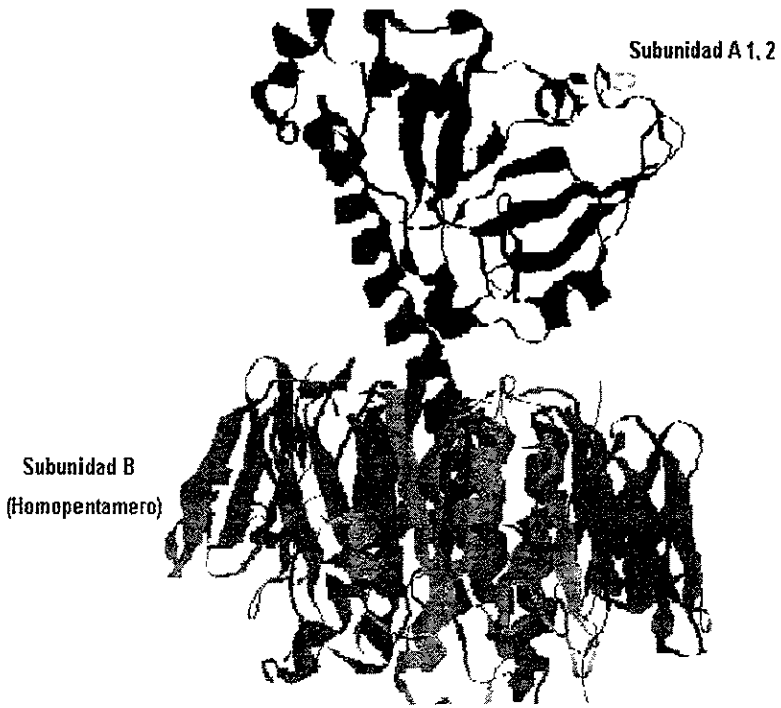


Fig 1. Estructura de la toxina del cólera. Tomado de Wilson,A.D.1993.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la respuesta inmune humoral anti *Entamoeba histolytica*, esta compartamentalizada a nivel intestinal y sistémico, y si la ruta de inmunización y la toxina del cólera modifican la respuesta del isotipo de anticuerpos y el patrón de antígenos reconocidos de manera inmunodominante a nivel local y sistémico.

Objetivos particulares.

1.1. Analizar por ELISA indirecto la respuesta de anticuerpos de diferentes isotipos a nivel intestinal (intestino delgado y grueso) y sistémico (suero).

1.2. Determinar mediante un análisis por "immunoblot" si se reconocen de manera inmunodominante los mismos antígenos amibianos a nivel intestinal (intestino delgado y grueso) y sistémico.

1.3. Determinar si la ruta de inmunización local o sistémica modifica el patrón de antígenos reconocidos de manera predominante a nivel intestinal (intestino delgado y grueso) y sistémico.

1.4. Determinar si los anticuerpos de los diferentes isotipos reconocen de manera predominante los mismos antígenos a nivel intestinal (intestino delgado y grueso) y sistémico.

1.5. Determinar si la toxina del cólera modifica la respuesta inmune humoral intestinal y sistémica inducida por la administración local y sistémica de trofozoitos fijados con glutaraldehído.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

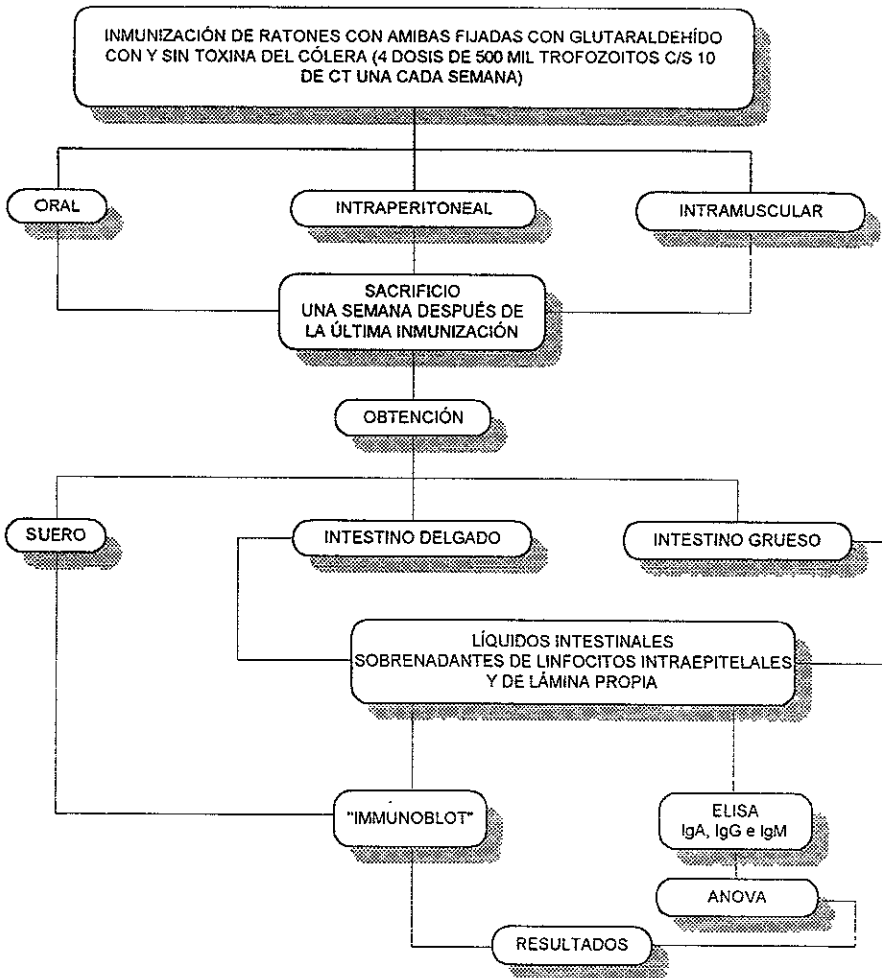


Fig 2. Estrategia experimental.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales: Se usaron ratones machos de dos a tres meses de edad, de aproximadamente 30 a 50g de peso, pertenecientes a la cepa Balb/c los cuales fueron desparasitados con metronidazol y mantenidos antes y durante la experimentación con aserrín y agua en condiciones libres de patógenos.

Antígeno (amibas fijadas con glutaraldehído): Se obtuvieron a partir de cultivos axénicos de trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS en medio TYI, de 24-48 hrs. (Diamond, y cols, 1978), se cosecharon, y se lavaron con búfer de fosfatos salinos (PBS) ajustando a una concentración de 1 millón de células por mililitro, posteriormente se fijaron por una hora con glutaraldehído al 0.25%. Y finalmente se lavaron cinco veces con PBS (Moreno-Fierros, y cols, 1992).

Inmunógenos: Toxina del cólera (CT) la cual fue obtenida por SIGMA CHEMICAL (St. Louis, Mo.)

Extracto de proteínas totales amibianas: se obtuvieron a partir de cultivos axénicos de *E. histolytica*. Los trofozoitos fueron lisados en condiciones extremas de congelamiento a -20°C y calentamiento a 95°C en presencia de parahidroximercuribenzoato (PHMB) 100mM en Tris 150mM, como inhibidor de proteasas.

Inmunizaciones: Las vías de inmunización utilizadas fueron la oral (O), Intrapentoneal (IP) e intramuscular (IM). Se formaron 2 grupos de cinco ratones Balb/c, por cada vía. Al primer grupo se le inmunizo con 500,000 TFG, y al

segundo grupo se le administro 500, 000 TFG con 10 μ g de la CT. Los animales recibieron 4 inmunizaciones (1 c/semana) y se sacrificaron siete días después de la última inmunización.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención de suero.

Se sangro a los ratones por punción cardiaca con una aguja para insulina, las muestras se colectaron en tubos de Ependorft sometiéndolas a una centrifugación de 10,000 rpm durante 5 minutos al término se obtuvieron los sueros con ayuda de una pipeta Pasteur y se almacenaron en tubos Ependorft a una temperatura de -20°C para su posterior análisis.

Obtención de líquidos intestinales.

La colección de los líquidos intestinales se llevó a cabo con medio RPMI - 1640 frío, suplementado con garamicina 50 μ g/ml y PHMB 100 mM, en el caso de los ID, con ayuda de una jeringa con cánula se le agregaron 5 ml del medio RPMI más 400 μ l de PHMB a 4°C y del mismo modo al IG se le adicionaron 3 ml del medio más 250 μ l del PHMB con el fin de obtener todo el contenido intestinal en tubos cónicos de 15 ml. Posteriormente se procedió a centrifugar las muestras a 5000 rpm durante 10 min. colectando solo los sobrenadantes en tubos estériles, e inmediatamente almacenados a una temperatura de -20°C (Moreno-Fierros, 1997).

Obtención de sobrenadantes de cultivo de células intraepiteliales (IEP) y de lámina propia (L.P).

Los intestinos fueron lavados con medio RPMI frío, removiendo las placas de Peyer del intestino delgado, inmediatamente después tanto el intestino delgado como grueso fueron separadamente evertidos mediante una cánula de 5 cm de longitud que contenía un hilo en su interior. El intestino fue anudado de un extremo y conducido sobre la cánula hasta evertirlo totalmente. Los intestino delgado como grueso se sumergieron en 10 ml de medio RPMI frío y se incubaron a 37°C en baño María durante 30 min, el medio RPMI contenía EDTA 1.5 mM y garamicina 50 µg/ml, al término de este tiempo se extrajeron para posteriormente ser disgregados mecánicamente con ayuda de un émbolo de jeringa y una malla de plástico sobre una caja de petri con medio RPMI. La suspensión de células obtenidas se colocó en hielo y se le adicionó 200 µl (SFB) al 1%, la suspensión de células intraepiteliales se recuperaron en tubos cónicos y se dejó reposar 10 min, para que bajen las partículas suspendidas, sucesivamente se decantaron los sobrenadantes y el paquete de células se colocó en frío a 4°C adicionando 200 µl de SFB y 1.8 ml de RPMI incubando durante 24 hrs en una incubadora con CO₂ al 5% y finalmente se centrifugan a 5,000 rpm durante 10 min, recuperando solo el sobrenadante en tubos cónicos para su almacenamiento a -20°C.

La mucosa intestinal fue lavada e incubada nuevamente con medio RPMI frío durante 30 min a 37°C con 10 ml de RPMI que contenía 60 U/ml de colagenasa tipo IV. Los intestinos fueron suavemente comprimidos sobre una malla de plástico, adicionando 200 µl de SFB a la suspensión de células que contenía linfocitos de lámina propia, la muestra fue decantada y el sobrenadante se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. El paquete de células se colocó en frío con 200 µl de SFB y 1.8 de medio RPMI. Esta suspensión de células también fue incubada por un corto período de tiempo a 37°C en CO₂ al 5% y almacenada a -

20°C, para el posterior análisis de anticuerpos de los sobrenadantes (Hornquist, y cols, 1996, Moreno-Fierros, 1997).

Análisis de la respuesta inmune humoral

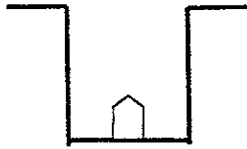
A) Se determinaron por el método de ELISA indirecto los anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM anti-amiba en las muestras de suero, contenidos intestinales y sobrenadantes de cultivo de células intraepiteliales y lámina propia.

B) Se realizó el análisis por "immunoblot" de los antígenos amibianos reconocidos de manera predominante por anticuerpos IgA, IgG e IgM, en las muestras de suero, contenidos intestinales, y sobrenadantes de células, de los ratones inmunizados con GFT, con o sin CT.

A) ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-amiba.

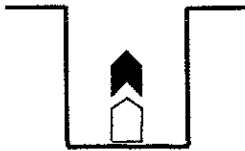
1. Se recubrieron las placas de poliestireno (corning) de 96 pozos con extracto amibiano (100 µg/ml) en búfer de carbonato-bicarbonatos (PBS) a 4°C durante 24 h.
2. Se lavaron tres veces con PBS-tween (PBS-T) al 0.05%.
3. Se bloquearon los sitios libres de la placa con PBS-T con leche descremada (Svelty) al 6% durante 2h.
4. Se lavaron tres veces con PBS-T.
5. Se incubó cada pozo con 100 µl de las muestras de suero en una dilución 1:100, contenidos intestinales 1:2 y sobrenadantes 1:2 durante 24 h
6. Se lavaron tres veces con PBS-T.

7. Se incubaron los pozos con 100 μ l de la dilución óptima de los conjugados anti inmunoglobulinas de ratón marcados con peroxidasa. Anti IgA (anti cadena alfa) 1:1000, anti IgG (anti cadena gamma) 1:6400, anti IgM (anti cadena M μ) 1:6400 durante 2h.
8. Se lavaron con agua destilada 10 veces.
9. Se revelo con 100 μ l de ortofenilendiamina/H₂O₂, durante 10 min.
10. Se paro la reacción con 25 μ l de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 2.5 M.
11. Y se obtuvo la absorbancia a 492nm en un espectrofotómetro para microplacas (microplate reader M-450 Bio Rad).



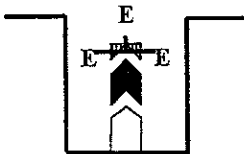
- 1) Fijación del antígeno
(Extracto amibiano)

lavar



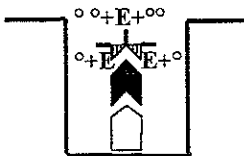
- 2) Adicionar la muestra
(suero, líquidos y sobrenadantes
intestinales)

lavar



- 3) Adicionar el anticuerpo
peroxidado

lavar



- 4) Adicionar el revelador y
leer a 492nm

Fig 3. Esquema de la técnica de ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-amiba

Análisis Estadístico (ANOVA).

Después de obtener las absorvancias de las muestras se procedió a calcular las medias geométricas y el error estándar para posteriormente graficarlas. También se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para probar si las diferencias encontradas entre las medias de los diferentes tratamientos experimentales eran o no estadísticamente significativas, posteriormente se realizó la prueba de Tukey de comparación múltiple de medias para determinar cual o cuales medias son las que difieren significativamente. (ver apéndice III).

B) Técnica de “Immunoblot” para determinar que proteína de *Entamoeba histolytica* se reconocen de manera inmunodominante por los anticuerpos IgA, IgG e IgM.

1. Inmunotransferencia. La electroforesis de proteínas amibianas se realizó en geles de poliacrilamida al 10%- SDS/PAGE, cada carril se cargo con 10 µg de extracto amibiano, el cual se hirvió previamente durante 3 minutos con beta mercapto-etanol posteriormente 1 minuto con amortiguador de muestra (Laemmli 1970); de igual forma el marcador de peso molecular pre-teñido de 14 a 200 KDa (GIBCO-BRL) se hirvió durante 1 minuto pero solo con amortiguador de muestra corriendose a la par con el extracto. Durante una hora en presencia de búfer de corrida a pH 7.6 a un voltaje 150mV.
2. Se transfirieron las proteínas amibianas del gel a papel de nitrocelulosa (Towin, y cols, 1979). En presencia de búfer de transferencia a pH 7.9. Las proteínas presentes en las tiras de papel de nitrocelulasa fueron teñidas con Rojo Ponceau al 0.5%, en ácido acético al 10% durante 5 min al finalizar la tinción se lavaron con agua destilada (H₂O).

3. El "immunoblot" se realizó una vez que se obtuvieron las tiras de papel de nitrocelulosa con el antígeno amibiano como se describió previamente (Moreno-Fierros, y cols, 1996b).
4. Las tiras se bloquearon con leche al 6% PBS/T durante 3 h, a temperatura ambiente .
5. Se lavaron tres veces con PBS-T.
6. Se incubaron las tiras con las muestras de suero 1:100, líquidos intestinales y sobrenadantes 1:2 en leche al 3% PBS-T durante toda la noche a 4°C.
7. Se lavaron tres veces con PBS-T.
8. Se incubaron con los conjugados anti-IgA (1:1000), IgG e IgM (1:2000) por 2 h.
9. Lavar tres veces con PBS-T.
10. Se adicióno el sustrato diaminobenzidina H₂O₂ 10 min.
11. Y se paro la reacción lavando con agua destilada 10 veces
12. Por último se analizaron las tiras

RESULTADOS

En el presente trabajo se analizó la respuesta inmune humoral (local y sistémica) en muestras de suero, líquidos intestinales y sobrenadantes de cultivos de células de la lámina propia y linfocitos intraepiteliales de ratones inmunizados por las vías O, IP e IM con TFG en presencia y ausencia de CT.

Efecto de la coadministración de la CT en la respuesta inmune sistémica anti- *Entamoeba histolytica*.

La toxina de cólera no modificó significativamente ($p > 0.05$) la respuesta de anticuerpos séricos de clase IgG e IgM anti-amiba, ya que se presentaron valores altos similares a los animales inmunizados con TFG sin CT tanto por las rutas IP e IM.

En contraste la CT, si tuvo un ligero efecto en la respuesta de anticuerpos IgA, aunque este solo se observó en los organismos inmunizados por la vía oral. En el suero de todos los grupos, la respuesta de anticuerpos del isotipo IgA fue la más baja por las tres vías de inmunización (Fig 4).

Efecto de la coadministración de la CT en la respuesta inmune local anti- *Entamoeba histolytica*, (líquidos intestinales).

En ID la CT produjo un incremento significativamente alto en la respuesta de anticuerpos IgA anti-amiba en ratones inmunizados por las vías O, IP e IM con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

De las cuales sobresalió la vía O, donde IgA fue el isotipo que presentó los niveles más altos de respuesta de anticuerpos anti-amiba obtenida por la inmunización de TFG más CT con relación a las vías restantes y a los grupos inmunizados solo con amibas fijadas ($p < 0.05$).

Paralelamente a la respuesta obtenida de anticuerpos IgA por la vía oral con la CT observamos que la respuesta de IgM por vía intramuscular con CT mostró un comportamiento similar, es decir CT incrementó la respuesta de IgM en ID ($p < 0.05$).

Con respecto a las muestras de IG, la CT provocó una disminución en los anticuerpos de clase IgA ($p > 0.05$) por la ruta oral; en comparación con la observada en ausencia de CT, donde IgA fue el isotipo que predominó en los animales inmunizados por la ruta oral.

Por la vía IM, la CT en IG sí mostró un efecto adyuvante al incrementar la respuesta de anticuerpos en el isotipo IgM ($p < 0.05$) con relación a los inmunizados solo con TFG y al grupo control cuyos valores son significativamente menores ($p > 0.05$) (Fig 5).

Efecto de la coadministración de la CT en la respuesta inmune local anti- *Entamoeba histolytica*, (sobrenadantes de cultivo de linfocitos intraepiteliales).

Al analizar los niveles de anticuerpos anti-amiba en sobrenadantes de linfocitos intraepiteliales, del ID de ratones inmunizados con TFG y TFG/CT encontramos una respuesta similar ($P > 0.05$) al no modificarse la magnitud de los tres isotipos analizados por ruta de inmunización, cabe mencionar que el único de los isotipos que sobresalió fue IgA presentando una respuesta significativamente mayor ($P < 0.05$) pero solo por la vía O.

La respuesta de anticuerpos anti-amiba a nivel de IG de individuos inmunizados con TFG y TFG-CT presentaron la misma tendencia en cuanto a los isotipos IgA, IgG e IgM por la ruta O donde el isotipo mayoritario fue nuevamente la IgA, por otro lado las rutas sistémicas (IP e IM) indujeron una respuesta casi nula en los tres isotipos parecida a la respuesta del grupo control ($p > 0.05$) (Fig 6).

Efecto de la coadministración de la CT en la respuesta inmune local anti-*Entamoeba histolytica*, (sobrenadante de cultivos de linfocitos de lámina propia).

La presencia de anticuerpos anti-amiba en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de células de la lámina propia en ratones inmunizados con TFG del ID como del IG no presentaron ningún incremento significativo de los isotipos IgA, IgG e IgM ($p > 0.05$), por ninguna de las vías de inmunización (O, IP e IM). Sin embargo, este comportamiento no se mantuvo cuando se analizó el grupo de ratones inmunizado con TFG coadministrando a la CT ya que presentó un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos al incrementar significativamente el isotipo IgM ($p < 0.05$) por la vía IP tanto en el ID como en el IG en base al control y a los inmunizados solo con amibas.

Podemos decir finalmente que la magnitud de la respuesta de los isotipos es muy variable tanto por la ruta de inmunización así como del isotipo analizado (Fig 7).

Efecto de la coadministración de la CT en el reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos de clase IgG por la ruta oral.

Los antígenos amibianos reconocidos por los anticuerpos de clase IgG en las muestras de suero, y los sobrenadantes de cultivos de linfocitos intraepiteliales y de lámina propia de ratones Balb/c inmunizados con amibas fijadas con y sin la toxina del cólera por la ruta O nos indica que en suero se reconocieron tres bandas con mayor intensidad en las muestras de individuos que fueron inmunizados con TFG más CT, estas bandas presentaron un peso molecular relativo a 14, 43 y 68 kDa; por otra parte en las muestras de sobrenadantes de la lámina propia e intraepiteliales tanto a nivel de ID e IG con la CT solo hubo el reconocimiento de una banda que sobresalió por su peso molecular así como por

su marcada intensidad, la cual no fue reconocida en suero por anticuerpos de clase IgG y que corresponde a un peso de 97 kDa (Fig 8).

Efecto de la coadministración de la CT en el reconocimiento de proteínas amibianas por anticuerpos totales del suero.

Los antígenos amibianos reconocidos por los anticuerpos totales en muestras del suero de ratones inmunizados con TFG solos o coadministrando a CT, por las vías oral (O) e intraperitoneal no muestran diferencias en el patron reconocimiento de proteínas anti-amiba .

Pero cabe mencionar que al comparar ambas vías de inmunización si existe una marcada diferencia en el reconocimiento de proteínas. Ya que por la vía de inmunización sistémica (IP), hay un reconocimiento mayor en el número de bandas de gran intensidad (Fig 9).

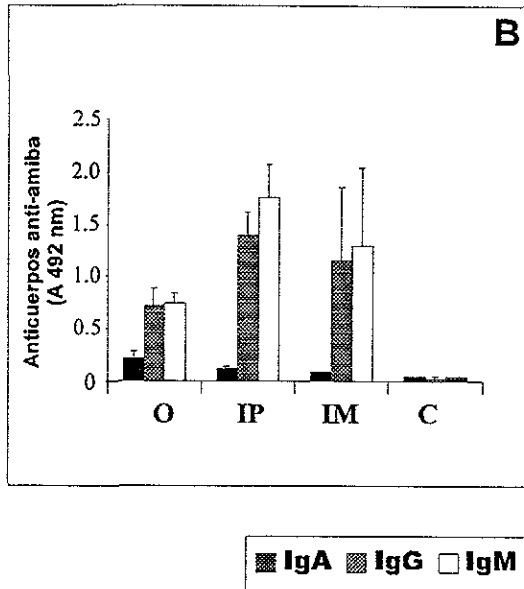
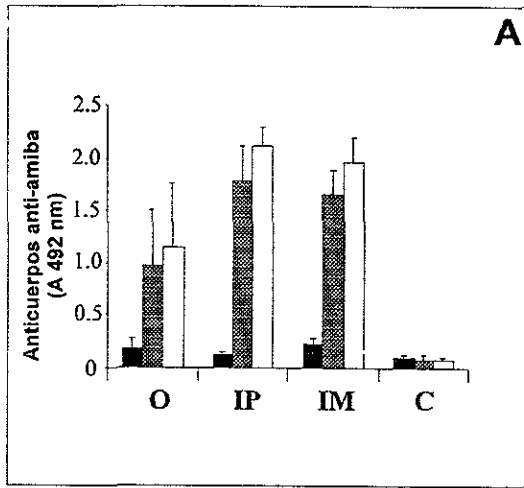


Fig 4 Respuesta de anticuerpos anti-amiba en suero de ratones inmunizados con A) Trofozoitos fijados con glutaraldehído y B) Trofozoitos fijados con glutaraldehído más toxina del cólera. Se emplearon las vías de inmunización Oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM), el grupo control (C) no se inmunizó. Los resultados corresponden a media \pm EE de n=5. No se encontró diferencia significativa entre las muestras.

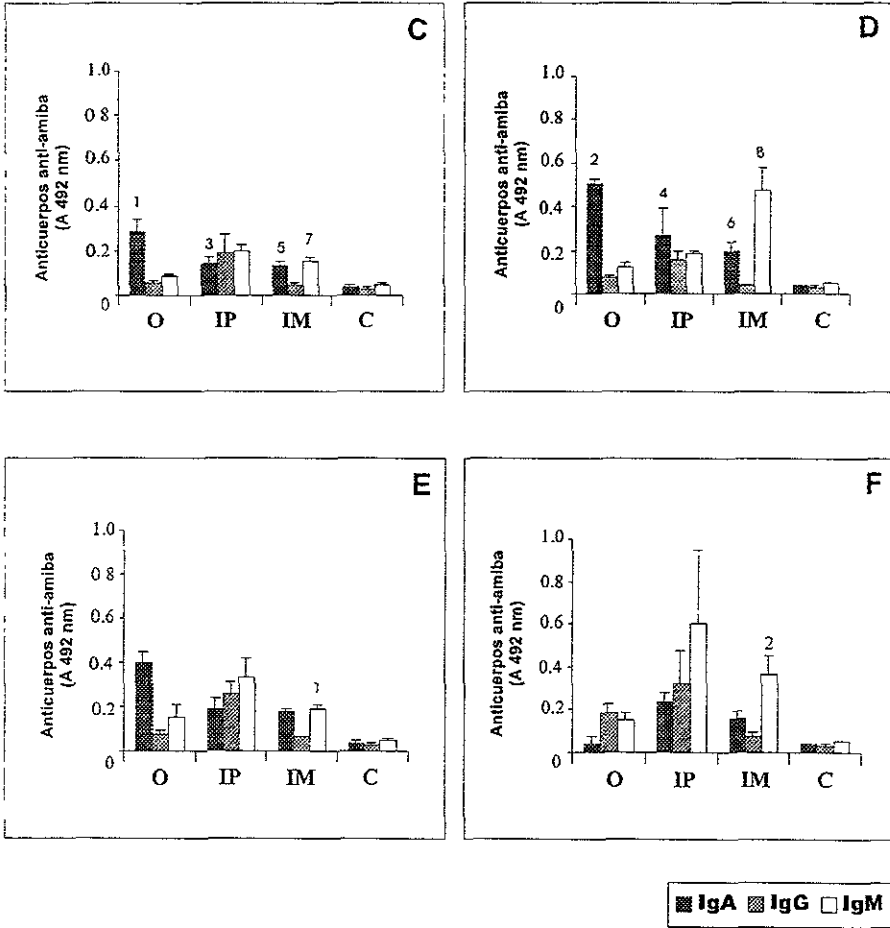


Fig 5. Respuesta de anticuerpos anti-amiba en líquidos del intestino delgado (C y D) y grueso (E y F) de ratones inmunizados; C y E con trofozoitos fijados con glutaraldehído; D y F con trofozoitos más la toxina del cólera. Se emplearon las vías oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM), el grupo control (C) no se inmunizo. Los resultados corresponden a media \pm EE de $n=5$. Los números indican que existen diferencias significativas (menor a $p<0.05$). Ver Apéndice III.

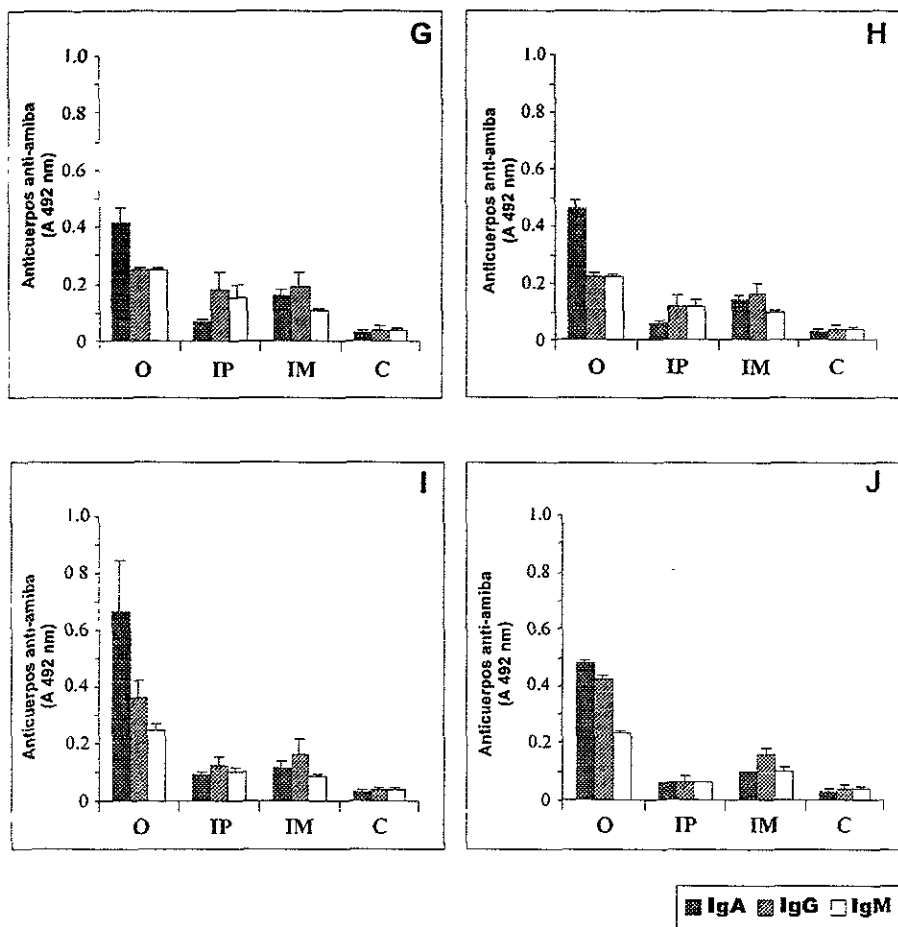


Fig 6 Respuesta de anticuerpos anti-amiba en los sobrenadantes de las células intraepiteliales (SNTES IEP) del intestino delgado (G y H) y grueso (I e J) de ratones inmunizados; G e I con trofozoitos fijados con glutaraldehído, H y J con trofozoitos más la toxina del cólera. Se emplearon las vías oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM), el grupo control (C) no se inmunizó. Los resultados corresponden a la media \pm EE de n=5. No existen diferencias en los tratamientos.

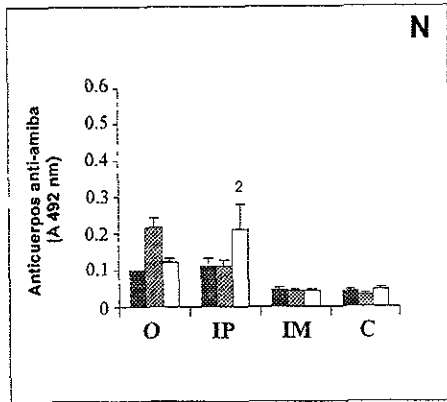
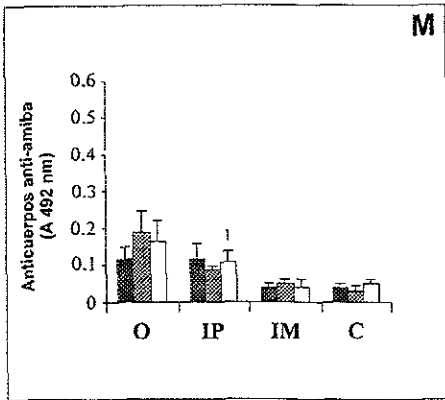
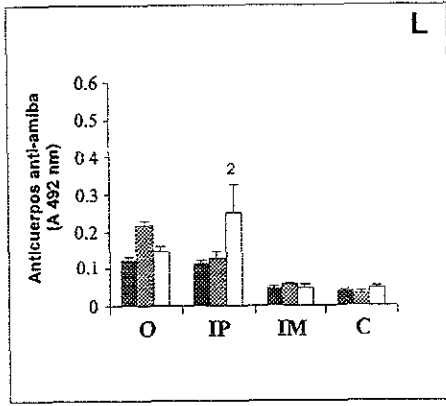
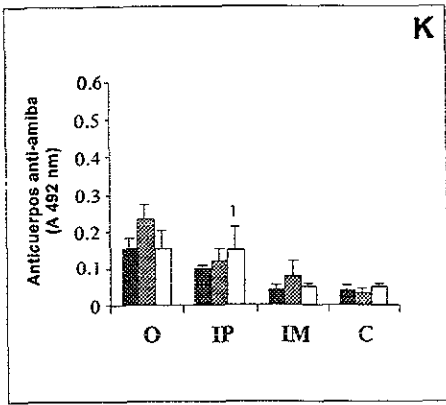


Fig 7. Respuesta de anticuerpos anti-amiba en los sobrenadantes de las células de la lámina propia (SNTES L.P) del intestino delgado (K y L) y grueso (M y N) de ratones inmunizados, K y M con trofozoitos fijados con glutaraldehído, L y N con trofozoitos más la toxina del cólera. Se emplearon las vías oral (O), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM), el grupo control (C) no se inmunizo. Los resultados corresponden a la media \pm EE de $n=5$. Los números indican que existen diferencias significativas (menor a $p<0.05$) Ver Apéndice III.

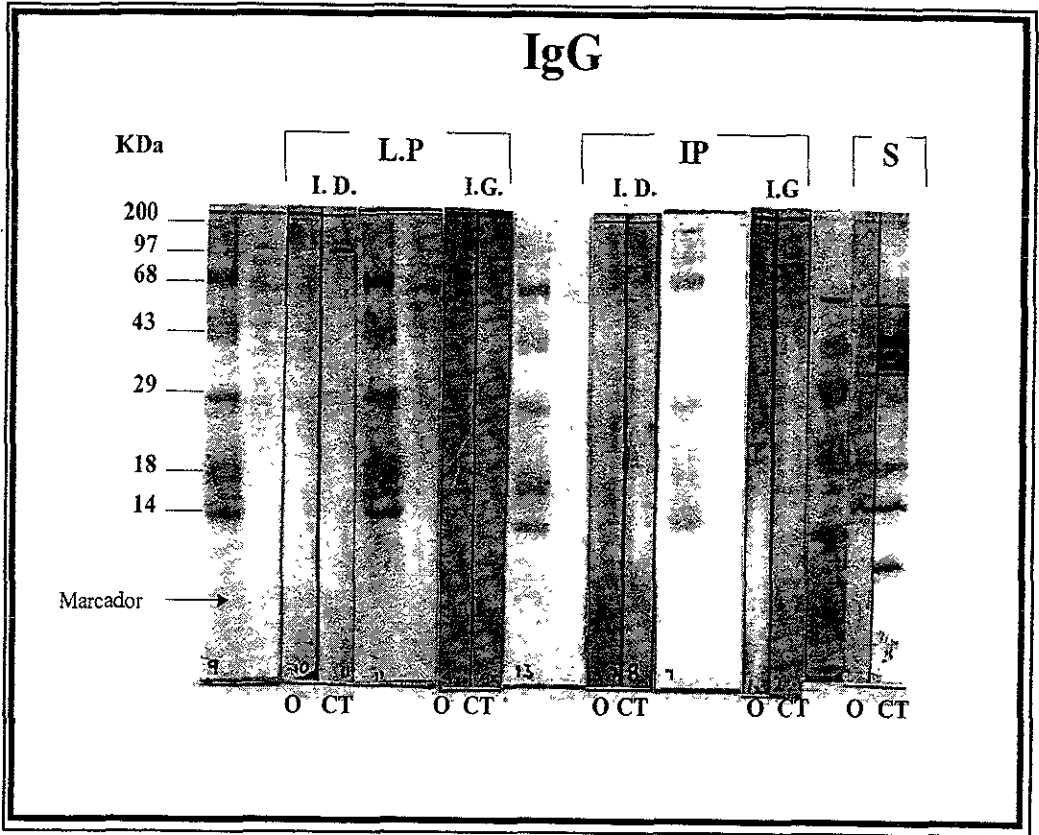


Fig 8. Antígenos reconocidos por los anticuerpos anti-amiba de clase IgG en sueros (S) y sobrenadantes de linfocitos de la lámina propia (L.P) e intraepiteliales (IEP) de ratones inmunizados con trofozoitos fijados con glutaraldehído (O) y trofozoitos fijados con glutaraldehído más la toxina del cólera (CT), por la vía oral.

DISCUSIÓN

En este estudio, analizamos el efecto de la toxina del cólera, un inmunógeno y adyuvante mucoso, determinando su capacidad de estimular o modificar la respuesta inmune humoral (local y sistémica) anti-amiba al ser coadministrada con un antígeno complejo como los TFG, que en estudios previos realizados por Moreno-Fierros, 1995 se demostró que pueden inducir una buena respuesta de anticuerpos anti-amiba de los principales isotipos (IgA, IgG e IgM) tanto a nivel local como sistémico en ratones Balb-c.

Nuestros resultados demostraron que a nivel sistémico (suero), la administración de la CT no tuvo ningún efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos anti-amiba de los isotipos IgG e IgM por ninguna de las vías de inmunización (O, IP e IM), mientras que la CT si incremento aunque no de manera significativa la respuesta de anticuerpos IgA por la vía oral.

Al realizar el análisis del efecto de la CT a nivel intestinal observamos que en muestras de líquidos de ID si tuvo un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos IgA por las tres rutas de inmunización O, IP e IM. Así mismo, dicho efecto adyuvante se presentó en el isotipo IgM por la ruta IM. En el IG la CT también aumento la respuesta de IgM por las vías IM e IP. Sin embargo en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos intraepiteliales la CT no tuvo efectos adyuvantes al no modificar la respuesta de las inmunoglobulinas por ninguna vía de inmunización. En contraste en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de la lámina propia la CT incremento significativamente la respuesta de anticuerpos anti-amiba específicamente de clase IgM por la vía sistémica (IP).

El análisis por "immunoblot" de los sueros y sobrenadantes intraepiteliales y de la lámina propia indicó que la CT modifica el patrón de antígenos reconocidos por anticuerpos de clase IgG en los animales inmunizados por la vía oral.

De lo anterior se aprecia que el efecto que presenta CT, es muy variable y que dicha variabilidad depende tanto de la vía de inmunización, así como del isotipo en estudio y del sitio donde se realiza el análisis. De manera similar en lo observado en otros trabajos del laboratorio en los que se estudio el efecto de la

CT en la respuesta de anticuerpos anti-albúmina sérica bovina (anti-BSA) y anti el antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBsAg) en las secreciones intestinales, respiratorias y vaginales.

Hay estudios en los que la CT aumenta los niveles de los anticuerpos séricos donde al administrarse oralmente no solo estimula la respuesta de IgA en las mucosas, sino también incrementan los niveles de IgG sistémicamente cuando se coadministra a una proteína soluble como la hemocianina que es considerada como una proteína altamente inmunogénica, pero que por si sola al ser administrada oralmente induce tolerancia. Se piensa que esta generación de anticuerpos IgG e IgA fueron sintetizados en alguna extensión de los tejidos linfoides en las placas de Peyer, nódulos linfoides mesentéricos y el bazo (Eison, y cols, 1998).

Con respecto a los altos niveles de IgA registrados en los líquidos del ID de los animales inmunizados con TFG más la CT, pueden ser producidos por células plasmáticas productoras de IgA presentes en la lámina propia, ya que se ha descrito que de un 70 a 90% de todas las células productoras de inmunoglobulinas en el cuerpo se produce más IgA al día que de IgG total (Abreu-Martin, 1996; Lamm, M. 1997).

La mayoría de los estudios en los que se ha analizado el efecto adyuvante de la CT en la respuesta inmune humoral, es coadministrada por vía oral a antígenos solubles como la ovoalbumina (OVA) y la hemocianina (KLH), encontrando que la CT aumenta la respuesta de anticuerpos IgG e IgM en el suero cuando se administra simultáneamente con CT, observando que el isotipo IgA permanece bajo, en contraste a las muestras de cultivos intestinales aumentaron los niveles de IgA y disminuyeron los de IgG, por lo que concluyen que el efecto adyuvante que ejerce la CT, sobre la respuesta inmune en las mucosas con KLH u OVA en respuesta de sí mismo como de otra proteína antigénica depende de la especie en estudio y de su habilidad en los procesos de reconocimiento antigénico (Wilson, 1989; Haneberg, 1994; Hopkins, 1995).

Los principales sitios inductores en la producción de IgA, las placas de Peyer que comprenden centros germinales que en su mayoría son células B y que

al entrar en contacto con el antígeno sufren el "switch" de clases ocasionando la maduración y afinidad del anticuerpo clase IgA en las mucosas (Shalaby, y cols, 1995). El "switch de isotipos ocurre fisiológicamente en animales una semana después de la primera inmunización con el antígeno por células T dependientes y posteriormente la mutación somática interviene en los genes Ig, esto ocurre claramente en centros germinales de órganos linfoides una zona que facilita la interacción de las células T y B.

En el "switch" de clases de isotipos (IgA, IgG e IgM) durante la diferenciación de las células B de la línea germinal, intervienen los genes $V\lambda$ recombinados con los J asociándose entre si. El rearrreglo de estos genes es transcrito dentro de un primer RNA_t con intrones y exones que codifican para una proteína. Este splicing forma RNA_m con algunos de los intrones y es trasladado dentro de la cadena del mensajero que origina la proteína dándose el "switch" de clases de inmunoglobulinas.

El "switch" es importante para la maduración de la respuesta inmune y esta puede ser acompañada por mutación somática.

Inicialmente una sección completa de DNA, incluyendo la recombinante de la región variable de la cadena pesada a través de la región constante μ o δ , son transcritas conjuntamente, con el splicing diferencial dando otra clase de inmunoglobulina repartidas en la región variable de la cadena pesada (VH).

Se puede observar en las respuestas tempranas de las células la producción de IgM e IgE, que el "switch" de clases es mediado por una recombinación de sitios ocasionando una delección del DNA y llevado a otra región C cerrando a los genes V, D, J esto sugiere nuevos cambios dentro del cromosoma y una mayor variabilidad y maduración de los isotipos.

Se piensa que la respuesta obtenida a nivel local ante el efecto ocasionado por la CT se da por la activación de las células B de las placas de Peyer migrando a los nódulos mesentéricos, posteriormente a los ductos torácicos y finalmente a la lámina propia del intestino (Elson, y cols, 1984; Coffin, 1997). También debemos tomar en cuenta que tanto la IgA como la IgM son abundantes en los tejidos mucosos y sus secreciones, y que estos anticuerpos tienden a ser buenos

aglutinadores, siendo altamente eficientes en la prevención y ataque de microorganismos en las superficies mucosas (Abreu-Martin, 1996; Lamm, M. 1997). En este caso la CT favoreció la secreción de anticuerpos IgM primordialmente por las vías sistémicas. Estos resultados son importantes ya que en la mayoría de los casos en los que se emplean antígenos y microorganismos muertos para el desarrollo de vacunas capaces de inducir una respuesta inmune en las mucosas solo se daba cuando la vía de inmunización era local, debido a que no se habían obtenido resultados favorables mediante una vía de inmunización estrictamente sistémica (Mestecky, 1987). Inmunológicamente la mucosa intestinal es un microambiente complejo que necesita discriminar entre los alimentos antigénicos y los antígenos dañinos asociado con microorganismos patógenos que conjuntamente atacan este tejido. Por lo que también se reconoce que localmente en la mucosa ante antígenos lumbinales pueda dar como resultado una tolerancia o inmunidad protectora (Hornquist, 1996). Además uno de los problemas al que nos enfrentamos al utilizar vacunas orales es que las proteínas administradas oralmente por esta vía son muy poco inmunogénicas, y se pueda generar a través de las diferentes inmunizaciones una tolerancia (sistémica), en la cual el organismo no actúa adecuadamente en respuesta al antígeno y lo reconoce como propio siendo la respuesta inmune totalmente ineficiente (Mestecky, 1987; Jackson, 1993). La explicación que le damos a las altas respuestas de anticuerpos obtenidas mediante la vía IP, más que por el uso de la CT, es debido a que el peritoneo es considerado como un sitio inductor de la respuesta inmune en las mucosas (Biewnga, 1993; Kroese, 1994). Se ha demostrado que esta vía genera fuertes respuestas de IgA a nivel sistémico (Solbreux, P. M 1990). Por otra parte confirmamos que efectivamente existen marcadas diferencias regionales en el sistema inmune intestinal dependiendo de los compartimentos o sitios efectores e inductores plasmados en la incidente variabilidad en la respuesta de los anticuerpos anti-amiba a nivel de ID e IG después de la inmunización local y sistémico con TFG y TFG-CT los cuales presentan cierta similitud con los reportados por Moreno-Fierros, 1996 al inmunizar solo con TFG por las vías O, IP, IM y R donde se demuestra que el

isotipo IgA no fue la inmunoglobulina predominante inducida a nivel de intestino grueso puesto que una cantidad considerable de anticuerpos anti-amiba IgG e IgM se producen a nivel de ID por las rutas IP, IM y R.

Así mismo en estudios previos, se demostró que, en el intestino la administración de la toxina del cólera en segmentos próximos o distantes inducen altos niveles específicos de anticuerpos IgA anti-toxina en el segmento de exposición al antígeno (Pierce, 1975), otros datos confirman que la producción de anticuerpos anti-poliovirus son muy abundantes en la región del colon que selectivamente ha sido inmunizado (Ogra, 1969).

Otros datos apoyan el hecho de que existen marcadas diferencias en respuesta de anticuerpos dependiendo de la vía de inmunización, tal es el caso de las investigaciones realizadas por Haneberg, 1994; Hopkins, 1995 donde utilizaron una cepa de *Salmonella thyphimurium* recombinante que expresa el antígeno núcleo (core) del virus de la hepatitis B (HBc) en respuesta de anticuerpos específicos contra HBc y LPS utilizando cuatro vías de inmunización O, R, V y N. Encontrando que HBc induce altas respuestas de anticuerpos IgA a nivel mucoso como sistémico por la vía nasal, mientras que los LPS inducen bajos niveles, en controversia los LPS inducen altos niveles de IgA en muestras vaginales y baja respuesta de anticuerpos contra HBc.

Resaltando que existe mayor variabilidad de la respuesta de anticuerpos cuando emplean a los LPS que a HBc. Por lo que ellos concluyen que existen mecanismos separados dependientes de la respuesta inmune contra los dos antígenos después de la inducción de los diferentes sitios y que además dichas respuestas difieren en cuanto a la estructura y naturaleza del antígeno como de la vía de inmunización empleada.

En el presente trabajo observamos que la CT incrementó la respuesta de IgA e IgM en los líquidos de ID y del IgG e IgM en el IG y de IgM en los sobrenadantes de lámina propia por la vía de inmunización intraperitoneal esto es considerablemente similar a los datos reportados por Solbreux, 1990; ya que ellos observaron que la CT estimula la producción de células IgA, IgG e IgM de varios

tejidos linfoides de ratas después de la inmunización intraduodenal e intraperitoneal en donde encontraron que a nivel de lámina propia hubo una producción de células linfoides de los tres isotipos mayoritarios después de la segunda y hasta la sexta inmunización observando que en la cuarta inmunización es cuando se presenta la respuesta pico de anticuerpos anti-CT. La CT, aumento la producción de anticuerpos IgA a la altura de placas de Peyer y de IgG e IgM en la lámina propia tanto por la inmunización intraduodenal como intraperitoneal. Ellos resaltan que al menos cuatro dosis son requeridas para obtener una buena respuesta de anticuerpos por estas vías sistémicas (Solbreux. P. M, 1990).

Por otra parte debemos de tomar en cuenta que la mayoría de los trabajos en los que se ha determinado el efecto de CT como adyuvante se ha realizado cuando se coadministra con proteínas solubles que por si solas administradas oralmente llegan a ser muy poco inmunogénicas y que en el presente trabajo se aplico a la CT con trofozoitos de *E. histolytica* fijados con glutaraldehído considerada como una mezcla compleja de antígenos particulados. Sobre tal mezcla no se tienen estudios del efecto de la CT sobre la respuesta inmune humoral (local y sistémica) y celular en ratones Balb/c. Varios reportes se han presentado para determinar el efecto de CT con otras proteínas solubles en la respuesta inmune humoral tanto a nivel sistémico como mucoso. La administración oral del virus de la influenza inactivado (HA) con o sin CT o CT-B a ratones Balb/c aumento la respuesta de inmunoglobulinas IgA e IgM en células B de placas de Peyer, aunque en dicho efecto favorece más a la inmunoglobulina IgA, por lo que se cree que la CT incrementa el "switch" de isotipos (Tamura, y cols, 1994). Esto se apoya en que una respuesta similar, fue encontrada pero en muestras de lavados nasales donde incremento IgA, y en suero IgG donde al parecer la CT funge como mediador del "switch" de clases (Chen, K. S y Strober, W. 1990). Actualmente se hace mención de varias estrategias de vacunación puesto que estas, están ampliamente relacionadas con la respuesta inmune. Se ha administrado a la CT aunada a *Streptococcus mutans* AgIII más la subunidad B de la toxina de cólera recombinante (rCTB) por la vía intranasal en ratones Balb/c donde la CT, indujo una fuerte respuesta inmune mucosa como sistémica

sistémica de IgA e IgG en el suero, la saliva y en los lavados nasales, vaginales e intestinales. Una de las razones de la generación de fuertes respuestas de inmunoglobulinas por la vía IN es que el inmunógeno y adyuvante probablemente incluye una baja exposición a condiciones adversas tales como: el pH, la abundancia de enzimas proteolíticas de estomago e intestino. Además la administración del inmunógeno más directamente al sitio de captación e inducción de la respuesta inmune del tejido linfoide nasal (NALT), mientras que se extiende al tejido linfoide asociado a mucosas (GALT) tal como: placas de Peyer donde se distribuye a lo largo del intestino delgado donde el inmunógeno se distribuye ampliamente a contenidos intestinales (Russell, 1998). Del mismo modo CT más BSA administradas oralmente aumenta los niveles de IgG en suero, esto sugiere que la inmunización IN es capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y que la mucosa nasal favorece la vacunación (Tockikubo, y cols, 1998) Se ha mencionado que al menos para obtener una respuesta de IgA en la saliva, así como de IgG en el suero es necesario incluir una dosis de la CT (Van Cott, 1996).

Una vez analizados los anteriores trabajos podemos hacer mención de los efectos que normalmente presenta la CT con otra proteína, tanto por la ruta oral, e intranasal como intraperitoneal, es un aumento en la respuesta de anticuerpos de los isotipos IgA en mucosas lo cual concuerda con las respuestas registradas en nuestros estudios, sin embargo la respuesta de IgG a nivel sistémico por efecto de la CT, contrasta con los nuestros ya que no se modifico la respuesta de dicho anticuerpo con la CT anti-TFG . Por lo que dicha respuesta depende del antígeno como de la vía de inmunización. (Van Cott, 1996).

Este estudio demuestra que la CT ejerce una acción adyuvante sobre la respuesta inmune en las mucosas tanto en la producción de anticuerpos específicos de IgA e IgM contra los TFG registradas a lo largo del intestino en diferentes compartimentos aunque se desconocen los mecanismo por los cuales se genera dicha respuesta inmune humoral contra TFG.

Los mecanismos de la función adyuvante de la CT no son bien conocidos. Existen varios reportes sobre los efectos inmunomodulatorios sobre las CPAs, células B y T en las que sola o conjuntamente tiene efecto adyuvante. Entre los

efectos en la respuesta inmune a nivel celular se ha descritos que CT, inhibe la producción de las células T CD8 favoreciendo la estimulación de las células T CD4 en ratones C57B1/6 inmunizados con la CT por vía oral (Hornquist, 1996). Donde al parecer la CT al igual que toxina pertusis (PT) reduce la deleción clonal, una vez que CTB se adhiere al GM1 el cual se encuentra en la membrana celular de todas las células núcleadas incluyendo las células epiteliales, donde posteriormente la CTA (28 kDa) penetra al citosol provocando la ADP-ribosilacion de la adenil ciclasa regulada por la proteína G, lo cual ocasiona el incremento del cAMP intracelularmente seguido del flujo masivo de electrolitos y secreciones en las células; activando antigénicamente a las CD4 las cuales se cree que adquieren memoria fenotípica (Hornquist, 1996; Lycke, 1997). También se dice que dicha permeabilidad celular ocasionada por la CT es requerida para que esta realice su acción adyuvante sobre todo en la respuesta inmune mucosa (Lycke, 1992; Maghazachi. A. A 1992).

Otro de los mecanismos propuestos es que una vez tomado y procesado el antígeno exógeno por las CPAs, éste se reexpresa sobre la superficie de la molécula MHC II como un fragmento peptídico y el receptor de las células T (TCR) CD3 reconozcan al péptido extraño (Elson. C. O y Dertebaugt, 1994). Esta asociación TCR, CD3 es requerida para la expresión del TCR en las células T; los componentes del CD3 y del TCR son requeridos para la transducción de señales seguidos del reconocimiento del antígeno por el TCR.

Durante la activación de las células T, varios componentes de el complejo CD3 llegan a ser fosforilados en su porción citoplásmica. Las cadenas CD3 γ de humanos y murinos son rápidamente fosforilados por la estimulación del antígeno. Esta fosforilación es mediada por la protein kinasa C la cual juega un papel desmoregulador del complejo TCR de la superficie celular que ocurre rápidamente después de ser ocupado el TCR por el antígeno/MHC los cuales están involucrados en la activación de los linfocitos T.

La activación de las células T es un paso critico en la inducción de la respuesta, inmune ya que estas juegan un papel regulador, tanto positivo como negativo, determinando si la respuesta ocurre que tan larga puede ser.

Por otra parte se piensa que el efecto de la CT, a nivel intestinal se da a través de los folículos linfoides de las mucosas; ya que presenta una gran cantidad de linfocitos B y T CD4 y CD8. Resaltando que la respuesta inmune humoral depende directamente de las células T CD4 y sus subtipos Th1 y Th2 basándose principalmente en el patrón de citocinas que estas secretan (Th1: IL-2, INF γ) (Th2: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Donde al parecer IL-4 como IL-5 son importantes en la generación de IgA in vitro (Murray, y cols, 1987). Podemos decir que las respuestas altas de IgA registradas en los líquidos de intestino delgado posiblemente se debieron a que en los folículos mucosos de las placas de Peyer se encuentra una gran cantidad de células CD4 que expresan el subtipo Th2 y en donde posiblemente la CT, aumenta la secreción de interleucinas IL-4 e IL-5 y por consiguiente la producción específica del anticuerpo IgA. Esta hipótesis es apoyada por Van Cott, (1996); al inmunizar oralmente con *Salmonella pneumoniae* tipo 23F (Pnup 23F) coadministrando la CT, donde encontró que a nivel intestinal se inducen altas respuestas de IgA anti-Pnup 23F y que dicha respuesta en el "switch" de isotipos de células B específicas es promovido por la apropiada inducción de citocinas de las células T. Así mismo otros, al inmunizar oralmente con toxoide tetánico (TT) más la CT encontraron que tanto la respuesta de IgG en el suero como de IgA en extractos fecales se deba a que dicha respuesta es regulada por Th2-CD4 in vivo. Puesto que en el suero de ratones inmunizados con CT y TT aumentaron las respuestas de IgA, IgG1 e IgG2b en presencia de IL-4, IL-5 e IL-6 donde posiblemente TT y CT activan la transducción de señales de Th2 por la ADP-ribosilación (Marinero, 1995). Podemos hacer mención de que el desarrollo de las células B incluyen el isotipo o "switch", expansión clonal y diferenciación terminal y que todos estos procesos son dependientes de una regulación por parte de varias citocinas que definen el estado de desarrollo de las células B.

La CT al parecer afecta tempranamente la diferenciación de las células B a isotipos y promueve la formación de IgA e IgG preferentemente que IgM. Aunque en otros estudios se ha demostrado que conjuntamente la CT a otros polisacáridos se estimulan células B de tipo IgM (Lycke, 1992). Estos resultados

sugieren que la CT promueve el "switch" de isotipos IgM de células B en sinergia con las interleucinas.

Como ya se menciona anteriormente por la vía oral las células B migran a los nódulos mesentéricos, y sufren la diferenciación al entrar a los ductos torácicos y a la circulación y subsecuentemente a los tejidos secretorios de cuerpo incluyendo la lámina propia del intestino y tracto respiratorio (Lycke, 1997).

La existencia del sistema inmune común explica en parte el potencial de diseñar vacunas e inmunizaciones que sean capaces de proveer protección a agentes patógenos que inician la infección interaccionando principalmente en superficies mucosas (Ferguson, 1996).

No obstante todos estos mecanismos de la CT, sobre la respuesta inmune sistémica e intestinal se han obtenido sola o conjuntamente con proteínas solubles pero no complejos como TFG.

El mayor resultado de este trabajo es que la CT, coadministrada a una mezcla compleja de proteínas como los TFG sí presenta efecto adyuvante a nivel local en diversos compartimentos intestinales aunque el mecanismo por el cual realiza su acción junto con TFG es desconocido. Nosotros sugerimos que posiblemente sea el mismo que efectúa junto con proteínas solubles.

En este trabajo se analizo por inmunodetección "immunoblot" el patrón de antígenos amibianos por anticuerpos IgA, IgG e IgM a nivel sistémico e intestinales para determinar si la CT modificaba el patrón de antígenos reconocidos de manera predominante.

Este tipo de análisis solo se ha efectuado contra proteínas específicas de 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. Donde no hubo reconocimiento de proteínas por anticuerpos 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 (Berber;1990). Otros trabajos reportados diferencias entre los antígenos amibianos reconocidos inmunodominantemente por anticuerpos de diferentes isotipos anti-*E histolytica*, 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 los líquidos intestinales de este último reconocen mayor número de bandas y con mayor intensidad por el isotipo IgA que en intestino grueso (Moreno-Fierros,1996). Recientemente se detectaron proteínas amibianas que fueron predominantemente reconocidas por anticuerpos IgG pero no por la inmunoglobulina IgM y proteínas que fueron principalmente reconocidas por IgM pero no por el isotipo IgG (Moreno-Fierros,1999).

Sin embargo este es el primer trabajo donde se analiza si la CT, es capaz de modificar el patrón de antígenos amibianos por anticuerpos de diferentes isotipos. Nosotros encontramos que la CT modificó el reconocimiento de una proteína amibiana de (97kDa) predominantemente por anticuerpos IgG en muestras de lámina propia e intraepiteliales a nivel de intestino delgado y grueso, por otra parte en las muestras de suero, los IgG reconocieron tres proteínas (14, 43 y 68 kDa) predominantemente con gran intensidad en ratones inmunizados oralmente. Las diferencias entre el reconocimiento de anticuerpos IgG intestinales y de suero sugieren que hay producción de IgG en las mucosas de manera independiente a las sistémicas puesto que antes se pensaba que la presencia de IgG en la mucosa era por transudación del suero. Estos datos coinciden con los de Berneman, y cols, 1998 donde observaron que los patrones de inmunoglobulinas IgG en el suero y en las secreciones vaginales y salivales al ser comparadas en respuesta al antígeno *Streptococcus pyogenes* en humanos difieren dependiendo del compartimiento donde se secreta dicho anticuerpo, estas diferencias son reportadas en términos de las cuatro subclases de IgG γ y entre el total de moléculas IgG o entre los anticuerpos IgG de conocida especificidad, las respuestas de IgG a antígenos mucosos pueden complementar la secreción de IgA en defensa a antígenos patógenos. (Berneman A, y cols, 1998)

Los antígenos amibianos reconocidos por anticuerpos anti-total en muestras

de suero de ratones inmunizados con TFG solos o coadministrando a CT, por las vías oral e intraperitoneal no muestran diferencias en el patron de reconocimiento.

Más cabe mencionar que si se comparan ambas vías de inmunización existe una marcada diferencia en el reconocimiento de proteínas que tienden a beneficiar a la vía de inmunización sistémica (IP), con un mayor número de bandas de gran intensidad. Estas observaciones indican, que en estudios diseñados para la identificación de antígenos inmunodominantes para la futura elaboración de vacunas, se deben analizar individualmente el reconocimiento mostrado por diferentes isotipos así mismo el análisis por vías de inmunización dadas las diferencias existentes en dicho trabajo.

El papel de la respuesta inmune en la protección contra la amibiasis es aún incierto. La identificación y aislamiento de antígenos de *E. histolytica* efectivos como agentes inmunoprolifáticos es un prerrequisito para el diseño de una vacuna anti-amiba (Isibasi,1990). El uso de la CT es una opción para estimular la respuesta inmune humoral intestinal (ID) anti-*E. histolytica* que pueden adherirse a antígenos específicos y ser atacados por inmunoglobulinas específicas sin embargo cuando se coadministra con antígenos particulados ésta presenta marcadas diferencias por la ruta oral e intraperitoneal lo cual se debe básicamente a que por la vía oral encontramos que el antígeno se desplaza por un ambiente donde el pH es ácido y se encuentra una gran cantidad de enzimas que modifican al antígeno.

En general la CT presento un efecto adyuvante en la respuesta del isotipo IgA a nivel del ID en contraste con el IG donde en reportes previos se a reportado una mayor producción de IgA esto pudo deberse a que existen diferencias entre especies de amibas que modifiquen el reconocimiento antigénico de las células linfoides dependiendo del compartimento donde se estudio la respuesta.

Este trabajo contribuye finalmente a la caracterización de los efectos de la toxina del cólera en la respuesta inmune humoral a nivel intestinal y sistémico.

CONCLUSIONES.

1. La toxina del cólera (CT) no modificó la respuesta sistémica de anticuerpos anti-amiba, inducida por la inmunización local (oral) y sistémica (IP e IM) de trofozoitos fijados con glutaraldehído.
2. La toxina del cólera presentó efecto adyuvante a nivel intestinal (ID e IG), en *líquido intestinales y en sobrenadantes* de cultivos de linfocitos de la lámina propia al incrementar la respuesta de algunos isotipos (principalmente de IgA), pero este varió dependiendo de la vía de inmunización y del isotipo en estudio.
3. La ruta de inmunización IP presentó una mayor respuesta de anticuerpos de los isotipos analizados, tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico.
4. La toxina del cólera por la vía oral modificó el patrón de reconocimiento de proteínas anti-amiba por anticuerpos IgG en suero e intestinos delgado y grueso.
5. La toxina del cólera por la vía oral (O) modificó el patrón de reconocimiento de *proteínas amibianas por anticuerpos séricos* totales
6. En general nuestros resultados muestran que la respuesta inmune intestinal está regionalizada a nivel de los sitios efectores ya que existen diferencias en la respuesta a nivel de ID e IG.

APENDICE

I) GELES DE ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA AL 10%

GEL SEPARADOR	30 ml
Acrilamida al 30 %	10 ml
Bis-acrilamida 2 %	4 ml
Tris 1 M pH 8.8	11.25ml
SDS 20 %	150µl
H ₂ O	4.4ml
TEMED	13µl
APS 10%	90µl

GEL CONCENTRADOR	30ml
Acrilamida 30 %	1.7 ml
Bis-acrilamida 2 %	700µl
Tris 1 M pH 6.8	1.25 ml
SDS 20 %	50µl
H ₂ O	6.8 ml
TEMED	10µl
APS 10 %	50µl

II) REACTIVOS

Búfer de Corrida	{	Glicina 14.42gr.
		Tris 3.03gr
		SDS 1.0 gr.
		Aforar con H ₂ O a 1000ml.
Búfer de transferencia	{	Glicina 11.5gr.
		Tris 2.46gr.
		Metanol 200 ml
		Aforar con H ₂ O pH 8.3 1000ml
Búfer de fosfatos salinos (PBS) 1 X	{	NaCl 8 gr/l 0.14M
		KCl 0.20 gr/l 2.1mM
		KH ₂ PO ₄ 0.2 gr/l 1.5mM
		Na ₂ HPO ₄ 1.15 gr/l 8.1mM
		Aforar con H ₂ O dest 1000ml
Amortiguador de muestra al (5X)	{	Trizma base 2.44gr
		H ₂ O dest. 25 ml
		Ajustar a pH 6.8
		SDS 5gr
		Glicerol 5ml
		Azul de Bromofenol 0.05gr

Búfer de Carbonatos- bicarbonatos pH 9.6	{	Na ₂ CO ₃	1.59g.
		NaHCO ₃	2.93g.
		Aforar con H ₂ O	1000ml

Búfer de Fosfatos- citratos. pH 5.0	{	Acido citrico 0.1M	12.15ml.
		Fosfato 0.2 M	12.85ml.
		H ₂ O dest.	25ml.
		Orto/phenylenediamine	20mg
		H ₂ O ₂ al 30%	20µl.

PBS/Tween 5%	{	Tween	0.5ml.
		Aforar con PBS	1000ml.

Azul de Coomassie	{	Etanol o Metanol	10ml
		Acido acético	10ml
		Azul de Coomassie	0.1 %
		Aforar con H ₂ O a	100ml

Rojo de Ponceau

{ Rojo de Ponceau 0.5g
Acido acetico glacial 1ml
Aforar con H₂O a 100ml

Solución
DAB/NiCl₂, CoCl₂

{ Diaminobenzidine 20mg. En 100 ml de
PBS 1:3.
Cloruro de cobalto 30mg. Agregar en 3 ml de agua
destilada y añadir gota a
gotita.
Cloruro de niquel 30mg.
Filtrar y agregar
H₂O₂ al 30% 500µl.

III) Prueba de Tukey

$$DMSR = q \sqrt{\frac{CMERROR}{2} \left(\frac{1}{na} + \frac{1}{nb} \right)}$$

$$q_{5,20}^{0.05} = 0.315$$

$$q_{5,20}^{0.01} = 0.394$$

Líquidos Intestinales	Medias Diferentes	F calculada	$F_{4,20}^{0.05}$
ID	$X_1 < X_2$	0.315	2.8661
	$X_3 < X_4$	0.268	
	$X_5 < X_6$	0.119	
	$X_7 < X_8$	0.240	
IG	$X_1 < X_2$	0.290	
STES L.P			
ID	$X_1 < X_2$	0.042	
IG	$X_1 < X_2$	0.042	

REFERENCIAS

- Abreu-Martin M. T. y Targan S. R. (1996). Regulation of Immune Responses of the Intestinal Mucosa. *Crit. Rev. Immunol*, 16: 277-309.
- Biewnga J. Van Rees EP y Sminia T. (1993). Induction and Regulation of IgA Responses in Microenvironment of gut. *Clin. Immun and immunopathol*, 67: 1-7.
- Berber, A. C., Escobar, A, Zamora. M y Acosta. G, (1990). Identification of *Entamoeba histolytica* Antigens Recorgnized by IgA Class Human Antibody in Sera and Calostro of Puerperal Women Using Immunoblotting Techniques. *Arch. Invest. Med* 21 Suppl 1:97-101.
- Chen K. S y Strober W. (1990). Cholera Holotoxin and its B Subunit enhance Peyer's patch B Cell Responses Induces by Orally Administered Influenza Virus: Disproportionate Cholera Toxin Enhancement of the IgA B Cell Response. *Eur. J. immunol*, 20:433-436.
- Coffin, S. E., Moser, C. A, Cohen, S. O, Clark, H. F y Offit, P. A, (1997). Immunologic Correlates of Protection Against Challenge after Intramuscular Immunization of Mice. *J. Virol*, 71:7851-7856.
- Diamond LS, Harlow DR y 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.
- Elson C. O y Ealding W (1984). Generalized Systemic and Mucosal Immunity in Mice after Mucosal Stimulation with Cholera Toxin. *J. Immunol*, 132 (6) : 2736-2741.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Elson C. O. y Dertzbaugh. (1994). Cholera Toxin and Escherichia Coli Heat-Labile Toxin. *Handbook of Mucosal Immunology*. 391-401.
- Elson C. O, Holland SP, Dertzbaugh MT, Cuff CF y Anderson AO. (1995). Morphologic and Functional Alterations of Mucosal T Cells by Cholera Toxin and its B Subunit. *J. Immunol*. 1032-1039.
- Espinosa-Cantellano M y Martínez-Palomo A. (1991). The Plasma Membrane of Entamoeba histolytica: Structure and Dynamics. *Biol Cell*, 72: 189-200.
- Ferguson A.(1996). Mucosal Immunology: From Bench to the Bedside and Beyond. *Immunology*, 89: 475-482.
- Haneberg B, Kendall D, Amerorigen H.M, Apter F.M, Kraehenbuhl JP y Neutra M.R (1994). Induction and Specific Immunoglobulin A in the Small Intestine, Colon-Rectum, and vagina Local mucosal surface. *Infect Immun*, 62: 15-23.
- Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schedel F, Potts A, Peterson D, De Grundi P y Nardelli-Haeffliger D. (1995). A Recombinant Salmonella typhimurium Vaccine Induces Local Immunity by Four Different Routes of Immunization. *Infect. Immun*, 63: 3279-3286.
- Hörnquist E, Grdic D, Mak T y Lyke N (1996) CD8 Deficient Mice Exhibit Augmented Mucosal Immune Responses and Intact Adjuvante Effects to Cholera toxin. *Immunology*, 87: 220-229.
- Isibasi A. y Kumate J. (1990). Antigen. En Amebiasis: *Infection and Disease by E. histolytica*. (R. Kretschmer Ed.) pp 61-79. CRC Press USA.
- Johnson GD y Dorling J. (1978). Immunofluorescence and Peroxidase Techniques. *In Techniques in Clinical Immunology*, 106-137. Ed. by Thompson RA. Blackwell Scientific Publications Oxford.

- Jackson, R. J., Fujihashi, J. Xu-Amano, Kiyona, Elson, C. O y Mc Ghee. (1993). Optimizing Oral Vaccine: 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.
- Kretschmer RR. (1986). *Immunology of amebiasis*. En Amebiasis, Human Parasitic Diseases Series. Vol.2. (Martínez-Palomo Ed.) pp 95-165.Elsevier Science Publishers Amsterdam.
- Kretschmer RR. (1990) *Immunology of amebiasis*. Introduction in Amebiasis (R Kretschmer Ed.) pp 59 CRC press. USA.
- Kroese, F. G., Kantor, A.B, y Herzerberg L. A, (1994). Handbook of Mucosal Immunology. P. L Ogra, W. Strober, J. Mestecky. Mc Ghee , J. Bienestock (Eds)), 217-223. Academic Press Inc.
- Laemmli UK. (1970). Clavage of Estructural Proteins During the Assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamm M. E. (1997). Interaction of Antigens and Antibodies at Mucosal Surfaces. *Ann. Rev. Microbiol*, **51**: 311-327.
- Lycke N., Bromander A. K., Ekman. L., Karlsson. U. y Holmgren J. (1989). Cellulae Basis of Immunomodulation by Cholera Toxin in Vitro With Possible Association to the Adjuvant Function in Vivo. *J. Immunol*, **142 (1)**: 20-27.
- Lycke N. (1997). The Mechanism of Cholera Toxin Adjuvanticity. *Res Immunology*, **148 (8-9)**: 504-419.

- Maghazachi A. A. (1992). Cholera Toxin Inhibits Interleukina-2-Induced, but Enhances Pertussis Toxin-induced T Cell Proliferation: Regulation by cyclic nucleotides. *Immunology*, 75: 103-107.
- Marinaro, M et al. (1995). Mucosal Adjuvant Effect of Cholera toxin in Mice Results from Induction of T Helper 2 (Th2)-Cells and IL-4. *J. Immunol*, 155: 4621-4629.
- Mestecky J, Araham R y Ogra PL (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 CJ, McGhee JR y Gardner MB (1992). Biology of Disease, Mucosal immunity, HIV Transmission, and AIDS. *Lab Invest* 68: 129-145.
- Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R y Enríquez-Rincón F. (1992a). Sex Differences in Systemic and Local Immune Responses to *Entamoeba histolytica* after Intraperitoneal and Rectal immunization in Balb/c Mice. *Arch. Med. Res.* 23: 153-155.
- Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R y Enríquez-Rincón F. (1992b). Kinetic of the Anti-Amebic Antibody Producing Cells Responses in Peyer's Patches and Spleen after Both Local and Systemic Stimulation in Balb/c Mice. *Arch. Med. Res.* 23: 165-168.
- Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC y Enríquez-Rincón F (1994). The use of an ELISPOT Assay to Evaluate Intestinal and Systemic Antibody Responses to Locally Administered *Entamoeba histolytica* Antigen in Mice. *Arch. Med. Res.* 25: 183-187.
- Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC y Enríquez-Rincón F (1995). *Entamoeba histolytica*: Induction and Isotipe Analisis of Antibody Producing Cell Responses in Peyer's Patches and Spleen after Local and Sistemic Immunization in Male and Female Mice. *Exp. Parasit.* 80: 541-549.

- Moreno-Fierros L, y Enríquez-Rincón F. (1996a). Quantification and Isotope Analysis of the Serum Anti-Amebic Antibody Response Produced after Mucosal and Sistemic in Male and Female Mice. *Fol. Biol. (Phra)*. 42: 28-32.
- Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles y Enríquez-Rincón F (1996b). Life Sci. (En prensa).
- Mowat A. M. y Viney J. L. (1997). The Anatomical Basis of Intestinal Immunity. *Immunol. Rev*, 156: 145-166.
- Rued C., Rieser C., Kofler N., Wick G. y Wolf H. (1996). Humoral and Cellular Immune Responses in the Murine Respiratory Tract Following Oral Immunization with Cholera Toxin or *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Vaccine*, 14(8): 792-798.
- Solbreux P.M., Dive C y Vaerman J. P. (1990). Anti-cholera Toxin IgA-, IgG- and IgM-secreting Cells in Various Rat Lymphoid after Repeated Intestinal or Parenteral Immunizations. *Immunol Invest*. 19 (5-6): 435-451.
- Shalaby-Waleed S.W. (1995). Development of Oral Vaccine to Stimulate Mucosal and Systemic Immunity: Barriers and Strategies. *Clin Immun Immunopath*. 74: 127-134.
- Talamás-Rohana P., Schlie Ma. Hernández -Ramírez VI y Rosales-Encina JL. (1995). *Infect. Immun*. 63: 3953-3958.
- Tamura S., Yamanaka A., Shimohara M., Tomita T., Komase K y Tsuda Y. (1994). Synergistic Action of Cholera Toxin B Subunit (and *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin B Subunit) and a Trace Amount of Cholera Whole Toxin as an Adjuvant for Nasal Influenza Vaccine. *Vaccine*. 12 (5): 419-426.

- Towbin H., Staehelin T y Gordon T. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose sheets: Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
- Vajdy M. y Lycke N. Y. (1992). Cholera Toxin Adjuvant Promotes Long-term Immunological in the Gut Mucosa to Unrelated Immunogens after Oral Immunization. *Immunology.* 75, 488-492.
- VanCott J. L., Kobayashi T., Yamamoto M., Pillai S., McGhee R y Kiyono H. (1996). Induction of pneumococcal polysaccharide-specific Mucosal Immune Responses by Oral Immunization. *Vaccine*, 14(5):392-397.
- Voller. A. y Savigny. D. (1981). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Techniques in Clinical Immunology.* (Thompson. R. A. Ed). 157-169.
- Walsh JA. (1986). Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Stimulation of the Global Magnitud of Morbidity and Mortality. *Rev Infect. Dis.* 8: 228-238.
- Webb TH, Lillemow KD y Pitt HA. (1989). Liver Absces. *Hospital Physicians.* 25: 46-54.
- Wilson A. D, Stokes. C. R y Bourne F. J. (1989). Adjuvant Effect of Cholera Toxin on the Mucosal Immune Response to Soluble Proteins. " Differences between Mouse Strains and Protein Antigens". *Scand. J. Immunol.* 29, 739-745.
- Wilson A. D., Robinson A., Irons L. y Stokes C. R. (1993). Adjuvant Action of Cholera Toxin and Pertussis Toxin in the Induction of IgA Antibody Response to Orally Administered Antigen. *Vaccine.* 11 (2): 113-118.

- Wu H.Y. y Russell M. W. (1998). Induction of Mucosal and Sistemic Immune Responses by Intranasal Immunization Using Recombinant Cholera Toxin B Subunit as an Adyuvant. *Vaccine, 16 (2-3): 286-292.*

- Xu- Amano J., Kiyono H., Jackson R. J, et al (1993). Helper T Cells Subsets for Immunoglobulin A Responses: Oral Immunization With Tetanus Toxoid and Cholera toxin as Adyuvante Selectively Induces Th2 cells in mucosal Associated Tissues. *J. Exp. Med, 178: 1309-1320.*