



11261 2ej
9
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTIVIDAD MITOGENICA DE DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS DE
Entamoeba histolytica CEPA HM1-IMSS SOBRE LINFOCITOS DE
GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS Y BAZO DE RATONES BALB/c.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
EN LA ESPECIALIDAD DE INMUNOLOGIA

Biol. Fernando Díaz Otero

Director de Tesis:

Dr. Gustavo Acosta Altamirano

INIFAP CONACYT IMSS HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO

MEXICO, D. F., 1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	Página.
Indice General.....	X
Abreviaturas.....	XI
Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tablas.....	XIII
Agradecimientos.....	XIV
Resumen.....	XV
Summary.....	XVI
I. Introducción	
A. Antecedentes de <u>Entamoeba histolytica</u>	1
1. Biología celular del trofozoito.....	2
2. La membrana plasmática.....	5
3. Formación de casquete (Capping).....	6
4. Desprendimiento.....	6
B. Factores de virulencia del parásito.....	7
C. Inmunología de la Amibiasis.....	10
1. Marco de referencia.....	10
2. Respuesta inmunitaria humoral.....	11
3. Respuesta inmunitaria celular.....	12
D. Lectinas Amibianas.....	16

E. Actividad Mitogénica de extractos amibianos.	19
F. Elementos celulares a nivel intestinal.....	23
1. Tipo de células presentes en tejido lin-- foide asociado a intestino.....	24
2. Tejido linfoide asociado a intestino.....	25
II. Planteamiento del Problema.....	27
A. Objetivos.....	28
III. Material y Métodos.....	29
A. Animales.....	29
B. Injertos de Piel.....	29
C. Cepa Amibiana.....	30
D. Obtención de Antígenos.....	30
1. Obtención del filtrado amibiano (FA).....	30
2. Obtención del extracto total (ET) y frac- ciones subcelulares (FN,P-15 y S-15).....	32
E. Obtención de Linfocitos de Ganglios linfáti- cos Mesentéricos y Bazo.....	32
F. Transformación Blastoides con Incorporación - de Timidina-Tritiada (³ H-Tdr) (Micrométodo).	34

1. Estimulación de la proliferación de linfocitos con un mitógeno conocido (Concanavalina A).....	34
2. Curva dosis-respuesta del filtrado amibiano sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y bazo.....	36
3. Transformación blastoide con incorporación de Timidina-Tritiada (³ H-Tdr) (Micrométodo) para las fracciones subcelulares.....	36
H. Análisis Estadístico.....	36
IV. Resultados.....	42
V. Discusiones.....	58
VI. Conclusiones.....	62
VII. Apéndice.....	63
VIII. Bibliografía.....	66

A B R E V I A T U R A S

<u>Entamoeba histolytica</u>	<u>E. histolytica</u> .
Micras.....	um
Inmunoglobulinas.....	Igs
Inmunoglobulinas de la clase G.....	IgG
Inmunoglobulinas de la clase M.....	IgM
Inmunoglobulinas de la clase A.....	IgA
Inmunoglobulinas de la clase D.....	IgD
Inmunoglobulinas de la clase E.....	IgE
Anticuerpo.....	Ac
Antígeno.....	Ag
Complemento.....	C
Factor del complemento C ₃	C ₃
Neutrófilos polimorfonucleares.....	N.P.
N-acetil-D-galactosamina.....	GalNAC
N-acetil-D-glucosamina.....	GlcNAC
Mililitros.....	ml
Factor Inhibitorio de la migración.....	MIF
Antígeno amibiano.....	Agam
Concanavalina A.....	Con A
Fitoheماغلوتينina.....	PHA
Células de Exudado Peritoneal.....	PECs

Ganglios Linfáticos Mesentéricos.....	GLMs
<u>Entamoeba coli</u>	<u>E. coli</u>
Inmunidad Mediada por Células.....	IMCs
Glóbulos Rojos de Carnero.....	SRBC
Beta-Mercaptoetanol.....	2-ME
Células adherentes de Exudado Peritoneal...	CAEP
Colaboradores.....	col
Hemaglutinantes.....	HA
Anticuerpos Monoclonales.....	AcMs
Kilodalton.....	KDa
Células de Ovario de Hamster Chino.....	Células CHO
Dodecil Sulfato Sódico.....	SDS
Electroforesis en geles de poliacrilamida - en presencia de SDS.....	SDS-PAGE
Peso Molecular.....	P.M.
Macrófago.....	MO
Extractos de <u>E. histolytica</u>	<u>E.h.e.</u>
Hora.....	h
Minutos.....	min
Nanómetro.....	nm
Filtrado Amibiano.....	FA
Extracto Total.....	ET
Fracción Nuclear.....	FN

Fracción Vesicular.....	P-15
Fracción Postvesicular.....	S-15
	3
Timidina-Tritiada.....	H-Tdr
Anticuerpos Monoclonales Adhesina 1.....	AcMs Adh-1
Anticuerpos Monoclonales Adhesina 2.....	AcMs Adh-2
Solución Salina Amortiguadora con Fosfatos.	PBS
Revoluciones por minuto.....	rpm
Medio de Cultivo Celular de acuerdo a las - iniciales de Roswell Park Memorial Institu- te.....	RPMI-1640
	o
Grados Centígrados.....	C
	3
Milímetros Cúbicos.....	mm
Linfocitos de la Lámina Propia.....	LFL
Volumen.....	Vol.
Cuentas por minuto.....	CFM
Lipopolisacárido.....	LPS
Tejido linfoide asociado a intestino.....	GALT
Tejido linfoide asociado a mucosas.....	MALT
Placas de Peyer.....	PP

LISTA DE FIGURAS

1) Obtención de las fracciones subcelulares - amibianas.....	32
2) Localización de los órganos linfoides cen- trales y periféricos en el ratón.....	34
3) Metodología de transformación blastoide -- para la proliferación de linfocitos con -- Concanavalina A.....	36
4) Esquemmatización de la metodología de ---- transformación blastoide para el filtrado amibiano y las fracciones subcelulares....	38

LISTA DE TABLAS

- 1) Posibles factores en la patogenicidad de la amiba..... 9

- 2) Integración de la vía aferente y eferente de la inmunidad celular en la amibiasis - invasiva..... 15

AGRADECIMIENTOS

A TI LAURA JARAMILLO MEZA QUE HAZ SABIDO SER UNA EXCELENTE ESPOSA, TE AGRADEZCO EL APOYO QUE ME BRINDASTE PARA LLEVAR A CABO ESTA META.

A MIS HIJOS, PERLA MARIA Y FERNANDO RODRIGO POR QUE MI MOTIVO MAS GRANDE PARA VIVIR.

A MI MADRE, MARGARITA OTERO DE DIAZ, POR QUE HAZ GUIADO MI CAMINO CON CARIAO Y HEMOS COMPARTIDO ANGUSTIAS Y ALEGRIAS.

A MI PADRE ENRIQUE DIAZ CABALLERO, QUE DONDE QUIERA QUE SE ENCUENTRE LE DOY GRACIAS POR HABERME DADO LA VIDA Y SUS ENSEÑANZAS.

A MI HERMANO MARIO DIAZ OTERO POR EL APOYO QUE ME BRINDO.

Y POR SUPUESTO A MIS SUEGROS, POR QUE EN LOS MOMENTOS DIFICILES ME HAN BRINDADO SU APOYO.

"Echada está la suerte, y con esto pongo fin a mi trabajo, importándome poco que sea leído por la edad presente o por la posteridad. No le faltará lector algún día. Pues qué, no ha tenido Dios que esperar seis mil años para hallar en mí un contemplador e intérprete de sus obras?"

(SANTIAGO RAMON Y CAJAL).

AL DR. GUSTAVO ACOSTA A. POR SER UN EJEMPLO
COMO SER HUMANO, PROFESIONISTA Y AMIGO.
(DIRETOR DE TESIS).

AL DR. CARLOS VAZQUEZ F. POR APOYARME EN EL ANALISIS
ESTADISTICO DESINTERESADAMENTE.

AL M. EN C. MIGUEL CRUZ L. POR LA REVISION DEL ESCRITO. A
LA M. EN C. ALICIA VALADEZ S. POR SU APOYO EN LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO. AL DR. ARMANDO ISIBASI A.
POR SUS ORIENTACIONES Y A LA DRA. LUCIA TAYLOR DA CUNHA E
MELO POR DAR APOYO CUANDO SE NECESITA.

AGRADEZCO AL JURADO SUS ACERTADAS CRITICAS AL TRABAJO.

DRA. LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELO.	PRESIDENTE.
DRA. PAZ MARIA SALAZAR SCHEITINO.	SECRETARIO.
DR. GUSTAVO ACOSTA ALTAMIRANO.	PRIMER VOCAL.
M. EN C. ALICIA VALADEZ SALAZAR.	SEGUNDO VOCAL.
M. EN C. MARIA DEL ROCIO REYES MONTES	TERCER VOCAL.
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.	SUPLENTE.
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO.	SUPLENTE.

TAMBIEN QUIERO DAR MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A LAS
INSTITUCIONES QUE ME BRINDARON SU APOYO.

INIFAP (CENID-MICROBIOLOGIA)

CONACYT

IMSS

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO (FEDERICO GOMEZ).

AL DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA Y AL DR. DIDORO BATALLA
CAMPERO POR LA CONFIANZA DEPOSITADA.

POR ULTIMO A MIS GRANDES AMIGOS QUE PARTICIPARON
EN REALIZAR ESTE TRABAJO. JORGE, SAUL Y LETICIA.

RESUMEN.

ACTIVIDAD MITOGENICA DE DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS DE Entamoeba histolytica CEPA HM1-IMSS SOBRE LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS Y BAZO DE RATONES BALB/c.

La amibiasis invasora es un problema médico grave a nivel mundial; en nuestro país, las investigaciones epidemiológicas han revelado una frecuencia de 5.9 % en este padecimiento, lo cual coloca a México entre los países más afectados del mundo.

Existe controversia acerca del desarrollo de la inmunidad protectora en humanos, después de una infección amibiana invasora. Se ha demostrado la aparición de una reacción de hipersensibilidad cutánea contra infecciones amibianas experimentales, como un índice de la reacción inmunitaria mediada por células. Aunque las reacciones intradérmicas hacia antígenos amibianos ajenos han sido generalmente negativos durante la fase inicial del absceso hepático. La ausencia de la inmunidad celular en etapas tempranas de la amibiasis, y su presencia durante las últimas etapas, sugieren un estado pasajero anérgico.

Se ha reportado que la prueba de proliferación linfocítica in vitro ha resultado útil para valorar la respuesta inmune celular en amibiasis.

Sin embargo, cuando se ha intentado valorar esta respuesta con extractos crudos solubles de trofozoítos de Entamoeba histolytica obtenidos de diferentes cepas, en linfocitos de murinos (bazo) y de humanos (sangre), se ha encontrado que estos extractos presentan actividad mitogénica, por lo cual no se puede establecer una buena correlación entre la respuesta inmune celular específica valorada por la prueba de proliferación linfocitaria utilizando estos extractos.

Con respecto a la inmunidad local intestinal en la amibiasis se han realizados pocos estudios, y por lo tanto poco se sabe de los mecanismos inmunes protectivos que se establecen a nivel intestinal.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

I. Estandarizar el micrométodo de Transformación Blastoide en linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y bazo de ratones BALB/c.

II. Determinar si un filtrado amibiano (FA), un extracto total (ET) y las fracciones vesicular (P-15), postvesicular (S-15) y la fracción nuclear (FN) de Entamoeba histolytica cepa HM1-IMSS presentan actividad mitogénica en linfocitos de GLMs y bazo, utilizando el micrométodo de transformación blastoide.

III. Comparar si el efecto mitogénico es el mismo para linfocitos de GLMs y bazo.

Se utilizaron 8 ratones hembras de 2.5 meses de edad, para cada fracción o extrato amibiano a probar. Las fracciones

subcelulares y el filtrado amibiano se obtuvieron de trofozoitos de E. histolytica cepa HM1-IMSS cultivados en TYI-S-33.

Los linfocitos aislados de GLMs y de bazo se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 5 % de suero fetal bovino en placas de microcultivo de fondo en "U". Cada una de las fracciones o extracto amibiano a probar fueron en cantidades de 1 a 100 ug de proteína, cada dosis fue probada por triplicado para cada ratón (24 determinaciones/dosis): los cultivos se incubaron por 6 días a 37° C en una atmósfera controlada con 5 % de CO₂; 18 h antes de finalizar el periodo de incubación se agregó 1 uCi de ³H-Tdr en RPMI-1640 sin suplementar, al término del periodo de incubación, las células se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio y la radiatividad se determinó en un contador de centelleo.

Se encontró una proliferación linfocítica en los GLMs con el FA, que fué proporcional a la concentración; siendo máxima a 10 ug de proteína, con dosis superiores el efecto mitogénico disminuyó.

La respuesta observada en las células de GLMs al FA fué diferente de la estimulación proliferativa observada en estas células al utilizar concanavalina A (Con A) en cuanto a su cinética proliferativa y dosis de estimulación óptima.

El ET fué mitogénico para linfocitos de GLMs y bazo, teniendo mayor actividad sobre linfocitos de GLMs. Sin embargo el efecto mitogénico se observó solo con una dosis de 100 ug de proteína del extrato total, las fracciones P-15 y el FN también tuvieron un efecto mitogénico para ambos tipos de linfocitos con dosis de 50 y 75 ug. La fracción S-15 no tuvo efecto estimulatorio ni en linfocitos de GLMs y bazo.

Se ha sugerido que la actividad mitogénica encontrada en extratos solubles de E. histolytica conduce a un estado de inmunosupresión, debido a la actividad inespecífica policlonal de linfocitos, que altera el equilibrio celular a nivel intestinal.

SUMMARY

Diverse investigators have demonstrated a mitogenic of amebic extracts on circulating lymphocytes in humans and the spleen of mice it has been considered as a mechanism to evade the immunity response; considering the importance of the lymphoid tissue associated to the intestine in amebiasis, the objective of this work was to evaluate the mitogenic activity of different amebic fractions on lymphocytes of mesenteric lymph nodes utilizing the method of blastoid transformation by the incorporation of H-Tdr.

Materials and Methods

12 week female mice were utilized in all experiments the lymphocytes of mesenteric lymph nodes were obtained according to the described method, the following amebic fractions were studied: amebic filtrate (FA) obtained according to the described method, total amebic extract amebic (ET) and the P-15, S-15, FN fractions in accordance to the reported procedure and for the evaluation of the mitogenic activity of the different fractions the micromethod of blastoid transformation was utilized.

Results

Comparison of mitogenic activity of different amebic fractions on lymphocytes from mesenteric lymph and spleen of mice.

	ug protein/100 ul		Lymphocytes
	Maximum stimulation		Stimulation
		M.L.N.	index (S.I)
			Spleen
Con A (Control positive)	3 - 5	9.3	18.32
Amebic Filtrate	10	172.48	Not done
P-15 Fraction	50	541.14	558.32
S-15 Fraction	50	2.03	2.14
F-N Fraction	50	64.58	56.28
Total extract (ET)	100	675.69	549.86

c.p.m of lymphocytes stimulated with amebic fraction

S.I

c.p.m lymphocytes without stimulus

IN each experiment 8 mice were utilized and each testing was by triplicate.

Results demonstrate mitogenic activity in different amebic fractions; we still lack the definition of composition and localization of the mitogenic proteins and to study if such activity is shared by the different amebic stains, the described methodology will permit to evaluate in the near future the local cellular immunity response against this parasite.

I. INTRODUCCION.

A. ANTECEDENTES DE Entamoeba histolytica.

La amibiasis invasora es un problema de salud grave a nivel mundial en México, China, la porción Oriental de América del Sur, en todo el Sureste Asiático y la India. Las investigaciones epidemiológicas han revelado que la frecuencia de la amibiasis es de 5.9 % en nuestro país. Siendo una de las áreas geograficas más afectadas por la enfermedad (1).

La amibiasis es la infección del hombre causada por el parásito protozoario intestinal Entamoeba histolytica (E. histolytica). Esta especie puede vivir como comensal en la luz del intestino grueso (amibiasis luminal), pero puede invadir la mucosa intestinal produciendo disenteria y por diseminación sanguínea puede causar lesiones extraintestinales, particularmente, en el hígado (amibiasis extraintestinal). Es una de las infecciones más frecuentes en el hombre, se ha estimado que el 10 % de la población mundial es afectada (2, 3).

La clasificación taxonómica más actualizada de la amiba fue dada en 1980 por el Comité Sobre Sistemática y Evaluación de la Sociedad de Protozoólogos y es la siguiente (4,5):

Subreino	Protozoos
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	<u>E. histolytica</u> .

Los trofozoitos, o forma activa, miden de 10 a 60 micras (um) de diámetro, su núcleo es excéntrico, que suele reconocerse como un anillo granuloso fino en las amibas sin tefir. Los quistes miden de 5 a 20 um y, dependiendo de su madurez, tienen de 1 a 4 núcleos (6).

1.- BIOLOGIA CELULAR DEL TROFOZOITO.

El trofozoito es la forma móvil de E. histolytica, es una célula dinámica y pleomórfica, cuya forma y motilidad son extremadamente sensibles a los cambios físico-químicos. La variación local de pH, osmolaridad y potencial redox pueden alterar la forma y motilidad de la célula. El enfriamiento a menos de 37 C resulta en un progresivo "retardamiento" de su motilidad, las amibas se vuelven esféricas y se separan de la superficie mientras que aquellas que forman grumos tienden a disgregarse.

El ciclo vital de este parásito ya se ha caracterizado completamente y se inicia por la ingestión de quistes presentes en alimentos o bebidas, seguida de la desenquistación en el intestino delgado (íleon). La E. histolytica se multiplica por un proceso de división binaria, después de algunas divisiones la motilidad de las amibas disminuye y los organismos muestran menos pseudópodos, se hacen redondas y más pequeñas, con pérdida del material en su citoplasma. Este estadio se llama prequiste, y es seguida por la secreción de una membrana gruesa y dos o tres divisiones adicionales del núcleo, transformándose en quiste nuevamente, el citoplasma se divide tantas veces como existan núcleos; este estadio se llama metaquiste. Las amibas pequeñas llegan a la luz intestinal, aumentando de tamaño y se vuelven trofozoitos, completando el ciclo biológico (7). El contenido citoplasmico se divide clásicamente en dos porciones; una zona externa, o ectoplasma, que es más clara y que da lugar a los pseudópodos, y una zona interna, o endoplasma, granular y con muchas vacuolas. El núcleo ocupa aproximadamente una quinta parte del volumen celular y aparece como una esfera central rodeada de una membrana delgada, con cromatina granular dispuesta en masas irregulares. La superficie de las amibas (trofozoitos) contiene una membrana plasmática, con la clásica apariencia trilaminar, pero más gruesa que las membranas plasmáticas de mamíferos (8).

La actividad dinámica y el pleomorfismo de los trofozoitos están basados en una configuración citoplasmática más fácil de definir por sus carencias que por sus semejanzas, en comparación a las células eucarióticas típicas. Así, las amibas no tienen citoesqueleto estructurado (ni microfilamentos y microtúbulos); no disponen tampoco de un

sistema membranal equivalente al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico; no se observan mitocondrias en las amibas y, finalmente, éstas carecen de un sistema de lisosomas primario y secundario (5,6,9).

En el nivel ultraestructural, el citoesqueleto de células eucarióticas está compuesto de tres diferentes componentes fibrilares citoplásmicos que están involucrados en el movimiento celular y soporte: 1) los microfilamentos que están formados de actina, con un diámetro promedio de 6-8 nm; 2) los microtúbulos que contienen tubulina, con un diámetro de 20-25 nm; 3) y los filamentos intermedios, compuestos de vimentina y citoqueratinas, que tiene un grosor de 10 nm. Sin embargo se sabe muy poco sobre la organización estructural y características bioquímicas del citoesqueleto en E. histolytica. Aunque los microfilamentos y microtúbulos son considerados como los componentes universales de las células eucarióticas, no hay una evidencia clara de estas estructuras en E. histolytica (9, 10).

Ciertos productos amibianos son liberados dentro del ambiente extracelular, que dañan al tejido epitelial blanco, y enzimas que facilitan la invasión de tejidos por el parásito. Estas sustancias son canalizadas por medio de compartimientos unidos en la membrana a través de la superficie celular.

La membrana plasmática de E. histolytica es de aproximadamente 10 nm de grosor y muestra la estructura o la apariencia clásica reportada para otras membranas biológicas en cortes perpendiculares. Esta membrana es más gruesa que la membrana plasmática de las células de mamíferos, muchas de las cuales miden aproximadamente 8 nm. La membrana plasmática de los trofozoítos de E. histolytica cultivados están rodeada por una cubierta superficial demostrable por el uso de reactivos citoquímicos que incrementan la densidad electrónica de membranas que contienen carbohidratos, como el rojo de rutenio o azul de alciano. La cubierta superficial es de interés debido a que contiene algunas de las proteínas amibianas reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario del huésped durante el establecimiento de la amibiasis invasiva. Además, la acción patogénica de las amibas puede depender del contacto directo con las células huésped, y la virulencia de las amibas, puede estar relacionada con la composición y propiedades de los componentes de la cubierta de superficie (11,12).

La cubierta superficial de E. histolytica está formada por filamentos cortos, de 6-10 nm de longitud, uniformemente distribuidos sobre la superficie celular. De la misma manera puede contener residuos de manosa o glucosa los cuales muestran afinidad por la lectina concanavalina (Con A) con una interacción por estos azúcares (13). Como resultado de la unión con los ligandos específicos, los componentes de la superficie se acumulan sobre el uroide y posteriormente son eliminados hacia el medio. Aún en ausencia de ligandos específicos existe un desprendimiento continuo de los componentes de superficie en trofozoitos de E. histolytica con movimiento activo. Este mecanismo de desprendimiento de los componentes de superficie puede también ser de interés cuando se evalúan los medios de evasión de la respuesta inmunitaria (14).

Los estudios de microscopía electrónica han mostrado variaciones en el grosor de la cubierta superficial de los trofozoitos de E. histolytica dependiendo del origen de las amibas. La cubierta superficial ha mostrado ser más prominente en las formas invasivas de amibas obtenidas de lesiones colónicas y de abscesos hepáticos (15). De acuerdo a Lushbaugh y Miller, la cubierta superficial de amibas cultivadas monoxénicamente o de lesiones intestinales son de cerca de dos veces más gruesa que las células axénicas. Se han corroborado estas observaciones midiendo el grosor de la cubierta superficial de las amibas obtenidas de la cepa HM1-IMSS cultivadas bajo condiciones axénicas y monoxénicas (16).

De los más de 100 monosacáridos diferentes que se encuentran en la Naturaleza sólo algunos forman parte de las glicoproteínas y de los glucolípidos de la membrana. Los principales son la galactosa, la manosa, la fructosa, la glucosamina, la glucosa y el ácido siálico. Tanto la complejidad de algunos oligosacáridos de las glicoproteínas y de los glucolípidos de la membrana plasmática, como su posición sobre la superficie celular, sugieren que pueden desempeñar un papel importante en los procesos de reconocimiento entre célula y célula. Algunas células tienen proteínas de superficie que se unen a ciertos oligosacáridos; teóricamente estas lectinas podrían reconocer otros oligosacáridos de la superficie de otras células (17). Muchas células eucarióticas contienen ácido siálico (ácido neuramínico) como uno de los componentes significativos de su cubierta superficial. Este carbohidrato parece estar ausente en la superficie de E. histolytica ya que el hierro coloidal

que se une a pH bajo no se modifica por incubación con la neuraminidasa (18).

La cubierta superficial de ciertas cepas de E. histolytica de baja virulencia pueden marcarse con ferritina catiónica a un pH neutro. Estas cepas tienen una carga electrónica global negativa en la cubierta superficial, demostrable por microelectroforesis. Sin embargo, las cepas virulentas de E. histolytica no tienen esta movilidad electroforética a un pH neutro y no unen ferritina catiónica bajo estas condiciones. Se desconoce las bases químicas para estas diferencias en la electrocinética de amibas virulentas y no virulentas (19).

2. LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La membrana plasmática de E. histolytica ha sido estudiada por el método de congelamiento-fractura que permite la visualización de componentes localizados en la región media o hidrofóbica de la región de la membrana. Así como en otras células eucarióticas, la parte interna de la membrana plasmática, o cara P, que está en contacto con el ectoplasma está cubierto por una población abundante y heterogénea de partículas de membrana, muchas de las cuales parecen proteínas integrales. En comparación con la cara complementaria E que ocupa el lado externo de la membrana plasmática, tiene una población menos abundante de partículas de membrana. Ninguna distribución especializada de partículas de membrana se encuentran en E. histolytica; por lo tanto, las regiones que contienen canales micropinocíticos y pseudópodos no muestran modificaciones en términos de la disposición de partículas de membrana. Una característica remarcable de la morfología estudiada por congelamiento-fractura de trofozoitos de E. histolytica es la presencia de áreas con una densidad alta de partículas de membrana. Estas regiones enriquecidas por partículas tienen un contorno irregular y sus dimensiones más grandes alcanzan 0.5 nm. Las imágenes de fusión de membrana entre las vacuolas citoplasmáticas de membranas plasmáticas durante la exocitosis son frecuentemente obtenidas de E. histolytica. Las regiones de endocitosis a través de la micro o macropinocitosis también carecen de una distribución especializada de partículas de membrana (6). Es probable que los avances futuros en el conocimiento de la composición química de los componentes de membrana de E. histolytica den

una mayor identificación posible de las especies moleculares específicas de proteínas en términos de una población dada de partículas de membrana vistas por el método de congelamiento-fractura (6, 9).

3. FORMACION DE CASQUETE (CAPPING).

Se han observado en ciertas células, la presencia de manchas o agrupaciones debidas a la interacción de un número importante de ligandos. Los determinantes de superficie que se les une ciertas sustancias tales como lectinas, anticuerpos y ferritina catiónica, los cuales se combinan con los determinantes de superficie del trofozoito (12).

Las sugerencias del fenómeno de formación de casquete puede ser un mecanismo poderoso para la remoción de Ac sobre la superficie de E. histolytica, lo que ha sido reforzado por los resultados de Aust-Kettis y Soundqvist (20). Sin embargo, estos autores informan que una doble capa de Ac era necesaria para inducir la cubierta de superficie. Calderon y col (21) demostraron que la formación del casquete era posible con una sola capa de Ac contra E. histolytica usando concentraciones mas altas de inmunoglobulinas. La segregación de areas de la superficie de E. histolytica se acompaña por un plegamiento extensivo de la membrana, seguido por la liberación posterior de la región invaginada de la membrana. Es probable que la redistribución de los Ac de superficie de la membrana y su liberación subsecuente de la cubierta sea por medio de un anillo de constricción que es regulado por microfilamentos de actina que se acumula en la región uroide de la amiba.

4. DESPRENDIMIENTO.

La naturaleza dinámica de la superficie celular de E. histolytica no solo es reflejada por la movilización rápida de los Ac después de que se unen a los Ag de superficie a través de la cubierta, sino también a la liberación constante de moléculas de superficie dentro del ambiente extracelular que podrían eventualmente interferir con la mediación efectiva de la inmunidad celular contra protozoarios invasivos.

El proceso de desprendimiento de moléculas en amibas puede ser similar al que presentan los protozoarios ciliados tales como *Tetrahymena* y *Paramecium* (6). Los experimentos con marcadores realizados con *Neodiplocystis castellana* han indicado que el material de cubierta superficial es un precursor del microexudado. En el caso de *E. histolytica*, la naturaleza del microexudado no se conoce, pero la posibilidad de que contenga material antigénico soluble, sugiere el estudio de los antígenos asociados a la membrana (9, 22).

B. FACTORES DE VIRULENCIA DEL PARASITO.

Los factores que determinan la virulencia del parásito intestinal *E. intestinalis* y su cambio de comensal inocuo a una invasión agresiva está aún sin determinar (23). El desarrollo de un método de cultivo axénico in vitro, de *E. histolytica* ha facilitado el estudio de muchos aspectos sobre la virulencia de la amiba en ausencia de otros microorganismos con el que el trofozoito usualmente se asocia (24). Con los cultivos axénicos de trofozoitos de *E. histolytica* aislados de pacientes con amibiasis se ha relacionado el grado de virulencia por varios criterios: a) Formación de absceso hepático en hamster, b) Destrucción de células de mamíferos en cultivo, c) Eritrofagocitosis, y d) Substancias enterotóxicas solubles presentes en sus cultivos.

Varios investigadores han observado que la virulencia de la amiba disminuye en cultivos axénicos prolongados, y se incrementa cuando los trofozoitos son inoculados en hamster y se reasilan del hígado, o con la reasociación con bacterias (25, 26).

Por otro lado, la sobrevivencia de trofozoitos de *E. histolytica* en el hombre ha sido caracterizada por:

- 1) La naturaleza del huésped.
- 2) Los factores que determinen la virulencia de la cepa.
- 3) La existencia de una respuesta inmunitaria específica activa.

Dentro de los factores del huésped que pueden influir sobre la infección son:

- 1) El estado nutricional y hormonal.
- 2) El estado inmunitario humoral y celular del individuo (5, 27).

Jarumilinta y Kradolfer dan evidencia de una actividad de E. histolytica que afecta a los leucocitos de varias especies como el hombre, borrego, conejo, pollo, cerdo, hamster, rata y ratón. Se comenta que ese daño es debido a una enzima del propio trofozoito y que puede ser responsable de la degranulación y la lisis intracelular, aunque no se ha identificado bioquímicamente a esta enzima (28). Sin embargo, la capacidad destructora de la amiba no puede ser adscrita a una simple proteína, toxina, enzima, organelo o función celular (29).

Las condiciones que conducen a la resolución de la enfermedad son multifactoriales y probablemente estén relacionadas con un balance entre los mecanismos patogénicos del trofozoito y los mecanismos de defensa del huésped, tanto inmunes como no inmunes. No se han establecido cuales mecanismos del huésped humano son los responsables para limitar la invasión por la amiba o dar inmunidad.

Se ha mencionado que la E. histolytica posiblemente induce inmunosupresión por dos mecanismos:

- 1) Por la actividad citopatogénica y fagocítica de los trofozoítos que lleva a una eliminación de células inmunes.
- 2) La producción de factores solubles amibianos que afectan preferencialmente células T provocando un agotamiento en las células precursoras (30).

En forma resumida en la tabla No. 1 se presentan los posibles factores de patogenicidad de la amiba.

TABLA 1. POSIBLES FACTORES EN LA PATOGENICIDAD DE LA AMIBA.

Marcadores	Mecanismos Agresivos	
	Unidos a la Membrana	Solubles
Producción de absceso hepático en hamsters.	Lisosomas de superficie.	B-N-acetil glucosaminidasa.
Aglutinación con Con--canavalina A.	Colagenasa.	Factor inhibitorio de la quimiotaxia.
Adherencia a células epiteliales y glóbulos rojos.	Canales iónicos proteicos o ameboporo.	Citotoxinas intracelulares.
Fagocitosis de células epiteliales y glóbulos rojos.		
Tipos de zimodemo II, VI, VII, X, XI, XII, XIV, XIX y XX.		

Martínez-Palomo (1986), Amebiasis Human Parasite Disease, Chapter 2, Elsevier Amsterdam, 1st. p 69 (9).

La inoculación intrahepática de cepas patógenas a hamsters da como resultado un gran número de abscesos (31), mientras que cepas obtenidas de portadores sanos son incapaces de producir lesiones (32).

La amiba es capaz de fagocitar gran variedad de material particulado como gránulos de almidón, bacterias, varios protozoarios, esferas de poliestireno y eritrocitos (2, 6).

Cuando eritrocitos humanos y trofozoitos son puestos a interactuar, un número considerable de glóbulos rojos se unen a la superficie de la amiba y se observa claramente una aglutinación (33). Posteriormente se lleva a cabo la fagocitosis, la cual aumenta con la patogenicidad de la cepa amibiana (6). Se ha observado también, que la susceptibilidad de E. histolytica a ser aglutinada por la lectina vegetal Con A es mayor en cepas patógenas (19).

C. INMUNOLOGIA DE LA AMIBIASIS.

1. MARCO DE REFERENCIA.

En la mayoría de los individuos afectados con E. histolytica, este parásito se comporta como comensal. Sin embargo a un porcentaje bajo de individuos les provoca la enfermedad (1), por la invasión de la mucosa colónica; resultando en una colitis y en ocasiones una diseminación al hígado, lo que provoca un absceso hepático; siendo también posible una enfermedad pleural, pericarditis, peritonitis o fistulas cutáneas, que puede ser una consecuencia del absceso hepático o perforaciones intestinales.

Existe controversia acerca del desarrollo de una inmunidad protectora en humanos, después de una infección amibiana invasora. Los estudios de portadores amibianos asintomáticos demuestran un aumento en la prevalencia de amibas en las heces conforme al paso de la edad, lo que indica una deficiencia inmune en la eliminación de los parásitos.

Por otro lado, se ha reportado que antígenos administrados por vía oral en animales de laboratorio, inducen una tolerancia, con una concomitante disminución de la respuesta inmune celular y humoral (34). Se ha observado que los portadores asintomáticos aparentemente no poseen una población de linfocitos que respondan a antígenos amibianos en individuos con amibiasis intestinal. Sin embargo, en pacientes con absceso hepático sí existe una respuesta de linfocitos a antígenos amibianos (35).

La malnutrición provoca un estado de inmunodeficiencia, y ha sido asociado con la amibiasis sintomática, y el

absceso hepático (27, 36).

En un estudio seroepidemiológico, el 81 % de los pacientes con amibiasis colónica invasiva o con absceso hepático amibiano presentaron títulos importantes de IgG de la subclase 1 circulantes contra E. histolytica (37).

La protección conferida a hamsters inmunizados con diferentes preparaciones antigenicas amibianas no ha sido positivamente correlacionado con la respuesta de Ac en suero (38).

Desde hace mucho se reconoce la aparición de una reacción de hipersensibilidad cutánea contra infecciones amibianas experimentales como un índice de la reacción inmunitaria mediada por células. Aunque las reacciones intradérmicas a antígenos amibianos axénicos han sido generalmente negativos durante la fase inicial del absceso hepático amibiano. Los resultados negativos pueden ser atribuidos a una disminución de linfocitos T circulantes. Las pruebas para la inhibición de la migración de los macrófagos también han sido negativos durante los estados iniciales del absceso hepático amibiano tanto en humanos como en hamsters. La ausencia de inmunidad celular en etapas tempranas de la amibiasis, y su presencia durante las últimas etapas, sugieren un estado pasajero anérgico, como ha sido descrito en otros tipos de infecciones (39, 40).

2. RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL.

En pacientes con absceso hepático amibiano se ha demostrado la presencia de IgG circulante contra E. histolytica. Generalmente, los individuos con infecciones asintomáticas (presumiblemente colonización intestinal) desarrollan una baja respuesta de anticuerpos (Ac), que ha sido aceptado como un indicio de una invasión antes de la sintomatología de la enfermedad invasiva. Los títulos altos de Ac séricos están asociados con el inicio de la enfermedad invasiva. La amibiasis intestinal invasiva puede ocurrir en presencia de altos títulos de Ac. Varios estudios han demostrado el desarrollo de coproanticuerpos de la clase IgA en la amibiasis intestinal; así también se ha demostrado la presencia de Ac de la clase IgA en bilis de ratas inoculadas

contra antígenos de E. histolytica (41).

La caracterización de la respuesta inmunitaria humoral puede facilitar el diagnóstico de la amibiasis invasora al cuantificar los Ac en la circulación de los pacientes con sintomatología sugestiva de este padecimiento, así como la realización de estudios seroepidemiológicos. Se ha reportado la persistencia de Ac contra E. histolytica en individuos, varios meses después de la erradicación del parásito, lo que ha limitado la utilización de este procedimiento como un índice de infecciones amibianas. En base en lo anterior, es preferible el empleo de métodos inmunológicos para el diseño de pruebas en la identificación de Acs amibianos en heces.

La respuesta inmunitaria humoral ha sido identificada por la presencia de Ac circulantes, que son generalmente detectados unas semanas después de la infección experimental en hamsters. Muchos de los Ac se encuentran en la fracción de IgG aparentemente de la subclase 2. Sin embargo, es probable que los antígenos amibianos circulantes estén presentes durante alguna fase de la amibiasis invasiva, los complejos Ag-Ac circulantes no se han encontrado, en pacientes con absceso hepático amibiano (42).

Dado el desarrollo de los Ac circulantes en la amibiasis invasiva, la generación de complejos inmunes solubles pueden ser importantes en la patogénesis. Sin embargo, las manifestaciones de los complejos inmunes, relacionando a la enfermedad han sido generalmente ausentes en amibiasis, de acuerdo a la demostración de los complejos inmunes en algunos sueros (43).

Estudios previos han demostrado que los anticuerpos policlonales contra trofozoitos intactos de Entamoeba, se unen a la superficie celular, y que son ocasionalmente liberados o ingeridos. Sin embargo, el reconocimiento molecular no ha sido bien caracterizado, y tampoco el papel que tiene en los mecanismos citotóxicos contra este parásito (44).

3. RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR.

Neutrófilos Polimorfonucleares (N.P) y Macrófagos (M0).

Guerrant y col demostraron que una cepa axénica de E. histolytica altera la viabilidad de los neutrófilos humanos a

través de un contacto dependiente e independiente del suero, sin pérdida de viabilidad amibiana. Los neutrófilos son capaces de matar a cepas poco virulentas de amibas como las cepas NIH:303 y NIH:200 y a la cepa Laredo de E. histolytica. La susceptibilidad de los N.P. hacia diferentes cepas de amibas en condiciones in vitro se ha asociado con la actividad de lectina, la cual es inhibida por la N-acetil-D-galactosamina (GalNac). Así se ha demostrado experimentalmente que 10 mg/ml de GalNac inhibe la muerte de los N.P. por amibas axénicas virulentas de la cepa HMI-IMSS y permite a los N.P. eliminar a las amibas (45, 46).

Los estudios por Stern y col en un modelo de ratones desnudos con absceso hepático amibiano dan una elevada importancia al macrófago (MO) como la célula crítica efectora del huésped. Los MO derivados de los monocitos activados con Con A o PHA liberan una linfocina que afecta a los trofozoítos de E. histolytica causándoles la muerte alrededor de 18 h después de las incubación. La muerte del trofozoito ocurre a una razón de MO:amiba de 10:1, condición que es requerida en células tumorales. Los mecanismos oxidativos de los MO son requeridos para la lisis de las amibas. Asimismo, los MO de calostro humano al incubarlos con trofozoítos de E. histolytica afectan la viabilidad y adherencia de estos últimos (47).

Sin embargo, ha resultado evidente que tales mecanismos dependen de la resistencia o susceptibilidad genética del huésped hacia la infección amibiana y es probable que esta resistencia natural esté ligada con la función o actividad de los MO, lo que se ha observado en el absceso hepático amibiano en hamsters; sugiriendo que estas células pueden dar protección contra E. histolytica.

Los modelos experimentales han indicado la importancia de los mecanismos inmunes mediados por células en la amibiasis intestinal y en el absceso hepático amibiano. Ghadirian y col al estudiar al hamster como modelo de la amibiasis, encontraron que los procedimientos que deprimen la inmunidad mediada por células tales como el tratamiento con esteroides, timectomía neonatal, esplenectomía, radiación, terapia con sílica gel y globulinas antimacrófagos y antilinfocitos, tienen como resultado un incremento en la formación del absceso hepático amibiano (48).

La respuesta inmunitaria mediada por células en amibiasis ha

sido estudiada in vivo mediante la prueba de hipersensibilidad de tipo retardado. Los estudios in vitro se han orientado hacia la detección de factores mitogénicos y al factor inhibitorio de migración (MIF). Los resultados tempranos obtenidos de inyecciones intradérmicas de antígenos amibianos (Agam) no muestran una clara correlación con los hallazgos serológicos (49). Esta discrepancia puede ser debida a las variaciones de los antígenos usados y a las diferencias en el tiempo de la interpretación de las reacciones cutáneas.

La tasa de transformación linfocítica inducida por Con A en linfocitos de pacientes con absceso hepático amibiano no muestra diferencias significativas con respecto a los de individuos normales (11).

Los experimentos realizados por K. Chadee y E. Meerovitch han demostrado que el efecto citotóxico sobre trofozoitos de E. histolytica producido por las células de exudado peritoneal (PECs) y células linfoides de ganglios mesentéricos obtenidos de gerbos (Meriones unguiculatus) con amibiasis intestinal fue diferente en cada etapa de la infección. Esto indica que las células linfoides son estimuladas de una manera diferente o que existe una eliminación de células citotóxicas que puede ocurrir en el tejido linfoide durante la infección (50).

Knight opina que las enfermedades amibianas son producidas por una fase transitoria de inmunosupresión. Se ha demostrado que la infección amibiana primaria del intestino a nivel clínico o subclínico suele estar relacionado con cierto grado de supresión de la respuesta inmunitaria (29). Esta observación sugiere el secuestro de las células reactivas al antígeno en el tejido linfoide que puede contribuir a un decremento correlacionado al estado inmune del huésped.

Estudios de sensibilidad celular a antígenos amibianos en el hombre han estado limitados por dos grandes razones: una ha sido la sensibilidad de los linfocitos de pacientes con absceso hepático al Ag amibiano y la otra a un posible efecto mitogénico de Ag amibianos en microcultivos.

La disminución en el número y función de linfocitos T en el absceso hepático amibiano ha sido reportado (29).

La baja respuesta blastogénica a mitógenos y a Agam en pacientes con absceso hepático amibiano y disentería amibiana

puede ser debido a la infección amibiana. O puede ser asociada a un estado de malnutrición, a la competencia de Ag por Ac y a la sensibilidad específica linfocítica para E. histolytica (Ver figura 2).

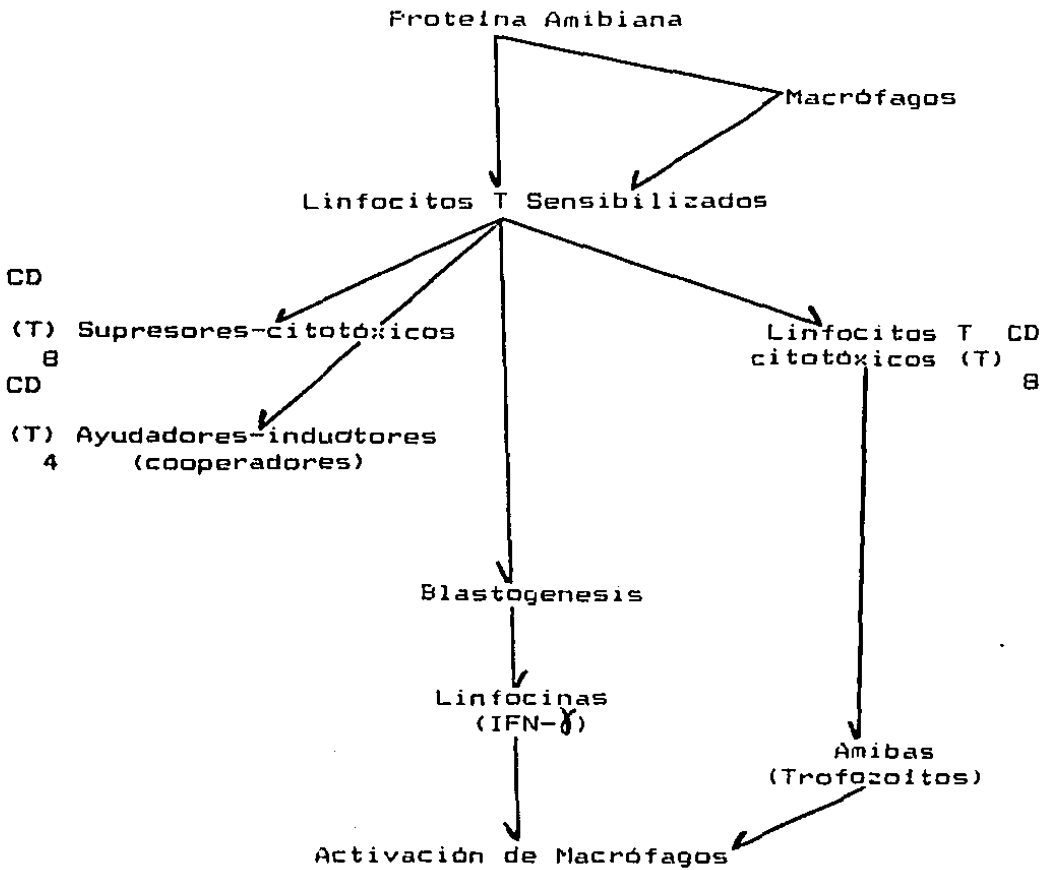


Figura 2. Integración de las vías aferentes y eferentes de la inmunidad mediada por células en amebiasis invasiva (29).

D. LECTINAS AMIBIANAS.

Se ha demostrado que la adherencia de *A. canaliculata* al epitelio colónico y a las células inflamatorias del huésped permite el establecimiento y desarrollo de la enfermedad; debido, a que mediante este mecanismo se desencadenan sus actividades citolítica y fagocítica, dando como resultado la destrucción de las barreras de la mucosa intestinal y la invasión a los tejidos (51, 52).

Parece ser que la adherencia de la amiba a las células blanco está mediada por una proteína que se une a carbohidratos (lectina). Lo anterior se ha concluido de observaciones en modelos *in vitro*, donde se ha estudiado la interacción de amibas axénicas con cultivo de células epiteliales. De estos estudios se han descrito tres pasos secuenciales en la interacción de la amiba con las células blanco: adherencia, citólisis extracelular y fagocitosis. Otros investigadores han reportado citólisis dependiente del contacto de células de cultivo de tejidos con la amiba; la amiba también destruye neutrófilos humanos, vía evento contacto dependiente (46).

La adherencia o actividad aglutinante se ha observado tanto en trofozoítos enteros (adhesinas) como en extractos de ellos (lectinas). También se ha encontrado que esta actividad puede ser bloqueada con azúcares específicos que se unen a los sitios receptores de la proteína, inhibiendo el efecto citopático.

Se ha visto que los oligosacáridos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) inhiben la adherencia de las cepas HM1-IMSS, HM3-IMSS y HK-9 a células epiteliales (epitelio intestinal de cobayo y línea MDCK). Las tres cepas de diferente virulencia mostraron semejante eficiencia en la adhesión (53).

La adherencia de los trofozoítos HM1-IMSS y HK-9 a monocapas de la línea celular Henle 407 es inhibida por glucoconjugados que contienen GlcNAc, tales como peptidoglicánas bacteriano, quitina e IgA (54).

La adhesión de la cepa HM1-IMSS a células de ovario de hamster chino (células CHO) y a eritrocitos humanos (grupo D) es inhibida específicamente por N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y en menor grado por la galactosa (Gal) (55).

La adherencia de las bacterias opsonizadas Escherichia coli y Staphylococcus aureus a los trofozoitos de la cepa 200-NIH fue marcadamente inhibida por el glucoconjugado que contiene GlcNAc, como peptidoglicán y oligosacáridos de quitina, tan bien como por GalNAc (56).

Otra investigación muestra la inhibición de la adherencia de las cepas 200-NIH, HK-9 y HMI-IMSS hacia Escherichia coli 055 y Staphylococcus aureus 050 por galactosa, lactosa, GalNAc, también como por asialofetuina y el lipopolisacáridos de E. coli 055 (57).

La adherencia de los trofozoitos de E. histolytica a células blanco se ha estudiado utilizando anticuerpos monoclonales y mutantes del parásito deficientes en la adhesión con el fin de localizar e identificar los determinantes antigénicos de superficie involucrados en este mecanismo y en la patogenicidad. De esta manera se ha encontrado una adhesina de aproximadamente 112 KDa. El recubrimiento específico de esta proteína con anticuerpos monoclonales (AcMs) Adh-1 y Adh-2 inhibió la adhesión, fagocitosis y el efecto citopático de los trofozoitos sobre las monocapas de los cultivos celulares (58).

Es posible que otra u otras moléculas participen en la adherencia del trofozoito a las células blanco, ya que estudios previos han identificado dos actividades de lectina en E. histolytica. Una parece ser una proteína unida a la membrana, ya que su actividad se ha demostrado en fracciones de membrana. La otra está laxamente unida a la membrana, y su actividad fácilmente se remueve con NaCl 0.15 M. La lectina unida a la membrana tiene actividad hemaglutinante, y es inhibida por oligosacáridos que contienen N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) tales como citotriosa y quitina, tiene un pH óptimo de 5.7 y es sensible al calor y al ataque proteolítico. Esta lectina puede ser la responsable de la adherencia de los trofozoitos a las células del epitelio del intestino humano, así como a los eritrocitos.

La lectina soluble media la adhesión de los trofozoitos a las células de ovario de hamster chino y a la mucosa colónica del humano y de la rata, tiene un pH óptimo de 7.2 y se inhibe con N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y asialofetuina. Se dice que esta lectina puede tener un papel importante en la citólisis mediada por contacto.

En 1980 se purificó por cromatografía de afinidad con una columna de quitina, una lectina procedente de extractos crudos de trofozoitos axénicos (HK-9, 200-NIH y HM1-IMSS) y monoxénicos, capaz de aglutinar diferentes tipos de eritrocitos sin que esta actividad se correlacionara con la virulencia de las cepas.

Con fracciones subcelulares de la cepa HK-9, dos terceras partes de la actividad hemaglutinante fué detectada en el sobrenadante de 100 000 g x 60 min de un sonicado. Como inhibidores de tal actividad se encontraron a un hidrolizado parcial de quitina y al trimero y tetrámero de la GlcNAc (59).

Con la cromatografía de filtración en gel de un sobrenadante de un sonicado amibiano se encontró una lectina inhibida por GalNAc de 43,000 a 67,000 Da que aglutina células CHO, glóbulos rojos y polimorfonucleares (PMN). La virulencia in vitro para células CHO y para neutrófilos humanos de las cuatro cepas probadas fué como sigue: HM1-IMSS > H303-NIH = 200NIH > Laredo. La cepa HM1-IMSS fué la que tiene mayor sensibilidad a ser inhibida por GalNAc en su adherencia a estas células (51).

Una proteína de 220 Kilodalton (KDa) con propiedades de lectina fué aislada de un homogenizado de E. pistolytica HM1-IMSS, purificada por cromatografía en sefarosa 4B y electroelución en geles de poliacrilamida con 5 % de dodecil sulfato sódico (SDS); observando que contiene 9 % de carbohidratos, siendo rica en residuos hidrofóbicos, inhibe la adhesión de los trofozoitos a cultivos celulares (MDCK) y aglutina eritrocitos humanos, dicha aglutinación es inhibida por oligosacáridos que contienen GlcNAc, tales como ácido hialurónico, quitina, citotriosa y por sus anticuerpos. Es reconocida por anticuerpos dirigidos hacia la membrana por lo que se sugiere que es un componente de la membrana plasmática y podría ser una de las moléculas *receptoras* involucradas en la adherencia de la célula (60).

Recientemente, hay dos grupos de investigadores que han demostrado que los anticuerpos monoclonales obtenidos contra trofozoitos íntegros o sonicados se unen específicamente a una lectina que es inhibida por N-acetil-D-galactosamina o una adhesina de superficie de 170 Kilodalton (KDa) y que particularmente inhibe la adherencia de los trofozoitos a las células. Esta lectina de 170 KDa es reconocida

específicamente por los sueros de pacientes convalescientes con absceso hepático amibiano (61).

E. ACTIVIDAD MITOGENICA DE EXTRACTOS AMIBIANOS.

Los parasitos pueden evadir los mecanismos de defensa del huesped de varias maneras, una de ellas es alterando el sistema inmune del huesped. En el caso que nos ocupa se ha demostrado que los extractos de A. amibiano de las cepas HK-9, HM-1 y HM-2 contienen actividades mitogénico para linfocitos de bazo murinos y para linfocitos de sangre periferica de humanos. Este principio mitogénico, no es dealizable y se encuentra en la fracción no lipidica de los extractos (62, 63). Los extractos amibianos estimulan la proliferación de linfocitos T de bazo murinos y linfocitos T de sangre periferica de humanos, pero no inducen la proliferación de timocitos; debido probablemente a que la subpoblación reactiva al extracto de A. amibiano no esta presente en la población de timocitos.

Diamantstein también demuestra, que las células de bazo de ratones desnudos nu/nu responden a los extractos amibianos, aunque aún no se ha determinado si la respuesta de los linfocitos T y de células no T a los extractos amibianos es debida a diferentes principios mitogénicos presentes en las preparaciones crudas, o bien si diferentes subpoblaciones celulares responden a la misma entidad mitogénica. Estos trabajos demuestran que A. amibiano interactua con el sistema inmunitario, actuando principalmente, pero no exclusivamente sobre linfocitos T (62).

Se ha sugerido que la alteración observada de la respuesta inmunitaria mediada por células, en pacientes que sufren de amibiasis esta relacionada con la acción de la amiba sobre los linfocitos T (39). Lo anterior se deduce de estudios hechos con linfocitos de pacientes con absceso hepático amibiano y con linfocitos de personas sanas los cuales fueron probados por medio de transformación blastoide con antígenos específicos y con mitógenos (PHA), para valorar tanto la inmunidad mediada por células específica como no específica, se encontró que ambas están deprimidas en la fase aguda de la amibiasis invasiva (64).

Es posible que durante la enfermedad activa una población significativa de células T-Supresoras u otros factores intrínsecos o extrínsecos a los linfocitos sean responsables

de la supresión de la transformación blastoide no específica (65). Otros autores reportan que solo la inmunidad celular no específica se encuentra deprimida, ya que ellos observan una respuesta incrementada específica en la transformación blastoide en humanos inducida por el antígeno amibiano (65).

Diamantstein observa que la respuesta mitogénica inducida por los extractos amibianos manifiesta diferencias con la respuesta mitogénica a la Con A, la cual activa linfocitos T e induce indirectamente, factores solubles liberados de células T activadas, así como la diferenciación policlonal de linfocitos B a células plasmáticas (63). Por otro lado los extractos de S. amibiana, a diferencia de la Con A, induce solo la proliferación de células T y no tiene efecto sobre la diferenciación de células B. Además, las respuestas proliferativas de los linfocitos a los extractos amibianos y a la Con A difieren en su cinética y lo cual sugiere, que que en los linfocitos existan diferentes sitios de unión para los extractos y para la Con A, o bien que los extractos y la Con A actúan sobre diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Lo anterior se puso de manifiesto cuando Diamantstein y col incubaron -metil-manosa (que es un inhibidor competitivo de unión para la Con A), con los linfocitos de sangre periférica y el extracto amibiano; observaron que la respuesta proliferativa inducida por el extracto amibiano no se inhibía en presencia del inhibidor (63).

Aust Kettis y Sundqvist encontraron que los extractos solubles de S. parasitica de las cepas HK-9 y NIH-200 activan la síntesis del DNA en linfocitos sanguíneos de individuos sanos y en linfocitos de pacientes con infección amibiana. Encuentran también que después del fraccionamiento del extracto amibiano de la cepa NIH-200 através de una columna de Sephadex G-200, dos de las fracciones estimularon tanto a los linfocitos de individuos sanos, como a los linfocitos de individuos infectados con S. parasitica; mientras que otras dos fracciones activaron solo a los linfocitos de estos dos últimos. Lo cual sugiere que los extractos además de los factores mitogénicos, también contienen antígenos que estimulan la activación de los linfocitos previa sensibilización. Estos resultados indican que las propiedades antigénicas y mitogénicas del extracto son dissociables. Las diferentes fracciones fueron probadas para investigar su capacidad de unión a anticuerpos

mediante la técnica de doble inmunodifusión con suero anti-amiba; se encontró que, tanto las fracciones mitogénicas como las antigénicas presentaban capacidad de unión a los Acs específicos (40).

Salata y Ravdin estudiaron la actividad mitogénica de extractos solubles amibianos obtenidos de cuatro cepas de amibas axénicas (HM1-IMSS, H303-NIH, 200-NIH y la Laredo), las cuales habían mostrado diferentes grados de virulencia en sistemas in vitro e in vivo (51, 52). Estos investigadores encontraron que la actividad mitogénica de estas cepas amibianas se correlaciona con su grado de virulencia y con su actividad de lectina inhibible por Gal-NAC para células CHO. La actividad mitogénica observada para las preparaciones solubles de las cuatro cepas fue similar a su grado de virulencia: HM1-IMSS > H303-NIH = 200 - NIH > Laredo (46).

La actividad de lectina esta relacionada también con los eventos de adherencia e interacciones de la amiba con los neutrófilos del huésped (45). Estudios con "depleción" de células adherentes indican que los macrófagos son vitales para la promoción de la proliferación óptima de los linfocitos en respuesta a los extractos amibianos (63).

Diamanstein y col demostraron que una población rica de linfocitos T humanos, purificados por rosetas con eritrocitos de carnero, estos linfocitos T en presencia de extractos amibianos obtenidos de la cepa HK-9, respondieron más bajas que la observada con la población completa de células mononucleares de sangre de humanos (63).

Said Fernandez y López Revilla encontraron que los homogeneizados de trofozoítos de E. histolytica ejercen un efecto modulador sobre la síntesis del DNA en células CHO. El cual consiste, en estimular o inhibir dependiendo de la cepa y de las dosis de los extractos amibianos probados (66). Posteriormente Valadez-Salazar y Lopez-Revilla determinaron en que fracciones de las cepas amibianas reside el efecto modulador (las cepas amibianas que se probaron fueron la HM1-IMSS y la HM3-IMSS); encontrando que el extracto total y la fracción citoplásmica S-30 estimularon la síntesis de DNA, significativamente. Observaron además, que la potencia estimuladora se correlaciona con la virulencia de las cepas; la cepa HM1-IMSS fue 3000 veces más potente para ejercer su efecto estimulador, mientras que la cepa HM3-IMSS sólo fue siete veces más potente. Al comparar

el extracto total con la fracción S-30, encontrarón que ésta era más potente y contenía toda la actividad estimuladora. La actividad de esta fracción se incrementó con el calentamiento a 90 C, indicando que es un factor termoestable. Los autores sugieren que sería de interés establecer si el efecto estimulador, pudiera estar relacionado con la activación policlonal de los linfocitos y con la virulencia amibiana (67).

Se ha demostrado que los extractos amibianos de clones deficientes en virulencia de la cepa HM1-IMSS presentan una menor actividad mitogénica sobre linfocitos humanos, así como una menor actividad de lectina inhibible por Gal-NAc en comparación con la cepa HM1-IMSS. Estos resultados, utilizando mutantes deficientes en virulencia de E. histolytica, aportan evidencia de que la actividad de lectina "inhibible" por N-acetil-D-galactosamina participa en la agresividad de este parásito (68).

Estudios previos, con clones de E. histolytica deficientes en adhesión, mostraron ser deficientes tanto en actividad fagocítica como en actividad citopática tanto in vivo como in vitro (30,69).

Se ha observado que las personas que se recuperan del absceso hepático amibiano, raramente vuelven a sufrir de una amibiasis invasiva; en los sueros obtenidos de estas personas en estado convalescientes se demostraron Acs dirigidos contra las lectinas amibianas (61, 70). El bloqueo de la actividad de esta lectina por anticuerpos es relevante ya que puede tener un importante papel en la resistencia del huésped. La resistencia a la amibiasis invasiva esta asociada con el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular efectiva que consta de una proliferación linfocítica específica al Ag, producción de linfocinas y actividad de células T citotóxicas (29, 71).

F. INMUNIDAD CELULAR INTESTINAL.

Ha sido bien establecido en muchas especies animales, en el momento del nacimiento, que están virtualmente desprovistos de células plasmáticas en el intestino, y son rápidamente colonizados después del nacimiento seguida de una exposición a antígenos ambientales, en el que aparecen células plasmáticas que sintetizan IgM y posteriormente células que producen IgA (72).

La mucosa gastrointestinal es la primera línea de defensa contra muchos microorganismos, tanto bacterianos como protozoarios, así como antígenos extraños. El sistema inmune de la mucosa intestinal, puede establecer una respuesta humoral y/o celular; en los ganglios linfáticos regionales la respuesta puede ser independiente de los órganos linfoides sistémicos (73).

No existe reporte de inducción de una respuesta inmune celular local en amibiasis intestinal; sin embargo, se encuentran linfocitos T en los tejidos linfoides asociados al intestino, tales como placas de Peyer, ganglios linfáticos, y distribuidos dentro de la mucosa del tracto gastrointestinal (74). La mayoría de las células T de las placas de Peyer están presentes en las áreas timo-dependientes bajo el epitelio y alrededor de las vénulas post-capilares. Con antisueros monoclonales, se ha demostrado que el 80 % de estos linfocitos expresan en su superficie la molécula CD8 característica de la subpoblación de linfocitos supresor-citotóxico. Las reacciones inmunes en el intestino, frecuentemente ocurren independientemente de la inmunidad sistémica, las bases de esto son desconocidas pero, puede ser en una distribución independiente de los linfocitos T intestinales y periféricos (75). Algunos experimentos llevados a cabo mediante irradiación local de placas de Peyer o GLMs, han confirmado que la vía de tránsito de las células T es a partir de las placas de Peyer, continúan por los GLMs y regresan por la circulación sistémica a sitios intraepiteliales en la mucosa del intestino. Por otra parte se han encontrado linfocitos T de origen periférico solamente en casos de una reacción inflamatoria, por ejemplo durante infecciones por nemátodos (76).

1. TIPO DE CELULAS PRESENTES EN TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A INTESTINO.

El tejido linfoide asociado a intestino en el humano consiste de las placas de Peyer, el apéndice y las amígdalas. Las placas de Peyer, descritas por primera vez por Peyer en 1677, son grupos de folículos linfoides subepiteliales que se encuentran a través del intestino delgado, pero que son más prominentes en el íleon distal. Owen y Jones demostraron en el humano, que el epitelio inmediatamente adyacente a la luz intestinal, que recubre las placas de Peyer, contiene un tipo especializado de células epiteliales, denominadas células M. Estos mismos autores han sugerido que las células M pueden transportar material antigénico desde la luz intestinal a las células linfoides subyacentes, o que pueden acoplarse los Ac IgA al componente secretorio transportándolo al interior de la luz (77, 78).

La distribución de las células T y B, en las placas de Peyer ha sido examinada en animales mediante estudios de migración de poblaciones marcadas de células T o B. El rápido crecimiento de las placas de Peyer después del nacimiento, es debido a la proliferación de las células B en los centros germinales.

Así las células B son las principales responsables de la inmunidad humoral en el tracto gastrointestinal de mamíferos, siendo la IgA secretora el Ac fundamental en las infecciones gastrointestinales. Los Ac específicos de IgA secretora han sido detectadas en las secreciones del intestino para un amplio intervalo de infecciones virales, bacterianas y de protozoarios. Muchas bacterias gram negativas contienen lipopolisacáridos, que además de sus propiedades antigénicas, han mostrado en algunas especies, como el borrego, hombre, ratón, etc., tener un efecto mitogénico sobre linfocitos B. Esta respuesta específica a LPS puede involucrar a todas las clases de inmunoglobulinas. Una gran parte de la IgA es fabricada en las secreciones intestinales y sintetizada localmente por abundantes células plasmáticas de la lámina propia. El desarrollo para establecer una inmunidad local protectora en el intestino requiere conocer el origen de estas células plasmáticas y el lugar de donde provienen sus precursores.

Se ha determinado un elevado nivel de Ac contra patógenos entéricos en secreciones mucosales, en leche, saliva y lágrimas; teniendo este hallazgo una dirección en el descubrimiento de las células a partir del tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y que estas células son capaces de migrar preferencialmente dentro de una variedad de sitios a tejidos mucosales (74).

Las placas de Peyer contienen una población de linfocitos B especialmente rica en precursores para células plasmáticas de IgA y en células que pueden repoblar la lámina propia del intestino con células plasmáticas de IgA.

2. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A INTESTINO.

Los órganos linfoides del cuerpo se dividen en: a) Centrales (Primarios) en los que se desarrollan las células primordio en linfocitos; y b) Periféricos (Secundarios) con células inmunocompetentes (78).

El GALT pertenece al tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y está representado por las placas de Peyer (PP), linfocitos diseminados a lo largo de la mucosa intestinal y por GLMs (80).

Existe evidencias importantes de que los tejidos agregados en el intestino y las células linfoides en la mucosa intestinal tiene un papel protector fundamental contra los antígenos ingeridos, mediante la producción de IgA y por una respuesta mediada por células (78).

A pesar de que el tejido linfoide asociado al intestino presenta una gran parte del tejido linfoide total del organismo, poco se se sabe acerca del papel que juegan las células T en este sitio, ya sea en la respuesta inmune sistémica o local en el humano. Se han realizado estudios para definir el fenotipo y función de las células T presentes en los sitios mucosales de primates no humanos, tomando el hecho de que los antígenos de las células T están altamente conservadas en las diferentes especies de primates y que los Ac específicos para los Ags de las células T humanas pueden usarse para definir las subpoblaciones de células T.

Los resultados de estos estudios indican que las células T de mucosas de primates normales no humanos difieren significativamente de las células T de sangre periférica y de bazo, ya que los linfocitos de mucosas contienen una elevada proporción de células que presentan el fenotipo Leu^{3+} , Leu^{8-} , el cual se asocia con la función ayudador/inductor. Se han estudiado poblaciones de linfocitos de GLMs y lámina propia y se ha encontrado que difiere en subpoblaciones. Los linfocitos de GLMs (representativos de las células del tejido organizado asociado al intestino) contiene un número significativo de células con el fenotipo supresor/inductor (Leu^{3+} , Leu^{8+}) mientras que las células de la lámina propia (representativas de los linfocitos presentes en el tejido difuso asociado al intestino) presentan un número bajo de células con este fenotipo. Los linfocitos con el fenotipo supresor Leu^{2+} , Leu^{15+} se encuentran en baja proporción en los ganglios mesentéricos, y en mayor cantidad en la lámina propia (81).

El hecho de que existan pocas células T con el fenotipo supresor/inductor en la lámina propia sugiere que la activación de las células supresoras seguida de la exposición al antígeno entérico probablemente no ocurre eficientemente en este sitio mucosal, sino que depende de la activación de las células T en sitios organizados, tales como las placas de Peyer y ganglios linfáticos; lo que sugiere que las células con el fenotipo supresor en la lámina propia se originan de los ganglios linfáticos mesentéricos, donde se activan por los antígenos o mitógenos en presencia de células supresoras/inductoras.

También se han encontrado linfocitos, tanto en la lámina propia, como en los ganglios linfáticos mesentéricos, particularmente en estos últimos, que tienen el fenotipo asociado con las células T citolíticas.

Estudios previos han mostrado que la subpoblación Leu^{2+} , puede dividirse en dos grupos exclusivos mutuamente cercanos que presenten, ya sea los fenotipos 9.3^{+} (Tp44) o Leu^{-15+} (CD11) y que las células Leu^{2+} , 9.3 contienen linfocitos T citolíticos. Además, se ha mostrado que las células precursoras citolíticas y las células efectoras tienen el fenotipo Leu^{2+} , Leu^{15-} .

El hecho de que, tanto los linfocitos Leu^{2+} , 9.3 y Leu^{15-} , estén presentes en la lámina propia y en los ganglios mesentéricos indica que algunos de los linfocitos Leu^{2+} normalmente presentes en los tejidos linfoides asociados al intestino de primates no humanos puede tener una función efectora citolítica (81).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La mucosa gastrointestinal proporciona la primera línea de defensa contra muchos microorganismos y antígenos extraños. El sistema inmune local existente dentro de la mucosa intestinal establece una respuesta humoral o mediada por células que puede ser independiente de la respuesta de los órganos linfoides sistémicos.

No se han efectuado estudios sobre la inmunología celular intestinal en amibiasis humana, la investigación del aparato linfoide gastrointestinal en el hombre ha estado confinado casi exclusivamente a estudios sobre inducción de anticuerpos secretores y a enumerar células linfoides de la mucosa. Muchas de estas investigaciones se han llevado a cabo en animales de experimentación (73, 82).

Los trabajos de Diamantstein y Salata demuestran una actividad mitogénica sobre linfocitos periféricos por extractos y fracciones amibianas de E. histolytica (46, 51, 52, 53). López-Revilla también ha demostrado síntesis de DNA en células epiteliales CHO mantenidas en cultivo utilizando fracciones subcelulares de amibas (67). Tomando en consideración lo anterior es probable que componentes subcelulares amibianos provoquen inespecíficamente la síntesis de DNA de los linfocitos de ganglios linfáticos intestinales alterando la respuesta inmunitaria local y sistémica.

Por las evidencias anteriores trataremos de identificar las fracciones subcelulares amibianas con menor actividad mitogénica, lo cual nos permitira utilizar esas fracciones en trabajos posteriores para evaluar la respuesta inmunitaria en contra de E. histolytica, utilizando el método de incorporación de Timidina-tritiada, para medir la transformación blastoide, en ganglios linfáticos mesentericos. Asimismo, este método hasta el momento no ha sido utilizado para valorar la respuesta inmunitaria celular a nivel de GLMs. Por lo que la estandarización del mismo permitirá que se utilice en un futuro para la evaluación de la respuesta inmunitaria celular para otros enteropatógenos

En base a lo anterior los objetivos del presente trabajo fué:

A. OBJETIVOS

1. Estandarización del método de incorporación de timidina tritiada en linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y bazo de ratones BALB/c.
2. Determinar si un filtrado ambiental, un extracto total y las fracciones nuclear, vesicular y posvesicular presentan actividad mitogénica en linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y de bazo, utilizando el micrométodo de incorporación de Timidina-Tritiada.
3. Comparar la respuesta mitogénica de linfocitos de GLMs y de Bazo.

III. MATERIAL Y METODOS.

A. ANIMALES.

Se utilizaron ratones (Mus musculus) hembras de 12 semanas de edad, de la cepa singénica BALB/c procedentes del bioterio del Centro Médico Nacional del IMSS; alimentados con Purina Chow ad libitum. Para cada prueba experimental se utilizaron 8 ratones, desde el establecimiento de las curvas dosis-respuesta a Con A hasta así como con las diferentes fracciones amibianas analizadas. Se utilizaron un total de 64 ratones en toda la parte experimental.

B. INJERTOS DE PIEL.

Para comprobar la singenicidad de la cepa se llevó a cabo el injerto de piel. El tipo de injerto que se realizó para verificar si la cepa de ratones era realmente singénica fué el isólogo; en el que el receptor recibió injertos de un donador de la misma especie, genéticamente idéntico.

Se utilizaron 8 animales como donadores y 8 animales como receptores, obtenidos del mismo bioterio. El donador de piel fué sacrificado por dislocación cervical. La insición se realizó sobre una circunferencia de 20 mm de la región dorsal a partir de la base de la piel rasurada. El injerto de piel se mantuvo en cajas de Petri con solución fisiológica estéril hasta el momento del implante.

El receptor del injerto fué anestesiado con Pentobarbital Sódico a una concentración de 6.3 % y a una dosis de 28 mg/Kg (0.02 ml/45 g de peso)

Los sitios de implante se rasuraron, fueron lavados y secados. Cada ratón se extendió sobre una superficie de

unisel en posición decubito-dorsal. Las suturas se realizaron con material absorbible (cat-gut. N. 000) sobre cuatro - puntos equidistantes. Los injertos se inspeccionaron diariamente hasta 15 días después de su realización. Por otro lado, a un grupo testigo, se les realizó implantes de su propia piel, en las mismas condiciones de el grupo anterior.

C. CEPA AMIBIANA.

Se utilizaron trofozoitos axénicos de Entamoeba histolytica de la cepa HM1-IMSS procedentes del Laboratorio de Inmunoquímica del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, cultivados en el medio TYI-S-33 de acuerdo a la técnica de Diamond y col (24).

Las amibas se cultivaron por un periodo de 72 h en botellas Falcon, 75 cm de superficie, con medio TYI-S-33, colocandolas posteriormente en baño de hielo-agua, con el objeto de despegar las amibas que estaban adheridas a la superficie del plástico. Las suspensiones amibianas se centrifugaron a 1 500 rpm durante 10 min a 4 ° C (Sorval RC-C) en tubos de plástico de 50 ml. Se eliminó el sobrenadante y las pastillas se lavaron 2 veces con PBS pH 7.2 a 4 ° C.

D. OBTENCION DE ANTIGENOS.

1. Obtención del filtrado amibiano (FA).

El paquete amibiano de más de 100 millones de trofozoitos fué resuspendido en PBS pH 7.2 y sonicado (Lab-Line Instruments Inc.) 3 veces a 60 amplitudes por 5 min con intervalos de 10 min sobre un baño de hielo. Después se centrifugó a 8000 rpm por 60 min (Sorval RC5C). Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar, el sobrenadante se esterilizó a través de filtros con membrana millipore de 0.22 micras (um). Se hicieron alícuotas y se almacenaron a - 70 ° C.

2. Obtención de extracto total (ET) y fracciones subcelulares (FN, P-15 y S-15).

Se cosecharon los trofozoitos por centrifugación, para posteriormente romperlos utilizando un homogenizador con 50 golpes (Elvehjen-Potter de Borosilicato con émbolo de teflón, Curtin) activado con un motor eléctrico a 1000 rpm; después de este tratamiento no se observaron trofozoitos enteros bajo el microscopio.

Un volumen de ET se centrifugó a 750 rpm por 15 min; el paquete se separó y se denominó fracción nuclear (FN) y el sobrenadante se centrifugó a 15 500 g por 15 min (Eppendorf); la pastilla (fracción vesicular, P-15), se resuspendió en un volumen conocido de Salina-HEPES y se separó el sobrenadante postvesicular (S-15) (Fig. 1) (67).

La obtención de las fracciones del Ag se llevó a 4° C. A cada fracción (FN, S-15 y P-15), así como al ET y al FA se les determinó proteínas por el método de Lowry (83). Las fracciones y el ET fueron valoradas, en su actividad mitogénica, el mismo día de la obtención.

E. OBTENCION DE LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS Y BAZO

Se utilizaron 8 ratones (hembras) BALB/c de 12 semanas de edad, por cada ensayo experimental de estimulación en Con A y las diferentes preparaciones amibianas. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les desinfectó el abdomen y se colocaron en un ambiente estéril. A continuación se cortó piel y las demás capas hasta llegar a mesenterio, se localizaron los ganglios linfáticos mesentéricos y bazo (Fig. 2), se extirparon y se colocaron en pequeñas cajas Petri, conteniendo RPMI-1640 a 4° C, libre de suero, las células se disgregaron mecánicamente con las estrias de la pinza de disección. Con una pipeta Pasteur se tomó suavemente la suspensión celular y se pasó a un vaso de precipitado de 10 ml en cuya entrada tenía una capa de tela de organza que sirvió como filtro para eliminar tejido graso y conectivo. La

suspensión celular así filtrada se pasó a un tubo de ensayo estéril (13 X 100) con tapón de rosca, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, eliminando el sobrenadante con una pipeta Pasteur. El paquete celular se lavó 3 veces con RPMI-1640 frío, libre de suero, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Las células se suspendieron en un Vol. de 4 ml con RPMI-1640 frío suplementado con 5 % de suero fetal de ternera, inactivado por 30 min a 56°C; y con B-Mercaptoetanol a una concentración de 5×10^{-5} M (84, 85, 86). Se tomó una alícuota de 50 ul con una punta estéril de cada una de las suspensiones de linfocitos y se colocó en una placa de microtitulación no estéril, se agregó 50 ul de azul tripán al 0.2 % en solución salina 0.85 % para obtener una dilución final de 1 : 2, se homogenizaron, se depositaron en un hemocitómetro, la lectura se llevó a cabo en un periodo no mayor a 3 min. La concentración celular fue de 200 000 células/ 100 ul.

F. TRANSFORMACION BLASTOIDE CON INCORPORACION DE TIMIDINA-TRITIADA (H-Tdr) (Micrométodo).

1. Estimulación de la proliferación de linfocitos con un mitogéno (Concanavalina A).

En placas de microcultivo, se colocaron linfocitos de cada raton sobre las 8 hileras verticales, depositando en cada pozo la concentración celular antes mencionada. Se adicionó, por triplicado, desde 1 ug hasta 100 ug de Con A en 100 ul de PBS pH 7.2. De la misma manera se hicieron cultivos sin estimular (testigos negativos) agregando solamente 100 ul de PBS. La incubación fue de 3 días y 18 h antes de finalizar el periodo de incubación, se agregó 1 uCi/10 ul de H-Tdr en RPMI-1640. Después del periodo de incubación, las células fueron cosechadas con PBS pH 7.2 en filtros de fibra de vidrio por medio de un cosechador (Bellco-Microharvester). Se hizo pasar por el filtro, ácido tricloacético al 5 y 10 % y metanol al 70 % (fig. 3) (88).

Se seco el filtro y se deposito en viales de plástico con tapón de rosca, Después se adicionaron 2 ml de líquido de centelleo. Las lecturas se obtuvieron en cuentas por minuto (CPM) (86, 87).

2. Curva dosis-respuesta del filtrado amibiano (FA) sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y bazo.

En dos placas de microtitulación estériles con tapa (NUNC) se depositaron en cada pozo de fondo en "U", 200,000 linfocitos de GLMs en 100 ul de RPMI-1640 suplementado con suero al 5 %. Se les adicionó, por triplicado, los siguientes ug de proteína del filtrado amibiano (FA): 1, 3, 5, 10, 25, 50 y 75 en 100 ul para un volumen final de 200 ul. Además se incluyó un grupo testigo al cual no se le adicionó Ag amibiano (FA). Las células se incubaron por 6 días a 37 ° C con una atmosfera controlada de 5 % de CO₂, 18 h antes de finalizar la incubación se agregó a cada pozo 1 uCi de ³H-TdR (Actividad específica de 6.7 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston Mass E. U. A.) (Fig. 4).

3. Transformación blastoide con incorporación de Timidina-Tritiada (Micrométodo) para las fracciones subcelulares.

A 200,000 células tanto de bazo como de GLMs en 100 ul de RPMI-1640 suplementado se agregaron: 5, 20, 50, 75 y 100 ug de proteína de FN. E1, P-15 y S-15 en 100 ul de Salino-HEPES. Cada dosis se llevó a cabo por triplicado para cada raton utilizado (24 determinaciones / dosis) y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Análisis de Varianza.

Puede definirse como una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varios componentes. Con cada uno de estos componentes está asociado una fuente específica de variación, de modo que en el análisis es posible averiguar la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total.

El análisis de varianza se usa con dos fines diferentes: 1) estimar y probar las hipótesis acerca de las varianza de poblaciones y 2) estimar y probar hipótesis acerca de medias de población. Cochran sugiere que los resultados del análisis de varianza se consideren como aproximados, en lugar de exactos (89, 90).

El análisis de varianza se aplicó tanto a el establecimiento de la metodología de incorporación de timidina (Con A), así como a las diferentes preparaciones amibianas.

La variable cuentas por minuto (CFM) se transformó por medio de la ecuación :

$$YT = \sqrt{Y} + \sqrt{Y + I} \quad \text{donde}$$

YT = Es la variable transformada

Y = Es la variable (CPM) (90).

El propósito de transformación de las CPM a la formula estadística fué normalizar esta variable y homogenizar las varianzas, que son dos suposiciones muy importantes para el método que se utilizó para analizar los datos: El objetivo principal de transformar nuestros datos fué que se observaba una distribución de Poisson, por lo que no se podía establecer un análisis de varianza.

Con la variable transformada se analizaron los distintos tratamientos con Con A utilizando un modelo completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + Z_i + E_{ij} \quad \text{donde}$$

Y_{ij} = Es la variable de respuesta CFM transformada.

μ = Es la media general.

Z_i = Es el efecto del i-ésimo nivel de Con A ($i=1, \dots, 9$)

ξ_{ij} = Es el error aleatorio $\xi_{ij} \sim N(0, \sigma^2_{\xi})$. Fue utilizado para el análisis de diferentes cantidades de Con A para establecer la prueba.

El siguiente modelo fué utilizado para analizar el FA, ET, P-15, S-15 y FN; en linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos y de bazo:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + P_{ij} + (LP)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la k-ésima observación de CFM transformada al aplicar el J-ésimo nivel de proteína al i-ésimo tipo de linfocito.

μ = Es la media general.

L_i = Es el efecto del i-ésimo tipo de linfocito ($i=1, \dots, 2$).

P_{ij} = Es el efecto del J-ésimo nivel de proteína ($j=1, 2, \dots, 6$).

$(LP)_{ij}$ = Es el resultado de la interacción entre los efectos principales.

ϵ_{ijk} = Es el error aleatorio dentro del modelo
 $\epsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma_{\epsilon}^2)$.

El coeficiente de determinación se expresó en términos generales diciendo que el coeficiente de determinación r^2 , es de +0.9919. Puesto 1.0 es la determinación perfecta y 0 (cero) indica la falta de determinación (90) (Determinación es la cantidad de varianza que explica el modelo).

RESULTADOS;

Curva dosis-respuesta Concanavalina A.

Para el establecimiento de la proliferación celular (linfocítica) con Con A, se utilizaron 8 ratones BALB/c. obtenidos del Bioterio del Centro Medico Nacional del IMSS. Las condiciones del método de incorporación de Timidina-Tritiada fueron las siguientes; se utilizaron 200 000 células/100 ul de medio RPMI-1640 suplementado con 5 % de suero fetal de ternera. Se realizó una curva de dosis-respuesta al mitogéno (Con A) de 1 ug a 150 ug. La viabilidad de las células se determinó por medio de azul tripano, el porcentaje de viabilidad con el que se trabajo fue siempre mayor al 92 %, tanto en la curva dosis-respuesta de la Con A, como en las fracciones amibianas que se valorarán. El tiempo de incubación, fué de 3 dias para el mitogéno (Con A), y para las fraciones amibianas fué de 6 dias de acuerdo a lo reportado (40, 46), se realizó en estufa con atmosfera controlada de CO₂ al 5 %. La adición de timidina-tritiada (³H-Tdr) fue 18 h antes de finalizar el periodo de incubación, colocando 1 uCi/10 ul de medio sin suplementar, con una actividad especifica de 6.7 Ci/mmol.

El establecimiento de la metodología se realizó tanto en linfocitos de ganglios linfaticos mesentericos como de bazo de ratones. En la gráfica I se muestra el comportamiento de linfocitos de GLMs de 8 ratones, gráficos en forma individual, la proliferación linfocítica se expresó en cuentas por minuto (CPM), la finalidad en graficar en forma individual cada raton, fue el observar las desviaciones estandar tan grandes que existian, cuando se graficaban los 8 animales en una curva (Promedio con su desviación estandar). En la gráfica II se presenta la respuesta de los linfocitos de bazo de los mismos ratones anteriormente evaluados. Se observó que la transformación blastoide fué muy variable de un ratón a otro. Al observar una respuesta heterogénea, se creyo necesario verificar la singenicidad de la cepa, con la que se trabajo, esto se llevo a cabo por transplante de piel de un grupo de 8 ratones.

De los resultados obtenidos en estos injertos, el rechazo se establecio a los dia convencionales , entre los 5 y 7 dias, después del implante de la piel, datos que se

relacionaron con la gran variabilidad de las CPM de la transformación blastoide (gráfica I y II), demostrando que los animales con que se trabajaron eran ratones de laboratorio concanavalina, que no conservaban las características de una verdadera cepa singénica.

Se establecieron las condiciones óptimas del micrométodo de transformación blastoide con incorporación de timidina-tritiada ($^3\text{H-Tdr}$) para linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y de bazo con el objeto de valorar el posible efecto mitogénico que pudieran presentar las diferentes fracciones subcelulares de Staphylococcus histolytica (S. histolytica) probadas utilizando como testigo positivo de la proliferación linfocitaria a la concanavalina A (Con A); para la cual se determinó la curva de dosis-respuesta a este mitogéno tanto en linfocitos de GLMs como de bazo.

Tanto el establecimiento de la metodología con Con A como la valoración de las fracciones ambientales se sometieron a un análisis de varianza con la variable CPM transformadas. Es pertinente explicar que los resultados obtenidos CPM directas, fue necesario expresarlas como CPM transformadas por medio de la ecuación, descrita en material y métodos.

El propósito de esta transformación fue normalizar la variable y homogenizar las varianzas, debido a que nuestros datos presentaban una distribución de tipo Poisson (90).

EFFECTO MITOGENICO DE LA CONCAVALINA A EN LINFOCITOS DE BAZO.

La proliferación de linfocitos de bazo a la exposición de Con A se encontró que era altamente significativa en relación al testigo (sin mitogéno) ($P < 0.01$) y con un coeficiente de determinación de $r = 0.823$ (Cuadro I), indicándonos que el 82.3 % de las variaciones son explicadas, aplicando este modelo. Con cantidades de 1, 3 y 5 μg del mitogéno, se observó la mayor respuesta en la transformación blastoide, siendo significativamente diferente a la del testigo (sin mitogéno) ($P < 0.05$) ver Cuadro II u Gráfica III respectivamente. Con dosis mayores a 5 μg de Con A se observó que las respuesta de proliferación linfocitaria disminuyó hasta ser similar a la del testigo.

EFFECTO MITOGENICO DE LA CONCAVALINA A EN LINFOCITOS DE GANGLIOS LINFATICOS MESENTERICOS (GLMs) Y SU COMPARACION CON LINFOCITOS DE BAZO.

Para comparar los resultados del promedio de CPM transformadas entre linfocitos de GLMs y de bazo, el experimento antes mencionado se repitió con otros 8 animales, con objeto de determinar el efecto mitogénico de diferentes cantidades de Con A con los linfocitos aislados de cada uno de los órganos linfoides en estudio. Los resultados obtenidos, se sometieron análisis de varianza, el cual mostró que no existían diferencias significativas entre los linfocitos de GLMs y los de bazo ($P > 0.05$) (Cuadro III). El análisis de varianza de las CPM transformadas obtenidas con las diferentes cantidades del mitógeno y la interacción de linfocitos fue altamente significativo ($P < 0.01$) para los linfocitos de GLMs y de bazo.

En el cuadro IV, Gráfica IV respectivamente se observa que para linfocitos de GLMs las cantidades de 5 y 10 ug de Con A dieron las CPM transformadas más altas (Línea discontinua); en el caso de linfocitos de bazo la máxima estimulación fue de 3 ug, muy similar a los experimentos anteriores, (Gráfica III), los linfocitos de bazo se estimularon con cantidades más bajas de Con A (Línea continua). Las cantidades de máxima estimulación para linfocitos de GLMs y de bazo fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD MITOGENICA DE PROTEINAS AMIBIANAS

POR TRANSFORMACION BLASTOIDE.

1. RESULTADOS DEL EFECTO DE UN FILTRADO AMIBIANO SOBRE LINFOCITOS DE GLMs DE RATONES BALB/c.

Se probaron diferentes concentraciones de un filtrado amibiano en linfocitos de GLMs; los datos obtenidos en este experimento se sometieron a un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en el cuadro V, donde se puede observar que el efecto del filtrado amibiano (FA), sobre linfocitos fue altamente significativo ($P < 0.01$) y con un coeficiente de determinación alto de $r^2 = 0.985$.

Se observó que el filtrado amibiano estimula la proliferación de linfocitos de GLMs; los datos obtenidos en este experimento se sometieron a un análisis de varianza. Se observó que el filtrado amibiano estimula la proliferación de linfocitos de GLMs con dosis relativamente bajas. La máxima estimulación observada se alcanzó con una concentración de 10 ug de proteína del FA ($P < 0.05$); con dosis superiores a la antes mencionada, el efecto estimulador fué inversamente proporcional al incremento de la dosis hasta tener valores comparables con el grupo testigo (sin FA) (Cuadro VI, Gráfica V).

2. EFECTO DE UN EXTRACTO TOTAL AMIBIANO EN LINFOCITOS DE GLMs Y DE BAZO.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos de las CPM transformadas, sobre el efecto de diferentes concentraciones del extracto total (ET) sobre linfocitos de GLMs y bazo fué significativo ($P < 0.01$). La interacción linfocitos de GLMs y de bazo / concentración de proteína de ET también fué significativo como se observa en el Cuadro VII ($P < 0.01$).

En el Cuadro VIII y Gráfica VI se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de ET sobre los linfocitos de GLMs y bazo, se observa que únicamente la concentración de 100 μ g de proteína dió un efecto estimulatorio de la proliferación linfocitaria, tanto en linfocitos de GLMs como de bazo. Todas las demás concentraciones probadas dieron CPM muy similares a los grupo testigo (sin ET).

3. EFECTO DE LA FRACCION P-15 DE Entamoeba histolytica EN LINFOCITOS DE GLMs Y DE BAZO.

La fracción P-15 de E. histolytica se obtuvo por centrifugación diferencial a partir de un extracto total de trofozoitos de la cepa HM1-IMSS como se describió en material y métodos y fue probada con linfocitos de bazo y GLMs; el análisis de varianza de los datos obtenidos con diferentes concentraciones de la fracción P-15 sobre los linfocitos, indica que hubo un efecto mitogénico altamente significativo ($P < 0.01$) con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.97$. La interacción linfocitos de GLMs y bazo / concentración de proteína no fue significativa (Cuadro IX) ($P > 0.05$).

En el Cuadro X,, Gráfica VII se muestran los resultados de las medias aritméticas de la variable CFM transformadas, tanto de linfocitos de GLMs como de bazo, obtenidas con las diferentes concentraciones de la fracción P-15. El nivel más alto de proliferación linfocitaria se obtuvo con una concentración de 50 ug de proteína de la fracción, tanto en linfocitos de GLMs como de bazo, lo cual fue significativo - ($P < 0.01$), con dosis más bajas o más altas de 50 ug, la estimulación linfocítica fue mucho menor tanto en GLMs como bazo.

4. EFECTO DE LA FRACCION S-15 DE Entamoeba histolytica EN LINFOCITOS DE GLMs Y DE BAZO.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos sobre el efecto de diferentes concentraciones de la fracción S-15 en linfocitos de GLMs y de bazo fue significativo ($P < 0.01$); pero con un coeficiente de determinación bajo de $r^2 = 0.516$. El análisis de la interacción linfocitos de GLMs y bazo / concentración de la fracción S - 15 no mostró diferencias significativas (Cuadro XI).

Al no mostrar diferencias significativas entre linfocitos de GLMs y bazo/ concentración de la fracción S -15, el análisis de varianza de las diferentes concentraciones de la fracción S-15 en GLMs y bazo se pudieron representar indistintamente, pero para observarlos por separado se representaron en forma independiente como lo muestra el Cuadro XII y su Gráfica VIII. Las medias aritméticas fueron transformadas, obtenidas con las diferentes concentraciones de la fracción S-15, fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$); no hubo un efecto evidente en las diferentes concentraciones de proteína, el comportamiento de la curva en esta fracción fue muy similar entre GLMs y bazo, así también por otro lado el grupo testigo (sin antígeno S-15) comparado con el resto de los grupos no mostró diferencias como se ve más claramente en la Gráfica VIII, demostrándonos una nula actividad mitogénica obtenida en esta fracción amibiana (Ver Cuadro XV, resumen de datos).

5. EFECTO DE LA FRACCION NUCLEAR (FN) DE Entamoeba histolytica EN LINFOCITOS DE GLMs Y DE BAZO.

El análisis de varianza de los resultados, sobre el efecto de diferentes concentraciones de la fracción nuclear (FN) de E. histolytica en linfocitos de GLMs y bazo, indicó diferencias significativas ($P < 0.01$), con un coeficiente de determinación alto de $r^2 = 0.96$. La interacción linfocitos de GLMs y de bazo / concentración de proteína de la FN, también fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Cuadro XIII).

En el Cuadro XIV y Gráfica IX se observa el efecto de la fracción nuclear sobre linfocitos de GLMs y bazo. Las diferentes concentraciones de la fracción nuclear tuvieron un efecto estimulador de la proliferación linfocítica tanto en linfocitos de bazo como de GLMs pero, la máxima estimulación se alcanzó con una concentración de 75 ug de proteína de la FN en el caso de linfocitos obtenidos de GLMs y para los linfocitos de bazo, ésta se alcanzó con 50 ug. Se observa que una concentración de 5 ug de FN se obtuvo una respuesta estimuladora alta, en relación al grupo testigo (sin FN). El comportamiento de proliferación linfocítica fue muy similar en GLMs y bazo a las dosis probadas como se ve en la Gráfica IX.

En el Cuadro XV se muestra de una manera resumida, la acción de las diferentes fracciones amebianas, así como un grupo testigo realizado con Con A. La manera de expresar este Cuadro fue determinando los índices de estimulación que se determino por medio de las CPM no transformadas de cultivos estimulados entre CPM no transformadas de cultivos sin estimular.

DISCUSION.

La amibiasis es un padecimiento que se inicia por invasión de la mucosa del intestino grueso, por lo que se hace importante resaltar los mecanismos de resistencia inespecíficos como flora bacteriana, mucopolisacáridos, movimiento peristáltico, así como los mecanismos de resistencia específicos mediados por inmunidad humoral y celular, los cuales pueden presentarse como respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Recientemente se ha demostrado la aparición de anticuerpos de isotipo IgA contra amibas en heces y en calostro humano lo que refuerza la importancia de la respuesta inmunitaria local. Sin embargo a pesar de la demostración de linfocitos T en intestino no se ha investigado la inducción de inmunidad celular local en contra de este parásito. También es importante resaltar las dificultades para evaluar dicha respuesta inmunitaria en pacientes y solo es posible investigar en animales de laboratorio. En el presente trabajo se utilizaron linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones, para identificar a las fracciones amibianas que permitan evaluar la respuesta inmunitaria local y sistémica posterior a un esquema de inmunización. Sin embargo fue necesario investigar si las diferentes preparaciones amibianas seleccionadas tenían actividad mitogénica sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos como las reportadas por el grupo de Diamsteins sobre linfocitos de sangre periférica de humanos.

El método de Transformación Blastóide se seleccionó por ser una de las técnicas más utilizadas para valorar dichos efectos mitogénicos sobre linfocitos en general.

Cuando se compararon los ratones utilizados en este trabajo y se graficaron en forma individual (gráficas I y II) en condiciones similares, en la curva de dosis-respuesta al mitógeno (Con A) se observó una gran variabilidad de la respuesta a la Con A. También los resultados de injerto de piel que se realizaron para corroborar la singenicidad de la cepa del ratón BALB/c, mostraron que la cepa de ratón no era singénica.

Tomando en consideración que no se utilizó una cepa singénica, se establecieron procedimientos estadísticos para normalizar estos resultados en los linfocitos estudiados.

En la gráfica IV se ve que hay diferencias aparentes entre linfocitos de bazo y GLMs, sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas (Cuadro III). Lo cual nos permitió utilizar a la Con A como un parámetro de la funcionalidad de la prueba de Transformación Blastoide en linfocitos de GLMs y bazo.

La valoración del Filtrado Amibiano (FA) en GLMs, demuestra que este FA presenta también una actividad mitogénica sobre los linfocitos asociados a intestino. Estos resultados se corroboraron por otros grupos de investigadores, que probaron la actividad en linfocitos de sangre periférica de humanos (63), y nosotros lo comprobamos en linfocitos GLMs de ratón, ya que es una aproximación más real a los procesos naturales de la infección amibiana - (Gráfica V).

El extracto total (ET) amibiano presentó actividad mitogénica a una sola concentración, que fue de 100 ug/100 ul. Requiriendo de una cantidad mayor de ug de proteína de este extracto para la estimulación linfocitaria, aunque a esta dosis fue más mitogénica que el resto de las fracciones amibianas.

Estudios previos han mostrado actividad mitogénica de preparaciones proteicas solubles amibianas de cepas virulentas sobre linfocitos de bazo de ratones y de sangre periférica de humanos. Estas preparaciones solubles amibianas se han obtenido de diferentes maneras; entre estas, se encuentran desde fracciones lisosomales, extractos totales, fracciones amibianas pasadas por filtro de 0.22 um (46, 49).

Así también se encuentran extractos deslipidizados, los cuales se ha determinado que el principio mitogénico reside en la fracción no lipídica. Se ha reportado que la actividad mitogénica actúa predominantemente sobre linfocitos T y no se han encontrado proliferación de linfocitos B (62).

En este trabajo se determinó que las preparaciones del extracto total amibiano, presentó un efecto mitogénico sobre linfocitos de GLMs y bazo (Gráfica VI), donde presumiblemente también sean linfocitos T (62).

Con el objeto de investigar si otras fracciones amibianas tenían actividad mitogénica, se probaron por separado las fracciones descritas por López-Revilla y col (67). Tratando de identificar la localización de las proteínas amibianas con actividad mitogénica.

Así la fracción P-15 se encontró que tiene actividad mitogénica para linfocitos de bazo y de GLMs, encontrándose esta actividad integrada a componentes de la membrana. También se observó que no hay diferencias entre linfocitos de GLMs y de bazo, sin embargo a la máxima estimulación si hubo diferencias significativa ($P < 0.01$), siendo más estimulados los linfocitos de bazo que los de GLMs.

La fracción S-15 no presento actividad mitogénica a las concentraciones probadas, siendo conveniente mencionar que en trabajos realizados por López-Revilla (67), esta fracción subcelular amibiana fue mitogénica utilizando otras células en el método de valoración de dicho efecto. Estas diferencias podrian deberse a que los receptores del modelo utilizado (células epiteliales de ovario de hamster) muestran variaciones a nivel de sus receptores con respecto a los linfocitos tanto de GLMs como de bazo.

El efecto de la fracción denominada nuclear (FN) la cual esta constituida de membranas plásmaticas crudas (8), se valoro en linfocitos de GLMs y de bazo de ratones, encontrado un efecto mitogénico en ambas poblaciones. No se observaron diferencias significaticas ($P > 0.05$), lo cual difiere con lo reportado por López-Revilla acerca de esta fracción, que no tiene efecto significativo sobre la sintesis de DNA sobre células epiteliales de ovario de hamster. Lo cual demostro que en las membranas internas crudas también presentan actividad mitogénica.

Los resultados demuestran que las proteínas amibianas con actividad mitogénicas están distribuidas en diferentes compartimientos de los trofozoitos. Recientemente nuestro grupo demostró que los linfocitos de GLMs de gerbos presentan un comportamiento similar al encontrado en linfocitos de ratones (en preparación).

Sería importante realizar experimentos con cepas singénicas de animales de laboratorio, para ampliar estos datos. Así mismo faltaría por definir el efecto mitogénico sobre subpoblaciones purificadas de linfocitos. Por otra parte se hace necesario obtener antígenos más definidos bioquímicamente para encontrar las moléculas involucradas en este fenómeno. También faltaría por demostrar si los efectos mitogénicos son relevantes durante una infección amibiana.

Comparando los diferentes antígenos amibianos a una concentración de 50 ug / 100 ul encontramos que la fracción P-15 tiene un mayor índice de estimulación que la FN. Con el extracto total se encontraron elevados índices de estimulación pero a la doble concentración de proteína. También es importante resaltar que el filtrado amibiano a las concentraciones de 10 ug provoca un índice de estimulación moderado. Falta por resolver si los diferentes antígenos amibianos que tienen actividad mitogénica concomitantemente presenta una actividad de tipo lectina.

Los resultados muestran que la respuesta mitogénica observada con proteínas amibianas son diferentes a otros mitógenos para linfocitos T. Las diferencias se refieren a las concentraciones óptimas de estimulación, tiempo de incubación y grado de proliferación linfocítica.

La metodología descrita en este modelo experimental nos permitiera estudiar a futuro próximo la respuesta inmunitaria celular local posterior a inmunizaciones con diferentes antígenos amibianos que no presenten actividad mitogénica, como la fracción S-15 que se demostró en este trabajo.

CONCLUSIONES.

1. Por su localización y por el número de linfocitos que se pueden obtener de los GLMs, podría ser una forma directa de valorar la inmunidad intestinal en modelos experimentales relacionado a infecciones intestinales.
2. El filtrado amibiano (FA) obtenido de Entamoeba histolytica cepa HMI-IMSS fue mitogénico para linfocitos de GLMs.
3. El extracto total (ET) y la fracción vesicular (F-15) y la fracción nuclear (FN) obtenidas de Entamoeba histolytica, presentaron actividad mitogénica para linfocitos de GLMs y bazo.
4. La fracción postvesicular (S-15), no presentó actividad mitogénica para linfocitos de GLMs y de bazo.
5. Para la FN y el ET si hubo diferencias entre linfocitos de GLMs y linfocitos de bazo.
6. No hubo diferencias sobre el efecto que tuvieron las fracciones F-15 y S-15 en linfocitos de GLMs y en linfocitos de bazo.
7. Es posible que el efecto mitogénico de Entamoeba histolytica, sea un mecanismo más de patogenicidad, al alterar la respuesta inmunitaria celular del tejido linfoide asociado al intestino.
8. Este trabajo permitirá utilizar a las proteínas con menor actividad mitogénica para evaluar la inmunidad celular.

VII. A P E N D I C E .

REACTIVOS.

1. Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2 estéril.

Cloruro de sodio		8.45	g
Fosfato dibásico de potasio		3.13	g
Fosfato monobásico de potasio		1.36	g
Agua destilada	cbp	1000	ml

Ajustar el pH antes de aforar. Distribuir en alícuotas. Esterilizar a 15 lbs por 15 min. Verificar esterilidad y almacenar a 4°C.

2. Solución salina isotónica (0.85 % p/v)

Cloruro de sodio		8.5	g
Agua destilada	cbp	1000	ml

3. Albúmina sérica bovina al 0.1 % (p/v).

ASB fracción V (Sigma)		10	mg
Solución salina isotónica	cbp	10	ml

4. Solución 1 (Lowry).

Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N.

5. Solución 2 (Lowry).

Sulfato de cobre pentahidratado al 1 %		1	parte
Tartrato de sodio y potasio al 2 %		1	parte

6. Solución 3 (Lowry).

Solución 1		50	partes
Solución 2		1	parte

7. Reactivo de fenol diluido.

Disponible comercialmente como reactivo de fenol de acuerdo a Folin-Ciocalteu. Es aproximadamente 2 N en á-

cido y se titula con NaOH y fenolftaleina como indicador para diluirlo a 1N para la prueba. La dilución es cercana a 1:2.

8. Solución de Lugol.

Solución saturada y filtrada de yodo en KI al 1 %.

9. Agarosa al 1 %.

Agarosa (Bioxon, Mex). 1.0 g

Solución salina isotónica cbb. 1000 ml.

10. Cloruro de Benzalconio al 1 %.

Mejor conocido como benzal, se encuentra disponible en el comercio.

11. RPMI-1640.

Para lavar células:

RPMI-1640 (GIBCO, EUA).	10.07 g
Bicarbonato de sodio (J. T. Baker, Mex).	2.0 g
HEPES; N-2-Hidroxietil piperacina-etano	
ácido sulfónico (Sigma, EUA).	2.08 g
Penicilina	100.0 U/ml
Estreptomicina	100.0 µg/ml
Agua destilada y desionizada	cbb 1000.0 ml

Para Medio de cultivo completo:

Lo anterior y	
Suero fetal de ternera (GIBCO, EUA)	5 %
2-Mercaptoetanol	5 x 10 ⁻⁶ M

Tanto el RPMI-1640 para lavado como para cultivo se esterilizaron por filtración. Se distribuyeron en alícuatas en frascos estériles con tapa. Se verificó la esterilidad y se almacena a - 20° C.

12. Azul tripán al 0.2 5 (p/v)
- | | | | |
|---------------------------|-----|-----|----|
| Azul tripán | | 0.2 | g |
| Solución salina isotónica | cbp | 100 | ml |
13. Concanavalina A (Con A).
- Tipo IV-S (SIGMA)
 Peso neto 5 mg
 Almacenar en vial por abajo de 0 C. Ya hidratado se
 almacena en alícuatas a - 20 C.
14. Timidina Tritiada (³H- Tdr).
- NET-027 THYMIDINE, (METHYL- H)
 New England Nuclear
 Actividad Específica 6.7 Ci/mmol
 Concentración 1.0 mCi/ml
 Hecha la dilución almacenar a 4° C.
15. Acido tricloroacético al 5 % (p/v).
- | | | | |
|-----------------------|-----|-----|----|
| Acido tricloroacético | | 5.0 | g |
| Agua destilada | cbp | 100 | ml |
16. Acido tricloroacético al 10 % (p/v)
- | | | | |
|-----------------------|-----|-------|----|
| Acido tricloroacético | | 10.0 | g |
| Agua destilada | cbp | 100.0 | ml |
17. Metanol al 70 % (v/v).
- | | | | |
|----------------|--|----|----|
| Metanol | | 70 | ml |
| Agua destilada | | 30 | ml |
18. Líquido de Centelleo.
- POPOP: p-bis(2-(5-feniloxazolil))benceno 0.1 g
 (BECKMAN)
 PPO: 2,5-difeniloxazol (BECKMAN). 5.0 g
 Tolueno cbp 1000.0 ml

BIBLIOGRAFIA:

1. Gutierrez G. (1986). Epidemiología y control de la amebiasis en México. Arch. Invest. Méd (Méx). 17 (Supl.):375.
2. Trissi D., Martínez-Falomo A., De la Torre M., De la Hoz R., Pérez de Suarez E. (1978). Surface properties of *Entamoeba*; increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med., 148: 1137-1145.
3. Trissi D. (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in Human and Animal Hosts. Rev. Infect Dis. 4: 1154-1164.
4. The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologist. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27: 37-58.
5. Ravdin, J.I and Guerrant R.L. (1982). A Review of the Parasite Cellular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4: 1185-1207.
6. Martínez-Falomo A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press/John Wiley. Chichester/1. 1st. Cell biology. Chapter 2:5-56.
7. Sepúlveda B. (1982). Amebiasis: Host-Pathogen Biology. Rev. Infect. Dis. 4: 1217-1237.
8. Aley. B. S., Scott A. W. and Conn. A. J. (1980). Plasma Membrane of *Entamoeba histolytica*. J. E. P. Med. 132: 391-404.
9. Martínez-Falomo A. (1985). Biology of *Entamoeba histolytica*. Chapter 2. In : Martínez-Falomo A., Human Parasitic Disease, Vol. 2, Amebiasis. Elsevier. Amsterdam. 1st. Edition. 11-43.
10. Bretscher. M. S. (1988). Movimiento de las células animales. Inv. Cien. 17: 64-71.
11. Ravdin I.J. (1985). Pathogenesis of Disease Caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of Adherence, Secreted Toxins, and Contact-Dependent Cytolysis. Rev. Infect. Dis. 7:247-260.

12. Pinto da Silva F., Martínez-Palomo A., and Gonzalez-Robles A. (1975). Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface; Cap formation and microexudate. J. Cell Biol. 64: 538-550.
13. Martínez-Palomo A., González-Robles A. and de la Torre M. (1973). Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced by concanavalin A. Nature New Biology. 245: 186-187.
14. Aust-Kettis A., and Sundqvist K.G. (1978). Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response. I. Capping and Endocytosis; Influence of Inhibiting and Accelerating Factors; Variation of the Expression of Surface Antigens. Scand. J. Immunolo. 7:35-44.
15. Proctor E. M. (1976). Ultrastructure of trophozoites de Entamoeba histolytica from human amoebic liver abscess. Trans. Roy Soc. Trop. Med and Hyg. 70: 256-257.
16. Lushbaug W.B. and Miller J.H. (1974). Fine structural topochemistry of Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 66:421-433.
17. Bruce A., Bray D., Lewis J., Raff M., Keith R., Watson D. (1986). Biología Molecular de la Célula. Cap. :269-302. Ed. Omega. Barcelona España.
18. Feria-Velasco A., Martínez-Zedillo G., Treviño-García Manzo N., and Gutiérrez-Pastrana M.D. (1973). Investigación del ácido siálico en la cubierta exterior de trofozoitos de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) 4, Suppl. 1: 33-38.
19. Trissi D., Martínez-Palomo A., Arguello C., de la Torre M. and de la Hoz R. (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. J. Exp.Med. 145:652-665.
20. Aust-Kettis A. and Sundqvist K. G. (1978). Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response III. Fate of antibodies after binding to the cell surface. Scand. J. Immun. 13:473-481.

21. Calderon J., Muñoz M. L. and Acosta H. M. (1980). Surface redistribution and release of antibody induce caps in Entamoebae. J. Exp. Med. 151:184-193.
22. Chaven A. and Avron B. (1985). Entamoeba histolytica, Antigens and Amoebiasis. Curr. Top. Micro Immun. 120: 19-41.
23. Gitler C. and Mirelman D. (1986). Factors contributing to the pathogenic behavior of Entamoeba histolytica. Ann. Rev Microbiol. 40:237-261.
24. Diamond L. S. (1961). Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Sci. 54: 1047-1056.
25. Bos H. J. (1976). Un hypothesis about the role of intestinal bacteria in the virulence of Entamoeba histolytica. In Proceeding of the International Conference on Amebiasis. (Edited by Sepulveda B. and Diamond L.), 551-557. IMSS. Mex.
26. Bracha R. and Mirelman D. (1984). Entamoeba histolytica trophozoites; effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. J. Exp. Med. 160: 354-369.
27. Diamond L. S. (1982). Amebiasis: Nutritional Implication. Rev. Infect Dis. 4: 853-850.
28. Jarumilinta R. and Kradolfer F. (1964). The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. Ann. Trop. Med. Parasit. 58: 357-381.
29. Salata A. R. and Ravdin I. J. (1986). Review of the human immune mechanisms against Entamoeba histolytica. Rev Infect. Dis. 8: 261-272.
30. Drozco E., Suárez M.E. and Sánchez T. (1985 b) Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica strain HM1;IMSS. Inter J. Parasit. 15: 665-660.
31. Hernández-López H. R. y Escobedo-Salinas A. (1970). Producción de absceso hepático amibiano en hamsters bajo diversas condiciones de experimentación. Arch. Invest. Med.(Méx) 1 (Supl.1): 121-124.

32. Tanimoto-Weki M., Vázquez-Saavedra J. A., Calderon P., y Aguirre-García J. (1973). Resultados de la inoculación de hamster de trofozoitos obtenidos de portadores asintomáticos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) 4 (Supl. 1) : 105-108.

33. Kobiler D. and Mirceliman D. (1980). A lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Arch. Invest. Méd. (Méx). 11 (Supl. 1) : 101-108.

34.- Mowat A., McI and Delphine Farrot M. V. (1983). Immunological responses to red protein antigens in mice. IV. Effects of stimulating the reticuloendothelial system on oral tolerance and intestinal immunity to ovalbumin. Immun. 50 ;547-554.

35. Ganguly N.K., Mahajan R. C., Sharman S., Chandanani. --- R.E., Sharma R.R., Mohan C (1979). Isolation of antigen fraction responsible for delayed hypersensitivity in amoebiasis. Indian J. Med. Res. 70: 17-21.

36. Weinberg E.D. (1984). Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. Rev. Infect. Dis. 6: 814-831.

37. Notcher E., Miranda M., García de Salgado V. (1970). Correlation of clinical, parasitological and serological data of individuals infected with Entamoeba histolytica. Gastroenter. 58: 388-391.

38. Ghadirian E., Meerovitch E., Hartman D.P. (1980). Protection against amebic liver abscess in hamsters by mean of immunization with amebic antigen and some of its fractions. Am. J. Trop. Hyg. 29: 779-784.

39. Ganguly N. K., Mahajan R. C., Gill N. J., Koshiy. (1981). Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amebic liver abscess. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 807-810.

40. Aust-Kettis A., Sundqvist K.G. (1982) Activation of lymphocytes from healthy donor and patients with amebiasis by extracts of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx). 13 (Supl. 3). 245-248.

41. Acosta G., Campos R., Barranco C., et al. (1983). Secretary Ig A antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of Entamoeba histolytica. Ann. N. Y. Acad. Sci. 409: 760-765.
42. Koster F. T., Tung K. S., Gilman R.H., Ahmed A., Rahaman M.M., Williams R. C. Jr. (1981). Circulating immune complexes in bacillary and amebic dysentery. J. Clin. Lab. Immunol. 5: 153-157.
43. Ghadirian E., Meerovitch E. (1982). Effect of complement depletion on hepatic amoebiasis in hamster. Clin. Immunol. 24: 315-319.
44. Ravdin J. I., Petri W. A., Murphy Ch. and Smith R. D. (1986). Production of those monoclonal antibodies which in vitro adherence in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 53: 1-5.
45. Salata A. R., Pearson R. D. and Ravdin J. I. (1985). The interaction of Entamoeba histolytica with human immune cells: Killing of virulent amebae by the activated macrophage. J. Clin. Invest. 76: 491-499.
46. Salata A. R., and Ravdin I.J. (1985). N-Acetyl-D-Galactosamine -inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. II. Mitogenic activity for human lymphocytes J. Infect Dis. 151: 816-822.
47. Rocha L. M., Reyes R. M., y Acosta G. et al. (1986). Interacción de macrófagos de calostro humanos con trofozoitos de Entamoeba histolytica. Ach. Invest. Méd. (Méx) ^{4 cols}
48. Ghadirian E. and Kongshavn P. A. L. (1984). Effect of silica on resistance of mice to Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 45: 399-402.
49. Savanat T., Viriyanond P. and Nimitmongkol N. (1973). Blast transformation of lymphocytes in amoebiasis. J. Trop. Med. and Hyg. 6: 705-710.

50. Chadee K. and Meerovitch E. (1984). The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 47-54.
51. Ravdin I. J., Murphy, E. Ch., Salata A. R., Guerrant, and Hewlett L. E. (1985). N-Acetyl-D- Galactosamine-inhibitable lectin of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J. Infect. Dis.* 151(5): 804-815.
52. Chadee K. and Meerovitch. E. (1985). Entamoeba histolytica: Early progressive pathology in the cecum of gerbil (*Meriones unguiculatu*). *Ame. J. Trop. Med. and Hyg.* 34: 283-291.
53. Orozco Ma. E., Palomo M. A., Robles G. A., Guarneros G., Galindo M. J. (1982). Las interacciones entre lectinas y receptores median la adherencia de Entamoeba histolytica a células epiteliales, relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 15 (Epi. 3): 159-167.
54. Kobiler D., Mirelman D., (1981). Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. *J. Infect. Dis.* 144: 539-546.
55. Ravdin J. I., Guerrant A. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cell and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 88: 1305-1313.
56. Mirelman D. (1987). Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* 51: 272-284.
57. Bracha R., Mirelman D. (1985). Adherence and ingestion of Escherichia coli serotype 055 by trophozoites of Entamoeba histolytica. *Infect. Immun.* 40: 882-887.
58. Arroyo R., and Orozco E. (1987). Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. *Mol. Bioch. Parasito.* 33 : 151-158.
59. Kobiler D., Mirelman D. (1980). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect. Immun.* 29: 221-225.

60. Rosales-Encina J., Meza I., López de León A., Talamas-Rohana P., and Rojkind M. (1987). Isolation of a 220-Kilodalton protein with lectin properties from a virulent of Entamoeba histolytica. J. Infect Dis. 156: 790-797.
61. Petri A. W. Jr., Joyce M. F., Broman J., Smith D. R., Murphy F. Ch., and Ravdin I. J. (1987). Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. Infect Immun. 55: 2327-2331.
62. Diamantstein T., Trissl D., Klos M., Gold D., and Hahn H. (1980). Mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for murine lymphocytes. Immunol. 41: 347-352.
63. Diamantstein T., Klos M., Gold D., and Hahn H. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. I. Mitogenicity of Entamoeba histolytica extracts for human peripheral T lymphocytes. J. Immunol. 126: 2084-2086.
64. Agarwal R. K and Sen C. P. (1982). Functional status of cell mediated immunity in amoebiasis. Indian J. Med. Res. 75: 227-232.
65. Simjee A. E., Gathiram V., Coovadia H. M., Jackson T. F. H. G., Kiepiela P. D. J. (1985). Cell-mediated immunity in hepatic amoebiasis. Trans R. Soc. Trop Med Hyg. 79: 165-168.
66. Said-Fernández S. and López-Revilla R. (1981). Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: Trophozoite homogenates modulate DNA synthesis in a mammalian cell line. Z. Parasitenkd. 65: 11-17.
67. Valadez-Salazar A. and López-Revilla R. (1986). Stimulation of DNA synthesis on animal cell microcultures by a heat-stable cytoplasmic factor of Entamoeba histolytica. Z. Parasitenkd. 72: 133-136.
68. Orozco E., Rodríguez M. A., Murphy F. Ch., Salata A. R., and Ravdin J. J. (1986). Actividad mitogénica y de lectina en mutantes de Entamoeba histolytica deficientes en virulencia. Arch. Invest. Méd. (Méx). 17 (supl.) 167-172.

69. Rodriguez M. A. and Drozco E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 154. 27-32.
70. Mathews H. M., Moss D. M., and Visvesvara G. S. (1986). Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 33: 328-334.
71. Salata R. A., Martinez-Palomo A., Murphy H. W., Conales L., Treviño N., Segovia E., Murphy C. F. and Ravdin J. I. (1986). Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against Entamoeba histolytica. J. Immunol. 136: 1-7.
72. Husband J. A. (1980). Role of gram negative bacteria in ontogeny of gut immunity. AJEBAK. 58 (3): 297-299.
73. Ferguson A. McI., Mowat and Strobel S. (1983). Abrogation of tolerance to fed antigen and induction of cell-mediated immunity in the gut associated lymphoreticular tissues. Ann. N. Y. Sci. 409: 489-496.
74. MacDermott P. R. (1986). Cell-immunity in gastrointestinal disease. Symposium on cell-mediated immunity in human disease. Part. II. Human Pathology. 17(3): 219-233.
75. Brandt H., Pérez T. (1970). Amibiiasis. La Prensa Médica Mexicana. (Méx). 1a. edición pp. 13.
76. Hay B. J., Hobbs B. B. (1977). The flows of blood to lymph nodes and its relation to lymphocyte traffic and the immune response. J. Exp. Med. 145: 31-44.
77. Allardyce R. A. and Bienenstock J. (1984). The mucosal immune system in health and disease, with an emphasis on parasitic infection. Bull. Wor. Heal. Organ. 62 (1): 7-25.
78. Wright R. (1978) Inmunología de la enfermedad del sistema digestivo y del hígado. Ed. Manual Moderno. Cap. I 1-24.

79. Sheldrake F. R. and Husband J. A. (1985). Immune differences at mucosal surfaces in ruminant. *J. Dairy Res.* 52: 599-613.
80. McConnel. (1982). Lymphocytes and lymphoid system . Chap. 4. In: Lachmann F. J. and Peter D. K. *Clinical aspects of immunology*. Vol. I . Blackell Sci. Publ. Oxford 4th. Ed. 72-100.
81. James F. S., Graeff S. A. and Zeitz M. (1987). Predominance of helper-Inducer T cell in mesenteric lymph nodes and intestinal lamina propia of normal nonhuman primates. *Cell. Immun.* 107: 372-383.
82. Mowat A. McE., and Ferguson A. (1982). Migration inhibition of lymph node lymphocytes as an in vitro assay for cell mediated immunity in the draining lymph nodes of paraenterally immunized mice. *Immun.* 47: 357-364.
83. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Rall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chemis.* 193: 265-275.
84. Haneberg B., Wesenberg F. and Aarskog A. (1978). Lymphocyte multiplication in vitro induced by mitogens and antigens. *Scand J. Immunol.* 8: 9-13.
85. Serke S., Seike M. and Grudler D. (1987). Lymphocytes activation by phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. *J. Immun. Meth.* 99; 167-172.
86. Weir D. M. (1978). *Hand book of experimental immunology. Cellular Immunology*. Vol. II. Blackwell Sci. Publi. London.
87. Hudson L. and Hay F. (1980). *Practical Immunology*. Black. Sci. Publi. Oxford. 2nd. Edi. Chap. II and V.
88. Nowell C. P. (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal leukocytes. *Can. Res.* 20: 462-466.
89. Naiman A., Rosenfeld R., Zirkel G. (1987). *Introducción a la Estadística*. 3ra. Edi. Ma. Gram Hill. México D. F. Cap XIV.
90. Snedecor G. W. y Cocharan W. G. (1971). *Métodos Estadísticos*. 1 Edic. en Español. 6ta en Ingles. Editorial Continental. México D. F.