

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

/
2ej

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

INDUCCION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR
PROVOCADA POR LA INOCULACION INTRACECAL DE
TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* EN GERBOS
(*Meriones unguiculatus*)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Biomédicas
(Area Inmunología)

MVZ. FERNANDO ALBA HURTADO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GUSTAVO ACOSTA ALTAMIRANO
FES-C ESM ENCB CONACYT

MEXICO, D. F. 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN

INDICE	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	27
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	52
APENDICE DE REACTIVOS	53
BIBLIOGRAFIA	56

RESUMEN

INDUCCION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR PROVOCADA POR LA INOCULACION INTRACECAL DE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica EN GERBOS (Meriones unguiculatus).

Existe poca información acerca del desarrollo de inmunidad celular por la presencia de Entamoeba histolytica a nivel intestinal, esta no ha sido estudiada adecuadamente por la dificultad de encontrar un modelo experimental adecuado de amebiasis intestinal. En el presente estudio, se utilizaron gerbos monóglicos (Meriones unguiculatus) los cuales son fáciles de infectar experimentalmente con el parásito.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune celular, tanto local como sistémica, que presentan grupos de gerbos inoculados intracécalmente con trofozoitos de E. histolytica.

Se utilizaron gerbos machos de 55 a 65 días de edad. La cepa de Entamoeba histolytica utilizada fue la HMI-IMSS cultivada en medio TYI-S-33, se utilizaron dos antígenos amebianos, un extracto total y una fracción membranosa (P-15).

Para evaluar la respuesta inmunitaria celular, se midió la cantidad de H³-timidina que incorporaron al incubarse por separado linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y bazo con diferentes cantidades de los dos antígenos amebianos.

En principio, se determinó la actividad mitogénica de la concanavalina A sobre linfocitos de Bazo y GLMs de gerbos normales. Se determinó la dosis óptima de estimulación en ambos tipos de células. También se encontró que al incubarse linfocitos de 14 gerbos normales con las fracciones amebianas, estas indujeron la activación inespecífica de ambos tipos de linfocitos.

En otro experimento, 28 gerbos fueron divididos en 4 grupos, el grupo 1 y 3 fueron inoculados con 5×10^5 trofozoitos de Entamoeba histolytica en el ciego. Los grupos 2 y 4 no fueron inoculados y se usaron como grupos control.

Los animales del grupo 1 y 2 fueron sacrificados 10 días después de la inoculación y sus linfocitos se incubaron con diferentes cantidades de las fracciones amebianas. Los grupos 3 y 4 fueron sacrificados 30 días después de la inoculación y sus linfocitos se incubaron de la misma manera.

La cantidad a la que incorporaron mayor cantidad de timidina todos los grupos fue $5 \mu\text{m}$ por pozo. La siguiente tabla muestra la cantidad de timidina (medidas por cuentas por minuto) incorporada por los linfocitos a la dosis máxima (media y desviación standard).

	LINFOCITOS			
	Ganglios linfáticos		Bazo	
	10 días	30 días	10 días	30 días
EXTRACTO TOTAL				
Testigo	13466-3290	14659-3292	12469-3300	12221-2143
Problema	21481-3750	33752-5300	19018-4264	21312-5042
EXTRACTO MEMBRANAL				
Testigo	16373-2447	19504-2240	11726-3101	14130-2085
Problema	27488-3016	39970-5371	15378-2606	26851-4190

Con los dos antígenos y para ambos tipos de linfocitos, los grupos experimentales presentaron una respuesta mayor estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) que los grupos testigo. La respuesta fue estadísticamente ($\alpha = 0.05$) mayor en linfocitos de GLMs que en los de bazo, así mismo, fue mayor para el antígeno membranar que para el antígeno total.

A pesar que los linfocitos de bazo respondieron con menor intensidad que los linfocitos de GLMs. de los mismos animales infectados, estos respondieron cualitativamente en un nivel mayor que los linfocitos de bazo de los animales no infectados en los dos tipos de antígeno, lo que sugirió que la inoculación de trofozoítos no solo induce una respuesta celular local contra E. histolytica sino también una respuesta celular sistémica. Por esto, se trató de demostrar hipersensibilidad retardada cutánea por medio de intradermorreacciones. Para medir hipersensibilidad retardada, se utilizaron 4 grupos de 10 animales, en todos la inoculación fue intradérmica con 10 μg de proteína de un antígeno membranar. El grupo 1 fueron animales no infectados y retados con proteína ambiana. Los animales del grupo 2 fueron animales con 30 días de infección ambiana y retados con albúmina sérica bovina. El grupo 3 fueron animales con 10 días de infección y retados con proteína ambiana, por último, los animales del grupo 4 tenían 30 días de infección y fueron retados con proteína ambiana. Se midió el porcentaje de incremento a los animales después de 24 horas del reto. Se encontró un % de incremento en el grupo 1 de 69.4; grupo 2 de 46.2; grupo 3 de 116.3 y grupo 4 de 173.1. Lo anterior demuestra que se monta una respuesta inmune celular de tipo sistémico.

INTRODUCCION A LA AMIBIASIS

Definición de amibiasis

La Organización Mundial de la Salud en 1969, definió esta enfermedad como la situación en la que se porta el parásito Entamoeba histolytica, con o sin manifestaciones clínicas ellas. La amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal, y cuando se vuelve extraintestinal generalmente afecta el hígado .

De acuerdo con su sintomatología, la amibiasis intestinal puede producir una amplia variedad de alteraciones anatómicas, las correspondientes a cuadros clínicos bien definidos, que se conocen como: colitis ulcerativa amibiana, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano, y apendicitis amibiana. En cambio, la amibiasis hepática se caracteriza por la presencia de una o más áreas grandes de necrosis o abscesos. Además, la amibiasis extraintestinal puede afectar a casi todos los órganos del cuerpo; de todos modos, las localizaciones distintas al intestino y al hígado son muy raras y generalmente ocurren en sujetos gravemente parasitados (Pérez-Tamayo 1986).

La amibiasis intestinal es una enfermedad sumamente frecuente en México, aproximadamente del 10 al 20 % de la población es portadora de este parásito. En áreas endémicas como México, aproximadamente el 2 % de los pacientes adultos desarrollan absceso hepático amibiano (Onofre, 1986).

LA RESPUESTA INMUNITARIA EN LA AMIBIASIS

Aunque la amibiasis es muy frecuente en algunos países como México, solo unos cuantos individuos infectados con E. histolytica desarrollan colitis amibiana y muchos menos el absceso hepático amibiano que es su principal secuela (Onofre, 1986). Probablemente, la condición que desencadene este daño es la ruptura del equilibrio entre los factores de virulencia del parásito y la respuesta inmunitaria local y sistémica del hospedador (Kretschmer 1986). La colonización intestinal y la amibiasis invasora, desencadenan la producción de anticuerpos locales y sistémicos en humanos (Kagan, 1973; Sharma y col. 1978, 1981; Martínez y col., 1979; Grundy y col., 1983; Acosta y col., 1985, 1987).

Stemberg en 1978 encontró que eritrocitos cubiertos con antígenos amibianos eran lisados por monocitos en presencia de suero inmune, esto sugiere que el mecanismo de lisis por células es dependiente de anticuerpos. Sin embargo, no observó lisis de trofozoitos amibianos por monocitos y suero.

In vitro la interacción entre anticuerpos anti-amiba de la clase IgG o IgA marcados con fluoresceína y trofozoitos de E. histolytica, provoca en forma primaria una distribución homogénea de la fluoresceína en toda la superficie del trofozoito. Pero después de un corto período de incubación los anticuerpos son redistribuidos hacia un polo de la célula y finalmente liberados al medio, en complejos con sus antígenos respectivos. Este

fenómeno, conocido como formación de casquete (capping) puede ser uno de los mecanismos que protegen a la amiba de la inactivación o lisis por anticuerpos y complemento (Calderón y col., 1980; Acosta y col., 1983; Calderón y col., 1986). Lo anterior no se ha corroborado in vivo.

La eliminación de anticuerpos por los trofozoítos de E. histolytica, parece indicar que los mecanismos mediados por células son los responsable de controlar la amibiasis.

RESPUESTA CELULAR EN HUMANOS

El primer contacto entre E. histolytica y el sistema inmune se realiza a nivel intestinal. Una vez invadida la mucosa aparece una respuesta inmune celular o humoral que regula el curso de la infección (Trissl, 1982).

Las interacciones de células del hospedador con trofozoítos de Entamoeba histolytica son muy complejas, ya que éstas tienen capacidad de adherencia, citolisis y fagocitosis (Chávez y col., 1974; Ravdin y col., 1980; Ravdin y Guerrant, 1981; Trissl, 1982), sobre diferentes líneas celulares y sobre eritrocitos de diferentes especies animales.

La primera línea de defensa celular en el organismo son los Polimorfonucleares (PMN), cuando una amiba invade tejidos del humano seguramente tiene contacto con éstos. Las interacciones de

E. histolytica con PMN es uno de los eventos más interesantes. Guerrant y col en 1981, estudiaron las interacciones in vitro de neutrófilos humanos con dos cepas axénicas de E. histolytica aisladas de pacientes con amibiasis invasora. En este estudio la cepa virulenta HM1-IMSS lisó a los neutrófilos sin que se viera afectada la viabilidad amibiana. La muerte de los neutrófilos ocurrió a través del contacto celular, primero hubo cambios en la membrana, después degranulación, y por último la muerte del neutrófilo. En los estudios anteriores se observó que ni 3000 PMN podían disminuir la viabilidad de cepas virulentas.

Ravdin y col. 1985 estudiaron la interacción entre neutrófilos y algunas cepas amibianas axénicas. La cepa virulenta HM1-IMSS lisó neutrófilos humanos sin perder su viabilidad. Sin embargo, neutrófilos humanos lisaron cepas menos virulentas como la H-303-NIH y la NIH-200V, así como la cepa Laredo que no es patógena. Además, la susceptibilidad de los neutrófilos a la lisis por las diferentes cepas amibianas estuvo relacionada a la virulencia de estas sobre células del ovario de hamster. La capacidad de la cepa HM1-IMSS para matar neutrófilos fue reducida adicionar N-acetil-D-galactosamina (inhibidor específico de lectinas amibianas). Estos estudios demuestran claramente la importancia de las lectinas amibianas en la virulencia de estos organismos y en la interacción entre neutrófilos y este parásito.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la actividad

citolítica de E. histolytica sobre neutrófilos. La primera de ellas, es la que propone la existencia de una estructura lisosomal activa en la membrana (Eaton y col., 1969; Rondanelli y col., 1974; Proctor y Gregory, 1982), sin embargo, algunos hallazgos histopatológicos y estudios in vitro han descartado este mecanismo (González y Martínez-Palomo 1983). Se ha propuesto como mecanismo alternativo la activación autocatalítica de las enzimas proteolíticas del neutrófilo (Jarumilinta y Kradolfer, 1964). Ravidin y col. en 1982 observaron que la lisis de las células del ovario de hamster chino causada por E. histolytica puede inhibirse mediante bloqueadores de la formación de canales de Na y Ca (Verapamil y Bepridil), también se ha propuesto que el efecto lítico de las amibas sobre los neutrófilos podría resultar de alteraciones en el flujo de iones.

Los datos in vitro sugieren que E. histolytica invasora (cepas virulentas) tiene todos los requerimientos necesarios para resistir el enfrentamiento con los PMN humanos normales. Está por verse si esta inferioridad fagocítica de los PMN frente a E. histolytica también opera in vivo (Kretschmer, 1986).

La participación de los macrófagos, una de las principales células efectoras en la inmunidad celular, no ha sido estudiada suficientemente en la amibiasis humana. Los principales estudios sobre la participación de los macrófagos se ha realizado en modelos animales como hamsteres, ratones y gerbos. Además, en estos estudios solo se ha evaluado su participación en amibiasis

hepática y a la fecha no existen estudios en la amibiasis intestinal.

Salata y col en 1987 lograron activar macrófagos humanos con interferón gamma para que afectaran la viabilidad de trofozoítos de E. histolytica in vitro. Este estudio demostró que el interferon gamma por si solo es capaz de activar macrófagos para que mataran amibas virulentas in vitro. Además, anticuerpos anti-interferón gamma inhibieron en parte la acción de las linfocinas (producidas por la activación de linfocitos al incubarlos con antígenos o con concanavalina A) para activar macrófagos y consecuentemente lisar trofozoítos del parásito. Por otro lado, los macrófagos de calostro humano al incubarlos con trofozoítos de E. histolytica afectan la viabilidad y adherencia de estos últimos (Rocha y col., 1986).

Estudios clínicos indican que pacientes recuperados de absceso hepático amibiano rara vez vuelven a padecer la enfermedad, lo que sugiere una respuesta inmune protectora. Estudios experimentales en modelos animales, indican que mecanismos inmunes mediados por células pueden limitar o prevenir abscesos hepáticos (Meerovitch y Chadee, 1988).

Durante la fase aguda de la amibiasis invasora, se presenta una marcada depresión de la respuesta inmunitaria mediada por células, y esta depresión se corrige después de la recuperación del paciente (Ortiz-Ortiz, 1975; Ganguly y col., 1979).

Salata y col. en 1990 determinaron la presencia de diferentes factores supresores en el suero. Ellos midieron la respuesta de linfocitos T de pacientes recuperados de absceso hepático amibiano a un antígeno total de E. histolytica e incubados con sueros inmunes o sueros testigos. Cuando eran incubados con suero inmune, la respuesta proliferativa disminuía en un 63% y la producción de interferón gamma en un 93 % (el suero inmune no afectó la respuesta de los linfocitos a mitógenos. La actividad supresora del suero inmune disminuyó como aumentaba el tiempo post-tratamiento y no correlacionó con los títulos de anticuerpos. Ortiz y col. en 1975, encontraron que pacientes con absceso hepático amibiano tenían disminuida su respuesta inmune celular hacia antígenos de E. histolytica en el momento del diagnóstico. Se utilizó intradermorreacciones y la producción de MIF para medirla. La respuesta en todos los pacientes se recuperó 10 días después del tratamiento.

En pacientes que han presentado absceso hepático amibiano, se ha demostrado la proliferación de linfocitos T ante antígenos amibianos (Harris y Bray, 1976; Ganguly y col., 1979; Aust-Kettis y Sundqvist, 1982).

En intentos para determinar antígenos relevantes en la respuesta inmune mediada por células en la amibiasis, se determinó que fracciones amibianas ricas en una lectina inhibible con N-acetil-D-galactosamina induce gran actividad proliferativa en linfocitos de pacientes recuperados de una amibiasis aguda invasiva (Ravdin y col., 1985; Salata y Ravdin, 1985).

Joyce y Ravdin en 1986 determinaron por la técnica de Western-Blot las proteínas amibianas reconocidas por el suero de pacientes recuperados de absceso hepático amibiano. Ellos presuponen que estos antígenos son procesados por los macrófagos y presentados a los linfocitos T para que estimulen la producción de anticuerpos por los linfocitos B.

Las proteínas solubles preparadas de cultivos axénicos de E. histolytica son capaces de inducir una gran proliferación de linfocitos T de individuos no infectados (Diamantstein y col., 1981; Aust-Kettis y Sundqvist, 1982 ; Salata y Ravdin, 1985). Diamantstein y col. en 1980 encontraron que la proliferación es unicamente de los linfocitos T y no de los linfocitos B. Además encontraron que la actividad mitogénica óptima de proteína amibiana para linfocitos sanguíneos fue de 100-200 ug por ml. y se obtuvo entre el quinto y séptimo día de cultivo. La respuesta mitogénica linfocitaria fue mayor con proteínas amibianas que con Concanavalina A (Con A) que es un mitógeno de linfocitos T, tanto en magnitud de la respuesta proliferativa como en cantidad óptima de concentración. Estos investigadores sugieren que la mayor actividad de las proteínas amibianas se debe a su heterogeneidad, lo que les daría capacidad para unirse a diferentes sitios en los linfocitos T o activar diferentes subpoblaciones.

Salata y col. en 1986 caracterizaron los fenotipos de linfocitos T y la proliferación de éstos, en pacientes después del tratamiento contra el absceso hepático amibiano. Estudiaron 15 pacientes con un promedio de 10 semanas después del tratamiento,

y fueron comparados con controles de la misma edad y sexo. La relación de T4/T8 se encontró diferente en los pacientes a los controles, con un aumento de los T8 y una reducción de los T4. No se presentó diferencia en el número total de linfocitos entre los grupos. La respuesta de los linfocitos de los pacientes a la Con A fue menor que en los controles la respuesta a la fitohemaglutinina (PHA) no estuvo alterada. La blastogénesis de linfocitos inducida por proteínas amibianas solubles (Cepa HMI-IMSS), fue mayor que la respuesta mitogénica en los controles. Linfocitos T no inmunes son capaces de matar in vitro trofozoítos de E. histolytica si son estimulados 18 horas antes con fitohemaglutinina (PHA) (Salata y col 1987). La muerte de las amibas fue dependiente del contacto con los linfocitos e independiente de anticuerpos. Esta requirió la presencia de PHA en el momento del contacto. La presencia de PHA en el momento de la interacción de linfocitos T no sensibilizados con amibas, no fue suficiente para que las células del hospedador mataran a las amibas, ni para hacerla resistentes a la acción citotóxica de las amibas.

MODELOS DE INMUNIDAD CELULAR EN ANIMALES

Con el propósito de analizar la patogénesis de la amibiasis in vivo, la actividad farmacológica de medicamentos antiamibianos y, además, investigar la respuesta inmune, se ha tratado de

reproducir la infección por E. histolytica en animales de laboratorio. En un principio, los enfoques experimentales eran administrar quistes procedentes de las heces de pacientes con disentería amibiana por vía oral. Después, fue cultivar a los trofozoitos para enquistarlos in vitro y utilizar este material. Este método se dejó de utilizar debido a la dificultad para inducir el enquistamiento de los trofozoitos en cultivo. Por lo tanto, el procedimiento más comúnmente empleado para infectar a los animales de laboratorio ha sido la inoculación de los trofozoitos directamente en el intestino grueso o en el hígado.

Las primeras investigaciones en amibiasis experimental se llevaron a cabo en perros y gatos. De estos primeros estudios se obtuvieron importantes conclusiones, como el hecho de que las heces disentéricas que contienen trofozoitos no infectan a otros animales cuando se les administra oralmente, mientras que los quistes administrados por la misma vía, sí producen lesiones intestinales. Actualmente el uso de estos animales es limitado, en parte debido a la dificultad en la manipulación y a la falta de uniformidad e insuficiente número de animales.

Actualmente, los roedores se utilizan con mayor frecuencia como modelos para el estudio de amibiasis experimental. Sin embargo, se ha observado en general que los animales que resultan adecuados para estudios de amibiasis hepática, no lo son para investigaciones de amibiasis intestinal. Consecuentemente, se utilizan modelos específicos con características determinadas

para resolver problemas específicos.

Tsutsumi V. y col. en 1984 concluye que el hámster es el animal de experimentación que se recomienda para diferentes estudios relacionados con la amibiasis hepática, ya que presenta una alta susceptibilidad y las lesiones obtenidas son uniformes e histológicamente similares a las observadas en el humano. En contraste, las lesiones intestinales amibianas no se producen fácilmente en este animal.

Estudios con modelos in vivo de absceso hepático amibiano, son indicativos de que mecanismos mediados por células limitan la infección inicial amibiana y previenen contra amibiasis invasiva recurrente. Esto se demostró al deprimir la respuesta inmune mediada por células en hamster por diversos mecanismos como: terapia de esteroides, timectomia neonatal, esplenectomia, radiaciones, tratamiento con sílice y con anticuerpos antimacrófagos o antilinfocitos, y después retar con E. histolytica en el hígado. Los hamsteres con inmunodepresión presentaron abscesos mayores que los animales normales, así como mayor número de metástasis a otros órganos (Ghadirian y col. 1981 a,b, 1982a, 1983; Tanimoto y col., 1974). En hámsteres inmunizados, algunas células efectoras como: linfocitos de sangre periférica, células de bazo y macrófagos peritoneales, son capaces in vitro de matar trofozoítos de E. histolytica (Ghadirian y Meerovitch 1982b).

Estudios realizados en un modelo de ratones desnudos con absceso hepático amibiano dan una elevada importancia al macrófago como

célula efectora del huésped (Stern y col, 1984). Los macrófagos derivados de monocitos activados con Concanavalina A o fitohemaglutinina liberan una linfocina que afecta a los trofozoitos de E. histolytica causándoles la muerte alrededor de 18 horas después.

La rata, se ha utilizado como un modelo de amibiasis intestinal (Neal, 1951; Healy y Gleason, 1966). Sin embargo, solo son susceptibles a infectarse ratas recién destetadas, estas no presentan un sistema inmune totalmente desarrollado, lo que no permite usarlas como un modelo de estudio de la respuesta inmune. Los ratones son animales altamente resistentes a la amibiasis lo que restringe su uso, a pesar de que por haberse desarrollado cepas singénicas sería ideal su empleo en el estudio de la respuesta inmune (Gold y Kagan, 1978).

El primer reporte del uso de los gerbos en infecciones producidas por E. histolytica fue hecho por Diamond y col. en 1974. Ellos estudiaron las lesiones hepáticas producidas por la inoculación in situ de trofozoitos de E. histolytica y observaron una menor virulencia en gerbos que en hámster, independientemente del sitio de inóculo. Esto sugirió que el gerbo podría ser un mejor modelo animal para el estudio de la secuencia en la patogenia de la amibiasis.

Posteriores estudios sobre la amibiasis intestinal y hepática, fueron hechos por Chadee y Meerovitch (1984, 1985 a,b). Ellos observaron que las lesiones en la pared cecal no fueron en un principio invasiones activas, sino indujeron cambios

histológicos en la lámina propia y epitelio interglandular, dando como resultado la ruptura de la pared. Estos cambios pueden ocurrir como resultado de la absorción de toxinas amebianas y entonces, al superar las barreras de defensa, las amebas pueden invadir y producir las lesiones típicas.

Las amebas obtenidas de casos asintomáticos de amebiasis pueden colonizar el ciego de gerbos, sin embargo, la presencia de amebiasis invasiva depende del uso de cepas altamente virulentas. Las infecciones cecales se pueden obtener con cepas cultivadas en medios axénicos o monoxénicos. Las bacterias asociadas en cultivos monoxénicos parecen no jugar un papel importante para el mantenimiento y expresión de la virulencia en este modelo (Chadee y col. 1985c). Sin embargo, los protozoarios y las bacterias normales del ciego puede afectar el crecimiento y la colonización de los trofozoítos (Smith y col 1985). Todo lo anterior hace pensar que el gerbo es un buen modelo para el estudio de la inmunología de la amebiasis a nivel intestinal.

Chadee y Meerovitch en 1985, describieron cambios histológicos en órganos linforeticulares después de la infección intracecal de gerbos con E. histolytica. Los ganglios linfáticos mesentéricos mostraron 5 a 10 días después de la inoculación (DI), hiperplasia de folículos corticales y blastogénesis en áreas paracorticales. 20 a 30 días DI las áreas paracorticales presentaban disminución de linfocitos, 60 DI las áreas paracorticales estaban totalmente repobladas. Los folículos linfoides del bazo presentaron hiperplasia durante todo el tiempo.

En el trabajo anterior a pesar de demostrar que existen cambios en los organos linfoides asociados al intestino no se demostró si existía activación de linfocitos, ya sean locales o sistémicos. Los gerbos, también han sido utilizados para estudiar la respuesta inmune celular en abscesos amibianos. Denis y Chadee en 1988, encontraron en gerbos que macrófagos obtenidos de hígado con absceso hepático amibiano tenían notablemente inhibida su función reguladora. No producían interleucina 1 ni respondían a linfocinas in vitro.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El primer contacto de E. histolytica con su huésped se realiza a nivel intestinal, se ha propuesto que es la respuesta celular local la responsable de mantener la homeostasis entre los factores de virulencia del parásito y el huésped.

La respuesta inmune celular a nivel intestinal contra Entamoeba histolytica no ha sido estudiada adecuadamente hasta el momento, esto debido a la dificultad de encontrar un modelo experimental adecuado de amibiasis intestinal.

Anteriormente, nuestro grupo demostró que diferentes fracciones de E. histolytica (filtrado amibiano, extracto total, fracción membranal y fracción nuclear) tienen efecto mitogénico sobre linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) y bazo de ratones BALB/c normales (Díaz y col 1990). Este efecto podría activar en forma policlonal diferentes colonias de linfocitos y ser un mecanismo de patogenicidad.

Sin embargo, la utilización de ratones para demostrar la respuesta inmune local contra E. histolytica esta limitada por la gran resistencia de los ratones a la infección (Mattern, 1977).

Se han propuesto varios modelos animales para la amibiasis intestinal, aparentemente, el mejor modelo en la actualidad es el gerbo.

Chadee y Meerovitch en 1984 y 1985, lograron infectar gerbos con cepas virulentas de E. histolytica y producir lesiones

características. Esto hace pensar que los trofozoítos de E. histolytica interaccionan con el sistema inmune a este nivel.

El proceso de penetración intestinal de la amibas o de difusión de antígenos amibianos subcelulares en el ciego de los gerbos, podría tener efecto sobre el establecimiento de una respuesta inmune celular ya sea local y/o sistémica.

Por lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar la respuesta inmune celular, tanto local como sistémica, que presentan grupos de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos de E. histolytica.

OBJETIVOS

- 1.- Adaptar y mantener una colonia homogénea de gerbos (Meriones unguiculatus) tomando en consideración la susceptibilidad de estos animales a la infección amibiana.
- 2.- Investigar la proliferación de linfocitos obtenidos de GLMs y bazo de gerbos ante un mitógeno de linfocitos T (concanavalina A).
- 3.- Determinar la actividad mitogénica de diferentes fracciones subcelulares de E. histolytica (extracto total del parásito y fracción membranal P-15) sobre linfocitos de GLMs y bazo de gerbos normales.
- 4.- Determinar si la inoculación intracecal de trofozoítos de E. histolytica en gerbos, provoca el reconocimiento específico (a los 10 y 30 días postinoculación) al incubar linfocitos de GLMs y bazo de estos animales con proteínas amibianas (Medido por la incorporación de $^3\text{H-Td}$ en una microtécnica de transformación blastoide).
- 5.- Comparar la activación específica de linfocitos de GLMs (respuesta celular intestinal) con los de bazo (respuesta celular sistémica).
- 6.- Determinar si la inoculación intracecal de trofozoítos de E. histolytica en gerbos, estimula la respuesta inmune celular sistémica in vivo (Por intradermorreacciones).

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron gerbos machos (Meriones unguiculatus) de 55 a 65 días de edad y con un peso de 60 a 80 gramos (g). Se alimentaron con productos comerciales para ratones y agua ad libitum. El tiempo que duró el trabajo, se mantuvieron en jaulas individuales dentro del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del I.P.N..

Protocolo experimental para determinar la actividad mitogénica de la concanavalina A sobre linfocitos de gerbos normales.

Se utilizaron 8 gerbos sanos. Se sacrificaron y obtuvieron los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, se estimularon con Con A (sigma) a siete diferentes dosis (0, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ g por pozo en los cultivos), para medir la estimulación se utilizó una microtécnica de transformación blastoide.

Protocolo experimental para determinar la actividad mitogénica de dos diferentes fracciones amibianas (Extracto total y Fracción P-15) sobre linfocitos de gerbos normales.

Se utilizaron 14 gerbos normales. Se sacrificaron y obtuvieron los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, se estimularon con las dos fracciones amibianas a 6 diferentes dosis (0, 1, 5, 20, 50 y 100 μg por pozo en los cultivos), para medir la estimulación se utilizó una microtécnica de transformación blastoide.

Protocolo experimental para medir la respuesta inmunitaria de linfocitos de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos de E. histolytica.

15 días antes de ser inoculados con E. histolytica, todos los animales fueron tratados (sondeo intragástrico) tres días seguidos con metronidazol (Flagyl), a dosis de 200 mg/Kg. El tratamiento previo fue con el fin de eliminar protozoarios comensales como Entamoeba muris y Trichomonas sp..

Se utilizaron 28 animales divididos en cuatro grupos de 7 . Los grupos 1 y 3 fueron inoculados con 5×10^5 trofozoítos en ciego. Los grupos 2 y 4 fueron utilizados como grupos testigo y no se inocularon.

Los animales del grupo uno y dos fueron sacrificados 10 días des-

pués de la inoculación, se obtuvieron linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos y se estimularon con dos diferentes preparaciones amebianas (Extracto total del parásito y una fracción membranal del mismo) a seis diferentes dosis. Para medir la estimulación se utilizó una microtécnica de transformación blastoide. Los animales de los grupos tres y cuatro fueron sacrificados 30 días después de la inoculación y sus linfocitos se procesaron de la misma manera que los grupos uno y dos. En todos los casos se trabajaron dos animales simultáneamente, un animal del grupo testigo y un animal del grupo problema el mismo día para igualar condiciones.

Obtención de amibas para inocular

Se utilizó la cepa axénica de Entamoeba histolytica HMI-IMSS. Todos los trofozoitos fueron cultivados en condiciones axénicas en el medio TYI-S-33 (Diamond, 1978), durante 72 horas, tiempo en que las amibas se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Las amibas se despegaron mediante incubación en agua-hielo (aproximadamente a 5 grados centígrados) por 5 minutos y posteriormente se centrifugaron en una centrifuga clínica a 1500 rpm.. Se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se resuspendieron los trofozoitos en el mismo medio. Se contaron las amibas en un hematómetro y se ajustaron a la cantidad requerida (2.5×10^5 en ml.). Todas las amibas utilizadas en el presente trabajo fueron donadas por el Dr. Victor Tsutsumi, Jefe del laboratorio de

Patología del Departamento de patología experimental del CINVESTAV del INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

Antígenos amibianos

Las amibas usadas para la obtención de los antígenos amibianos, se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 5 minutos en tubos cónicos de 50 ml.. Se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se resuspendieron los trofozoítos en una solución buffer de fosfatos (P.B.S.) estéril, se repitió la centrifugación, se resuspendieron los trofozoítos en 5 ml. de P.B.S..

El extracto total se obtuvo al romper los trofozoítos por congelación a -20 grados centígrados y descongelación brusca a 15 grados centígrados, esto se repitió tres veces. Después de la última descongelación no se observaron trofozoítos enteros al microscopio compuesto. La fracción membranal (P-15) se obtuvo al centrifugar a 14 000 G por 15 minutos un extracto total del parásito, el sobrenadante se desechó y el sedimento fue nuestra fracción útil (Valadez-Salazar y López Revilla, 1986).

La cantidad de proteína de los extractos amibianos se determinó por la reacción de Folin-Ciocalteu (Lowry, 1951). Los extractos se prepararon el mismo día que fueron usados.

Cada animal antes de la cirugía se mantuvo en ayuno cuando menos 12 horas. Se anestesió intraperitonealmente con pentobarbital sódico (Anestesal, Smith-Kline & French, México) a dosis de 50 mg/Kg de peso. Ya dormido se rasuró la región abdominal con un rastro normal, fue colocado en una mesa de disección decúbite supino y sujetado por las extremidades a los lados de la mesa. El abdomen fue limpiado exhaustivamente con torundas humedecidas con Cloruro de benzalconio (Benzal). El animal fue entonces cubierto con un campo hendido de tela estéril. Con un bisturí se efectuó la incisión media abdominal de aproximadamente 2 cm. de largo, en cavidad abdominal en dos planos, piel y pared muscular. Se expuso el ciego al exterior. Las amibas fueron inyectadas en el ápice con una jeringa insulínica. La inoculación fue lenta para evitar la distensión brusca del ciego. La herida abdominal fue cerrada en dos planos con catgut 000, se aplicó un antiséptico local sobre la herida. Los animales fueron mantenidos en calor hasta que se recuperaron de la anestesia. Una vez despiertos se les devolvió la dieta normal hasta el cumplimiento del plazo establecido de infección.

Obtención de linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de gerbos

Los gerbos fueron sacrificados por inhalación con cloroformo, se les desinfectó el abdomen con cloruro de benzalconio (Benzal) y se

colocaron en un ambiente estéril. A continuación se separó piel abdominal, las demás capas abdominales se incidieron hasta llegar al mesenterio, se localizaron los ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo, se extirparon y se colocaron por separado en cajas de Petri pequeñas, conteniendo RPMI-1640 libre de suero a 4 °C. Los órganos se disgregaron mecánicamente con pinzas de disección, con una pipeta Pasteur se tomó suavemente la suspensión celular y se paso a un vaso de precipitados de 10 ml. en cuya entrada tenía una capa de tela de organza que sirvió como filtro para eliminar tejido conectivo y grasa. La suspensión celular fue pasada a tubos de centrifuga con una pipeta Pasteur y centrifugada a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en RPMI-1640 frío y sin suero, esto se repitió dos veces más. La última resuspensión se hizo en 4 ml de RPMI-1640 frío, suplementado con 5 % de suero fetal bovino (S.F.B.) inactivado por 30 minutos a 56 °C y mercaptoetanol a una concentración de 5×10^{-5} M. (Haneberg y col, 1978; Serke y col 1987) . Se tomaron 50 μ l de azul tripano al 0.2 % en solución salina al 0.85 %, la muestra se colocó en un hemocitómetro y se contó el número de linfocitos en un tiempo no mayor de 3 minutos. Se estandarizó la suspensión a 2×10^5 linfocitos por ml..

Microtécnica de transformación blastoide

En cada pozo de una placa de microcultivo se colocaron 2×10^5 linfocitos de bazo o ganglios linfáticos mesentéricos en 100 μ l de

RPMI-1640 suplementado con S.F.B. (Suspensión antes descrita). Se adicionó a los pozos por triplicado 0, 1, 5, 20, 50 y 100 μg de proteína de los antígenos amibianos (E.T. y P-15) en 100 μl de RPMI-1640 suplementado con S.F.B., de la misma manera se hicieron cultivos con un mitógeno conocido que fue la Concanavalina A, Se agregaron 5 y 10 μg en 100 μl de RPMI-1640 suplementado con S.F.B..

Las células se incubaron por 5 días en una estufa a 37 °C, con 5 % de bióxido de carbono en aire y 100 % de humedad. 18 horas antes de finalizar el periodo de incubación, se les agregó 1 μCi de timidina tritiada (Actividad específica de 6.7 Ci/mol, New England Nuclear, Boston Mass., E.U.A.) en 10 μl de RPMI-1640 suplementado con S.F.B. (Nowell 1960).

Después del periodo de incubación las células fueron cosechadas en P.B.S. a pH 7.2 en filtros de fibra de vidrio por medio de un cosechador (Bello-microharvester), conectado a una bomba de vacío. Se hizo pasar por el filtro, ácido tricloroacético al 5 y 10 %, y metanol al 70 % (Weir, 1978 ; Hudson y Hay, 1980).

Se secó el filtro y se despegaron los círculos pertenecientes a cada pozo de la microplaca, estos se depositaron en viales de plástico con tapón de rosca. Después se adicionaron por vial 2 ml. de líquido de centelleo. Las lecturas fueron obtenidas en cuentas por minuto (CPM) en un espectrofotómetro para líquido de centelleo.

Intradermorreacciones

La intradermorreacción se realizó por la prueba de la hinchazón del cojinete plantar. Se obtuvo la dosis óptima para la inoculación en el cojinete plantar (10 µg en 0.05 ml.). Se inoculó dicha cantidad de proteína intradérmicamente en el cojinete plantar de la pata izquierda, en la pata derecha de todos los animales se les introdujo un volumen igual de solución salina fisiológica estéril. La medida del espesor del cojinete plantar se hizo con un microcalibrador antes y después de 24 horas del desafío con antígeno amibiano (se utilizó fracción P-15). El porcentaje de incremento (Δ %) de la hinchazón del cojinete plantar está dado por la diferencia entre la lectura después de 24 horas del desafío con el antígeno o con SSF (Xt24) y la lectura antes del desafío (Xt0).

$$\Delta \% = \frac{Xt24 - Xt0}{Xt0} \times 100$$

Protocolo experimental para evaluar las intradermorreacciones

La dosis óptima de proteína para la inoculación intradérmica se obtuvo al inocular grupos de tres gerbos con diferentes cantidades del antígeno amibiano (0.1, 5, 10, 20, 50 y 100 µg de proteína en 0.05 ml.), todos habían sido infectados intracecalmente con Entamoeba histolytica 20 días antes.

Se utilizaron 4 grupos de 10 animales, en todos la inoculación fue intradérmica con 10 µg de proteína en 0.05 ml.. El grupo 1 fueron animales no infectados y retados con proteína amibiana.

Los animales del grupo 2 fueron animales con 30 días de infección amibiana y retados con albúmina sérica bovina. El grupo 3 fueron animales con 10 días de infección y retados con proteína amibiana, por último, los animales del grupo 4 tenían 30 días de infección y fueron retados con proteína amibiana.

Análisis estadísticos

Se utilizaron para comparar los resultados entre los grupos, tres técnicas estadísticas: análisis de varianza simple, análisis de varianza factorial y una prueba de comparación múltiple (diferencia significativa mínima). Los datos fueron analizados en una computadora PRINTAFORM con el programa S.S.S. en la Unidad de Computo de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las gráficas fueron realizadas con el programa HARVARD GRAPHICS.

RESULTADOS

Efecto dosis-respuesta de Con A sobre la incorporación de ^3H -timidina en linfocitos de bazo y GLMs de gerbos.

Las curvas dosis-respuesta de los linfocitos se esquematizan en la gráfica 1. Tanto en linfocitos bazo como en GLMs la dosis a la que incorporaron mayor cantidad de ^3H -timidina fueron 5 y 10 μg , a estas dosis se presentaron diferencias estadísticas con respecto a linfocitos cultivados sin proteínas a dosis 0 μg . No se observaron diferencias en la respuesta de linfocitos de bazo y GLMs de gerbos a la estimulación con Con A (Tabla 1).

Efecto dosis-respuesta de dos diferentes preparaciones amebianas sobre la incorporación de ^3H -timidina en linfocitos de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos (GLMs) de gerbos.

Se cultivaron linfocitos de bazo y GLMs (14 gerbos) con diferentes cantidades de un extracto total (E.T.) de Entamoeba histolytica, los resultados de este experimento se esquematizan en la gráfica 2. La estimulación (incorporación de ^3H -timidina) a 0 μg de proteína fue estadísticamente menor ($\alpha = 0.05$) que cualquiera de las dosis empleadas en los dos tipos de célula. La estimulación óptima se obtuvo al incubar linfocitos de bazo con 1 μg de proteína (5 μg de proteína por ml. de medio) y al incubar linfocitos de GLMs con 5 μg

de proteína (25 μ g de proteína por ml. de medio). No hubo diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) en las curvas de estimulación dosis-respuesta entre linfocitos de bazo y GLMs para un E.T. de E. histolytica (Tabla 2 y 3).

Los resultados de incubar linfocitos de bazo y GLMs con diferentes cantidades de una fracción P-15 de E. histolytica se presenta en la figura 3. En los dos tipos de célula a la dosis 0 μ g de proteína fue estadísticamente menor que las otras dosis empleadas, la estimulación óptima para las dos fue 5 μ g (25 μ g de proteína por ml. de medio). La respuesta fue estadísticamente mayor en linfocitos GLMs para las dosis 0, 5 y 20 μ g de proteína.

Incorporación de ^3H -timidina en linfocitos de bazo y GLMs de gerbos inoculados 10 días antes con 5×10^5 trofozoitos de E. histolytica.

El efecto de los extractos de E. histolytica sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos linfocitarios de GLMs y bazo de 7 gerbos inoculados con trofozoitos de E. histolytica 10 días antes, se comparó con el efecto producido por los mismos extractos de linfocitos de un grupo testigo.

Las curvas dosis-respuesta de linfocitos de bazo y GLMs a un E.T. del parásito fueron comparadas en las gráficas 4 y 5, en ambas los linfocitos incorporaron mayor cantidad de ^3H -timidina a dosis de 5 μ g de proteína. El grupo experimental presentó una respuesta estadísticamente mayor que el grupo testigo a dosis de 1 y 5 μ g de

proteína para ambos tipos de célula

(Tabla 6 y 7). No hubo diferencias estadísticas en la respuesta a un E.T. entre linfocitos de bazo y GLMs en el grupo experimental o en el testigo.

Las curvas de estimulación de linfocitos de bazo y GLMs a un antígeno P-15 de E. histolytica se compararon en las gráficas 6 y 7, en ambas fue estadísticamente mayor la respuesta del grupo experimental a dosis de 1, 5, 20 y 100 μg de proteína. La dosis óptima de estimulación fue 5 μg de proteína. Los linfocitos de GLMs tuvieron una mayor respuesta al antígeno P-15 que los linfocitos de bazo, tanto en el grupo experimental como en el testigo (tablas 8 y 9).

Incorporación de ³H-Timidina en cultivo de linfocitos de bazo y GLMs de gerbos inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoítos de E. histolytica.

Se comparó el efecto producido por dos extractos de E. histolytica sobre cultivos de linfocitos, de un grupo testigo y de un grupo experimental (inoculado 30 días antes con E. histolytica).

Las curvas dosis-respuesta de linfocitos de GLMs y bazo a un E.T. de E. histolytica se presentan en las gráficas 8 y 9, las cantidad de proteína que produjo mayor estimulación en las células fue 5 μg .. Los linfocitos de GLMs incorporaron estadísticamente mayor

cantidad de ^3H -timidina que el grupo testigo en todos los puntos de la curva, excepto para 0 μg de proteína (Tabla 11). El grupo experimental en linfocitos de bazo fue estadísticamente mayor que el testigo en las dosis 1, 5 y 20 μg de proteína (tabla 10). En el grupo experimental los linfocitos de GLMs respondieron mejor al E.T. que los linfocitos de bazo en las dosis 5, 20 y 50 μg de proteína. Las curvas de estimulación linfocitaria de bazo y GLMs a un antígeno P-15 se observan en la gráfica 10 y 11, en ambas fue estadísticamente mayor la respuesta del grupo experimental en todos los puntos de la curva excepto 0 μg . La dosis óptima de estimulación fue 5 μg de proteína. Los linfocitos de GLMs tuvieron una mayor respuesta al antígeno P-15 que los linfocitos de bazo, tanto en el grupo experimental como en el testigo (Tabla 12 y 13).

Efecto de la inyección intradérmica en cojinetes plantar de un antígeno membranal amibiano en gerbos inoculados 10 y 30 días antes con 5×10^5 trofozoitos de E. histolytica.

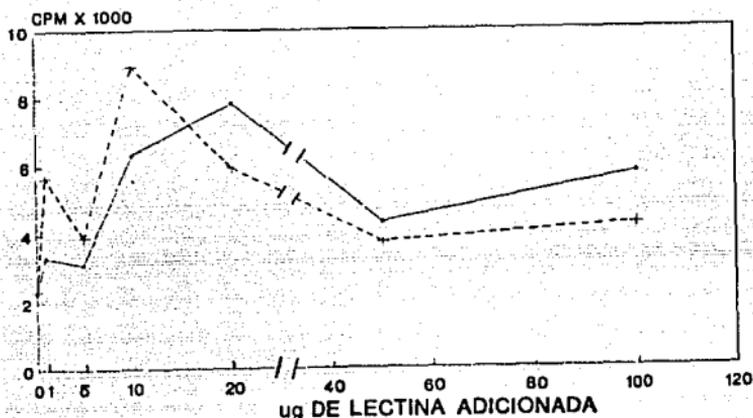
Se comparó el aumento del volumen en cuatro grupos de animales inoculados con 10 μg de antígeno amibiano (P-15) en el cojinete plantar.

El porcentaje de incremento de volumen en los cuatro grupos se esquematiza en la gráfica 12. El grupo "a" fueron 10 gerbos no infectados e inoculados con antígeno amibiano, el grupo "b" fueron 10 gerbos infectados 30 días antes con E. histolytica y retados con albumina sérica bovina, el grupo "c" fueron 10 gerbos infectados 10

días antes con E. histolytica e inoculados con antígeno amibiano, el grupo "d" fueron 10 gerbos infectados 30 días antes con E. histolytica e inoculados con antígeno amibiano.

En los grupos "c" y "d" fueron estadísticamente ($\alpha = 0.05$) mayores los aumentos de volumen que en los grupos "a" y "b". No se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos "c" y "d".

GRAFICA 1



Efecto de la cantidad de Con A sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo $\text{---}\circ\text{---}$ y GLMs $\text{---}+\text{---}$ de gerbos normales. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 8 animales.

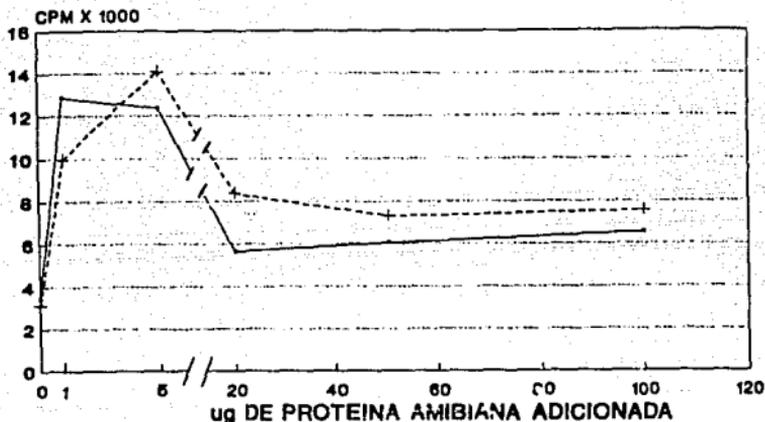
Tabla 1.- Efecto de la cantidad de Concanavalina A (Con A) sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo y GLMs. de gerbos (8 animales). Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de Con A		0	1	5	10	20	50	100
		(cpm)						
BAZO	Media	2276	3293	3104*	6323*	7824*	4312	5742
	Desviación standard	428	1067	1723	1496	1040	1572	1621
GLMs.	Media	2332	5643	3914*	8914*	5937*	3736	4239
	Desviación standard	712	1916	976	1249	1394	1730	928

* Indica diferencias estadísticas con cultivos sin mitógenos del mismo órgano.

cpm = Cuentas por minuto.

GRAFICA 2



Efecto de la cantidad de proteína de un extracto total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo \bullet — \bullet y GLMs $+ \cdots +$. Cada gerbo es probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 14 animales.

Tabla 2 : Efecto de la cantidad de proteína de una fracción total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo. (14 gerbos normales). Cada gerbo se probó por triplicado

Cantidad de proteína ambiental en los cultivos	Media (cpm)	Desviación standard (cpm)
a) 0 ug	3442	1438
b) 1 ug	12856 ^{a d e f}	2863
c) 5 ug	13342 ^{a d e f}	2723
d) 20 ug	5645 ^a	2600
e) 50 ug	6051 ^a	2172
f) 100 ug	6553 ^a	2198

Literales como : a b c después de la media indican diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) con la dosis de la cual procede la literal.

cpm = cuentas por minuto.

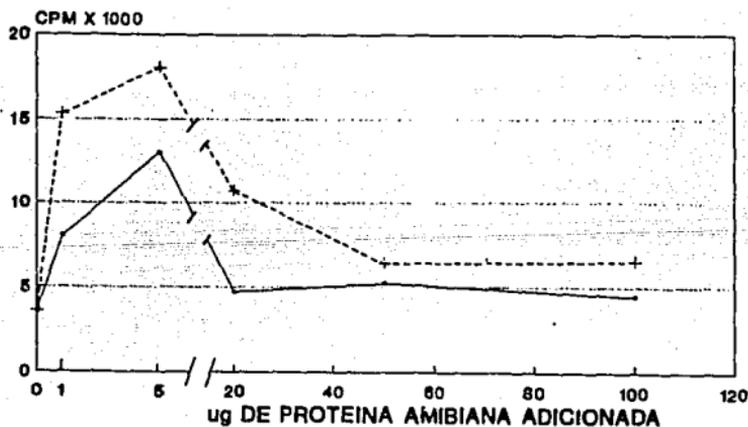
Tabla 3 : Efecto de la cantidad de proteína de una fracción total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs (14 gerbos normales). Cada gerbo se probó por triplicado.

Cantidad de proteína amibina en los cultivos	Media (cpm)	Desviación standard (cpm)
a) 0 ug	3150	1399
b) 1 ug	9951 ^{a d e f}	3924
c) 5 ug	14078 ^{a b d e f}	3301
d) 20 ug	8398 ^a	2386
e) 50 ug	7307 ^a	2315
f) 100 ug	7570 ^a	2477

Literales como : a b c después de la media indican diferencias estadísticas ($\alpha < 0.05$) con la dosis de la cual procede la literal.

cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 3



Efecto de la cantidad de proteína de una fracción P-15 de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo ——— y GLMs +----+. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 14 animales.

Tabla 4 : Efecto de la cantidad de proteína de una fracción P-15 de E. histolytica sobre la incorporación de ³H-timidina en cultivos de linfocitos de bazo. (14 gerbos normales). Cada gerbo se probó por triplicado.

Cantidad de proteína albina en los cultivos	Media (cpm)	Desviación standard (cpm)
a) 0 ug	3496	1438
b) 1 ug	7984 ^a	2863
c) 5 ug	12995 ^{a c}	2733
d) 20 ug	4706 ^{a b c}	2600
e) 50 ug	5220 ^{a b c}	2172
f) 100 ug	4438 ^{b c}	2198

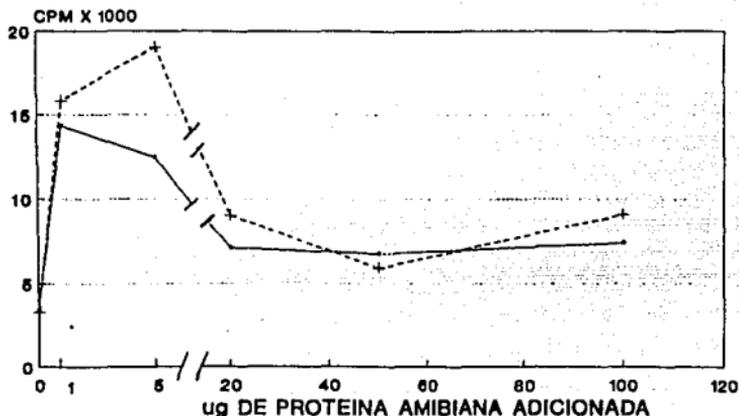
Literales como : a b c después de la media indican diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) con la dosis de la cual procede la literal.
cpm = cuentas por minuto.

Tabla 5 : Efecto de la cantidad de proteína de una fracción P-15 de E. histolytica sobre la incorporación de ³H-timidina en cultivos de linfocitos de GLNs (14 gerbos normales). Cada gerbo se probó por triplicado.

Cantidad de proteína albina en los cultivos	Media (cpm)	Desviación standard (cpm)
a) 0 ug	3582	1303
b) 1 ug	15326 ^{a d e f}	3805
c) 5 ug	18065 ^{a b d e f}	2795
d) 20 ug	10732 ^{a e f}	2850
e) 50 ug	6392 ^{a c}	3858
f) 100 ug	6499 ^{b c}	2045

Literales como : a b c después de la media indican diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) con la dosis de la cual procede la literal.
cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 4



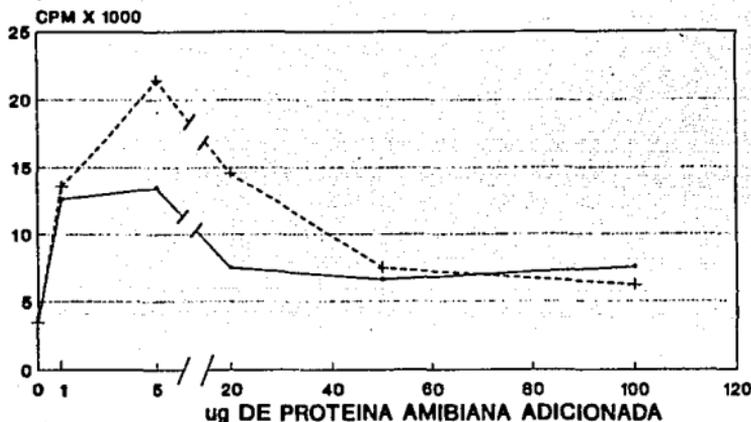
Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo de gerbos estimulados con un extracto total de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ----- fueron inoculados 10 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) ——— no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

Tabla 6 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fue inoculado 10 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo control (7 gerbos) no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
G R U	Testigo						
	Media	3404	14346	12469*	7096*	6775	7408
	Desviación standard	927	2627	3300	2633	2119	2334
P O	Experimental						
	Media	3284	15821	19018*	9009*	5540	9077
	Desviación standard	1616	3915	4264	2824	1923	3125

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos experimental y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.
cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 5



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs de gerbos estimulados con un extracto total de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ----- fueron inoculados 10 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) ————— no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

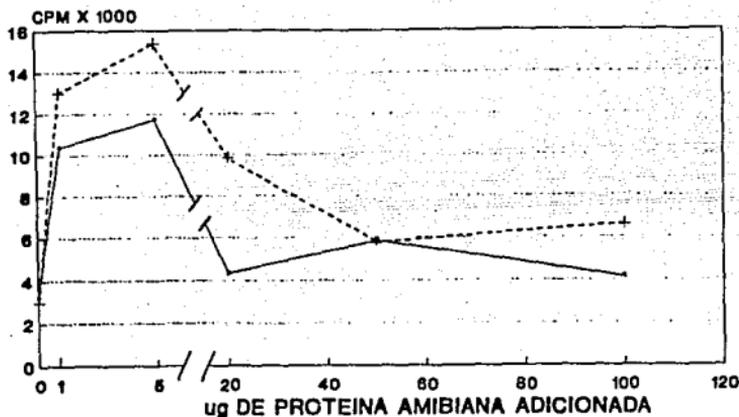
Tabla 7 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) inoculado 10 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo control no inoculado. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100	
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	
G R U P O	Testigo	Media	3648	12602	13466*	7492*	6610	7549
		Desviación standard	1697	3496	3290	2683	1722	2614
O	Experimental	Media	3467	13556	21401*	14545*	7454	6211
		Desviación standard	1553	3585	3750	2828	1966	1787

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos Experimental y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.

cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 6



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo de gerbos estimulados con una fracción P-15 de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ---- fueron inoculados 10 días antes con 5×10^3 trofozoítos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) — no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

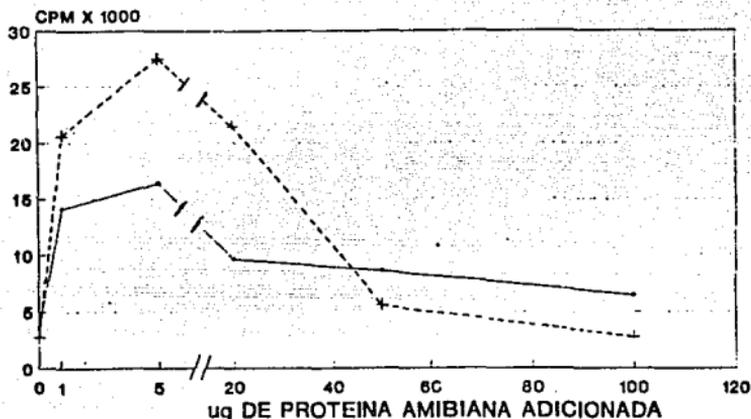
Tabla 8 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno P-15 de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fue inoculado 10 días antes con 5×10^3 trofozoítos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo control (7 gerbos) no inoculado. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100	
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	
G R U P O	Testigo	Media	3238	10390	11726*	4332*	5862	4140*
		Desviación standard	1238	2411	3101	1762	1897	1429
Experimental		Media	3238	12996	15378*	9848*	5778	6609*
		Desviación standard	1197	3849	2606	3312	2315	2165

* Indica diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los grupos problema y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.

cpm = Cuentas por minuto.

GRAFICA 7



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs de gerbos estimulados con una fracción P-15 de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ----- fueron inoculados 10 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) —■— no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

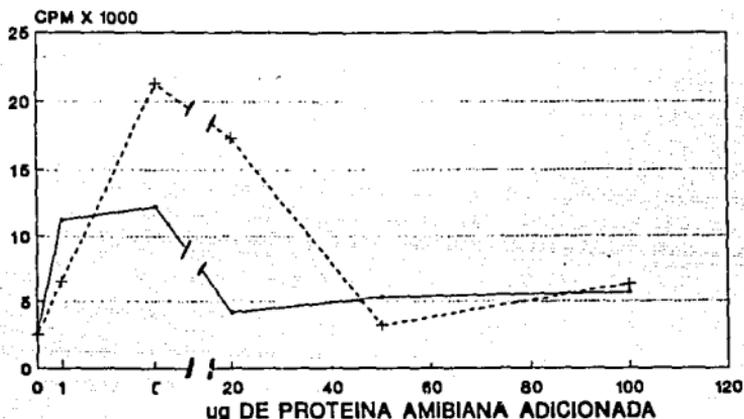
Tabla 9 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno P-15 de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fueron inoculados 10 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo testigo (7 gerbos) no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100	
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	
G R U P O	Testigo	Media	3527	14107*	16373*	9263*	8589*	6422*
		Desviación standard	1360	3421	2447	2374	3563	2352
	Experimental	Media	2767	20617*	27488*	21486*	5582*	2743*
		Desviación standard	1051	3803*	3016*	2601*	1034*	1253*

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos problema y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.

cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 8



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo de gerbos estimulados con un extracto total de E. histolytica. Un grupo experimental (7 gerbos) ----- fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoítos de E. histolytica en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) ——— no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

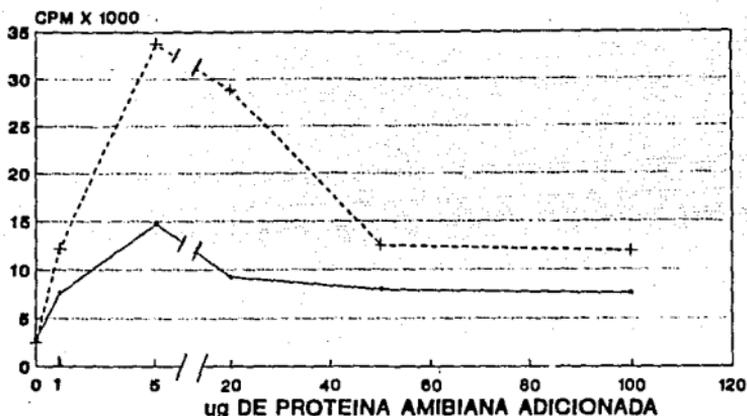
Tabla 10 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno total de E. histolytica sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoítos de E. histolytica directamente al ciego y un grupo testigo (7 gerbos) no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
G R U P O	Testigo	Media	2573	11201*	12221*	4193*	5327*
	Desviación standard	1261	2150	2143	1589	2026	1686
O G R U P O	Experimental	Media	2492	6542*	21312*	17311*	3248*
	Desviación standard	1209	1190	5042	4429	1229	1824

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos experimental y testigo a esa cantidad de proteína de los cultivos.

cpm = cuentas por minuto.

GRAFICA 9



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs de gerbos estimulados con un extracto total de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ----> fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) ●—● no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

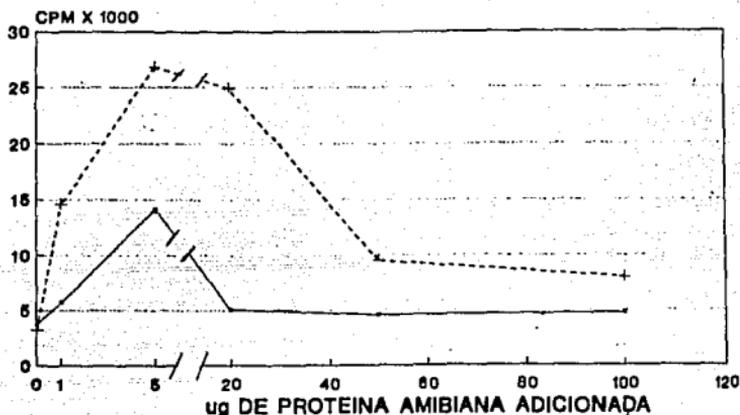
Tabla 11 : Efecto de la cantidad de proteína de un extracto total de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo testigo (7 gerbos) no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100	
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	
G R U P O	Testigo	Media	2700	7580*	14659*	9256*	7963*	7805*
	Desviación standard		880	2500	3292	1730	2646	2415
P R O B A D O	Experimental	Media	2505	12196*	33752*	2884*	12536*	11924*
	Desviación standard		689	3002	5300	4168	3479	3239

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos experimental y testigo a esa cantidad de proteína de los cultivos.

cpm = Cuentas por minuto.

GRAFICA 10



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo de gerbos estimulados con una fracción P-15 de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) ----+ fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) ——— no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

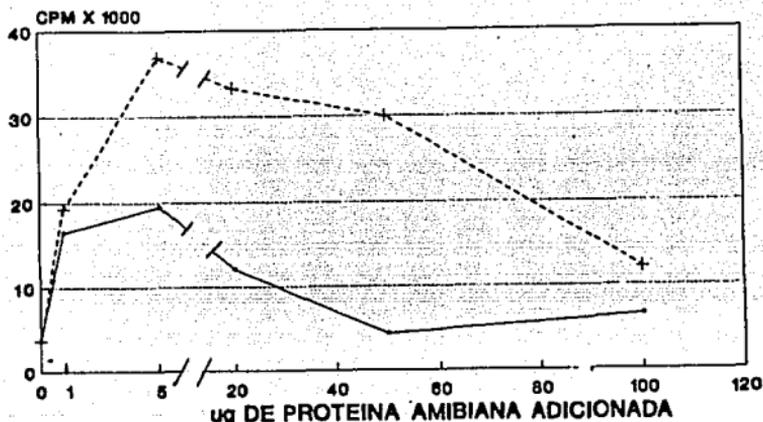
Tabla 17 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno P-15 de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de bazo. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo testigo (7 gerbos) no inoculado. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
G R U	Media	3718	5713*	14130*	5062*	4578*	4759*
	Desviación standard	1307	1354	2085	2015	1154	1674
O	Media	3222	14565*	26851*	24927*	9513*	7996*
	Desviación standard	1221	1725	4190	1864	2607	2651

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos experimental y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.

cpm = Cuentas por minuto.

GRAFICA 11



Comparación de la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs de gerbos estimulados con una fracción P-15 de *E. histolytica*. Un grupo experimental (7 gerbos) +---+ fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* en ciego y un grupo testigo (7 gerbos) x---x no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado y cada punto representa el promedio de 7 animales.

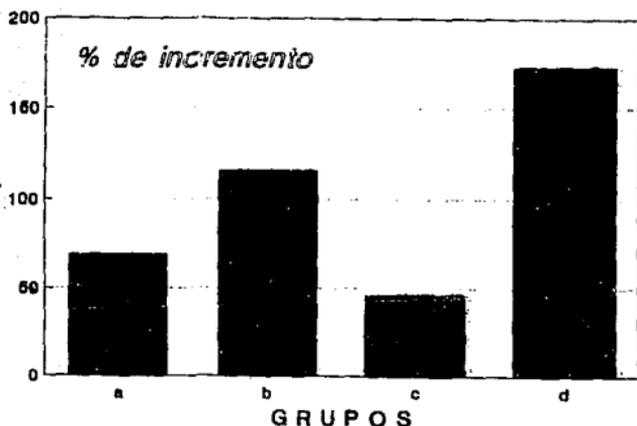
Tabla 13 : Efecto de la cantidad de proteína de un antígeno P-15 de *E. histolytica* sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de linfocitos de GLMs. Se compararon un grupo experimental (7 gerbos) que fueron inoculados 30 días antes con 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* directamente al ciego y un grupo testigo (7 gerbos) no inoculados. Cada gerbo se probó por triplicado.

ug de proteína		0	1	5	20	50	100
		(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
G R U	Media	3632	16477*	19504*	12114*	4312*	6560*
	Desviación standard	1282	3881	2240	2615	1595	1833
P O	Media	3963	19281*	36970*	33271*	29944*	12127*
	Desviación standard	1219	4334	5371	5060	6907	3417

* Indica diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre los grupos experimental y testigo a esa cantidad de proteína en los cultivos.

cpm = Cuentas por minuto.

GRAFICA 12



Aumento de volumen del cojinete plantar de gerbos (medido como porcentaje de incremento) después de la inoculación intradérmica de antígenos ambientales (fracción P-15) cada grupo consta de 10 animales. a) Grupo no infectado y retado con 10 ug de fracción P-15. b) Grupo infectado 10 días antes y retado con 10 ug de fracción P-15. c) Grupo infectado 30 días antes y retado con 10 ug de albumina sérica bovina. d) Grupo infectado 30 días antes y retado con 10 ug de fracción P-15. Todas las infecciones se realizaron intracelalmente con 5×10^5 trofozoitos de *E. histolytica* cepa H41 - IMSS.

Tabla 14: Aumento del volumen del cojinete plantar de gerbos (medido como porcentaje de incremento) después del desafío con un antígeno ambiental (fracción membranar). Cada grupo consta de 10 animales.

Grupo	Inóculo proteína en 100 ul de vol.	% de incremento
a) No infectado	10 ug de FP-15	69.4 32.4
b) Infectado 30 días antes	10 ug de A.S.B.	46.2 20.1
c) Infectado 10 días antes.	10 ug de FP-15	116.3 27.2 ^{a b}
d) Infectado 30 días antes	10 ug de FP-15	173.1 49.6 ^{a b}

Literales como: a y b después de la media indican diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) con la dosis de la cual procede la literal.

FP-15 = Antígeno P-15 de *Entamoeba histolytica*.
A.S.B. = Albumina sérica bovina.

Nota = Las infecciones se realizaron intracelalmente con 5×10^5 trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa H41-IMSS.

DISCUSION

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 o no ser independiente de los órganos linfoides sistémicos.

La amibiasis es un padecimiento que se inicia por la invasión de la mucosa del intestino grueso, por lo que se hace importante resaltar los mecanismos específicos e inespecíficos de defensa que desencadena dicha invasión. La mayoría de los estudios de la amibiasis intestinal han demostrado la producción de anticuerpos en este lugar (Sharma y col., 1978, 1981; Martínez-Cairo y col., 1979). Sin embargo, a pesar de haber demostrado la presencia de linfocitos T en el intestino de mamíferos, no se ha investigado la inducción de inmunidad celular en una amibiasis intestinal. Ante la dificultad de evaluar dicha respuesta en pacientes, solo resulta posible estudiarla en animales de laboratorio.

Los gerbos (Meriones unguiculatus), a diferencia de otros animales de laboratorio son susceptibles a la amibiasis intestinal (Chadee y Meerovitch 1984, 1985). Esto, abre la posibilidad de estudiar el efecto de la infección intestinal sobre la respuesta inmune celular.

En el presente trabajo se desarrolló una colonia de gerbos, los cuales se mantuvieron en cruzamiento cerrado, en virtud de que no existen cepas singénicas de este animal. Para tratar de

homogenizar el grupo solo se utilizaron gerbos machos de 55 a 65 días de edad.

En gerbos no se conoce como se comportan sus linfocitos de GLMs. o de bazo ante la presencia de mitógenos bien conocidos como la Con A (mitógeno típico de linfocitos T).

La transformación blástica inducida por la Con A se ha utilizado en humanos u otros mamíferos para determinar competencia inmune celular (Nakhla and Goggin, 1973; Mc Clain and edelman, 1976; Haneberg y col., 1978; Bach, 1984). Por esto, en principio se determinó la curva dosis-respuesta de linfocitos de GLMs y bazo de gerbo ante diferentes dosis de Con A.

El método de transformación blástoide se seleccionó por ser una de las técnicas más efectivas para valorar dichos efectos mitogénicos sobre linfocitos en general (Ross y col., 1987; Diaz, 1990).

En la gráfica 1 se observan las curvas dosis-respuesta de linfocitos de GLMs y bazo a diferentes cantidades de Con A. Se encontró una máxima estimulación a 5 y 10 μ g, no se mostraron diferencias de respuesta estadísticamente significativas entre los linfocitos de GLMs y bazo. Lo anterior nos permitió usar la Con A a esas dosis como un testigo de funcionalidad y reproductibilidad de nuestra prueba de transformación blástoide en ambas poblaciones de linfocitos.

En el presente estudio se demostró la actividad mitogénica inespecífica de extractos amibianos (E.T. y P-15) sobre linfocitos de bazo y GLMs de gerbos sanos. Tal actividad también se ha demostrado en linfocitos T de humanos sanos

(Diamantstein y col., 1981; Salata y Ravdin, 1985) y en linfocitos de ratones normales (Diamantstein y col., 1980; Diaz, 1990).

La magnitud de la respuesta mitogénica de linfocitos de GLMs y bazo, fue estadísticamente mayor con extractos amibianos (E.T. y P-15) que con Con A a concentraciones similares. Esto, es similar a lo encontrado por Diamantstein y col. en 1981 con linfocitos sanguíneos humanos, ellos sugieren, que la mayor actividad de las proteínas amibianas se debe a su mayor complejidad estructural lo que les daría capacidad para unirse a diferentes sitios de los linfocitos o activar diferentes subpoblaciones de ellos.

Se ha sugerido, que la actividad mitogénica que presentan diferentes extractos de E. histolytica, puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya que activaría en forma policlonal diferentes poblaciones de linfocitos T con diferentes especificidades y evitaría de esta manera el desarrollo de poblaciones específicas (Valadéz y López-Revilla 1986).

Los linfocitos de animales inoculados con E. histolytica, desarrollaron una respuesta clásica a la Con A y una gran respuesta proliferativa a los antígenos amibianos, esta respuesta, fue estadísticamente mayor que la respuesta linfocitaria de los gerbos normales a los mismos antígenos. Aust y Sundquist en 1982, Salata y col. en 1986 encontraron efectos parecidos en pacientes recuperados de absceso hepático amibiano.

La respuesta que presentaron los linfocitos de GLMs y bazo de gerbos inoculados con trofozoítos de E. histolytica 10 días antes,

hacia antígenos ambientales, demuestra inducción de una respuesta primaria a la infección. En estudios previos realizados por nuestro grupo (datos no publicados) para confirmar la infección cecal por E. histolytica en gerbos, sólo se encontraron con trofozoítos en ciego hasta nueve días después de la infección. Sin embargo, nunca observamos lesiones solo colonización.

Otros autores, han detectado trofozoítos en la mucosa del ciego de gerbos hasta doce días después de la inoculación intracecal con E. histolytica (Chadee y Meerovitch, 1984b). Lo anterior, apoya que la respuesta que presentan los linfocitos de gerbos infectados 30 días antes, es debida a la memoria inmunológica que se desarrolla durante la amebiasis intestinal en nuestro modelo experimental. Estadísticamente la respuesta primaria fue menor que la respuesta de memoria.

El antígeno que mayor respuesta tuvo sobre los linfocitos fue la fracción membranal (P-15), debido probablemente a que los antígenos de E. histolytica son más abundantes e inmunogénicos en membranas externas e internas como fue sugerido por Martínez-Palomo en 1982 y por Aust-Kettis y Utter en 1984.

Cuando se presenta una infección por E. histolytica en ciego, se realiza el primer contacto de este parásito con el sistema inmune. Los linfocitos intestinales estimulados migran posteriormente a otros centros de actividad inmunológica, principalmente a GLMs y en menor grado a bazo. Lo anterior explicaría la mayor respuesta de los linfocitos de GLMs en comparación con los de bazo in vitro.

Varios factores determinan el tipo de respuesta inmunitaria que se

genera ante la presencia de un antígeno a nivel intestinal, uno de los más importantes es la integridad de la mucosa. Ante retos enterales con algunos antígenos, se presentan respuestas serológicas locales y sistémicas de diferente magnitud, según se encuentre la integridad de la mucosa. Así, a mayor daño de la mucosa se presentan respuestas mayores (Lyscom and Brueton, 1983). El fenómeno anterior no sólo podría tener efecto sobre la respuesta sérica sino también sobre la respuesta inmune celular.

Los trofozoítos de E. histolytica en gerbos infectados intracecalmente lesionan la pared intestinal lo que permitiría que algunos antígenos amebianos estimularán la respuesta inmune local y otros pasaran a circulación estimulando una respuesta celular sistémica.

Chadee y Meerovitch en 1985 describieron cambios histológicos en GLMs y bazo de gerbos infectados cecalmente con E. histolytica. Sus estudios mostraron hiperplasia de folículos linfáticos de pared cecal después de la infección. Los GLMs aumentaron de tamaño y presentaban hiperplasia de folículos linfoides, los cambios en bazo fueron menores pero encontraron hiperplasia de folículos. El trabajo anterior coincide con nuestras observaciones (mayor activación de linfocitos de GLMs que los de bazo) . Además, observaron una gran migración de linfocitos de GLMs a pared cecal, lo que podría controlar la infección en este lugar.

Vinayak y col. en 1984, encontraron que linfocitos estimulados obtenidos de cobayos inmunizados con un extracto crudo de E.

histolytica eran capaces de destruir trofozoítos in vitro. La respuesta de reconocimiento de linfocitos de GLMs que nosotros encontramos, la gran migración de linfocitos de GLMs hacia la pared cecal y la capacidad demostrada de linfocitos sensibilizados para lisar trofozoítos, podrían ser los factores que controlaran la amibiasis cecal en nuestro modelo experimental.

A pesar que los linfocitos de bazo respondieron con menor intensidad que los linfocitos del GLMs de los mismos animales infectados, respondieron cualitativamente en un nivel mayor que los linfocitos de bazo de los animales no infectados en los dos tipos de antígenos, lo que sugirió que no solo se montaba una respuesta celular local contra E. histolytica sino también una respuesta celular sistémica. Por esto, se trató de demostrar hipersensibilidad retardada cutánea por medio de intradermorreacciones.

Las intradermorreacciones (IDR) son una forma de medir la respuesta inmune celular in vivo, esta ha sido utilizada para medir hipersensibilidad retardada en la amibiasis (Lunde y col., 1969; Kretschmer y col., 1972; Ganguly y col., 1979). Por esto, para confirmar la activación específica de linfocitos a los antígenos amibianos en nuestro modelo, decidimos utilizar esta técnica.

La inoculación de un antígeno P-15 en el cojinete plantar de gerbos infectados cecalmente con trofozoítos de E. histolytica, provocó un aumento de volumen en el cojinete plantar estadísticamente mayor que el producido por la inoculación del mismo antígeno a la misma dosis en animales no infectados

o en animales infectados pero inoculados intradérmicamente con una proteína diferente (albumina sérica bovina). Lo anterior, demuestra que la infección cecal en gerbos con E. histolytica desarrolla en forma específica una respuesta inmune celular de tipo sistémico. Lo anterior, no es de extrañar, si tomamos en cuenta que en humanos, una invasión tisular del colon puede iniciar la producción de anticuerpos circulantes (Harries, 1982; Trissl, 1982). Además, la incidencia de reacciones de hipersensibilidad retardada es alta en sujetos sanos (20 %) y en pacientes con rectocolitis amibiana (47.1 %) en áreas en que la amibiasis es endémica (Kretschmer y col., 1972).

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden servir de base para la apertura de nuevas líneas de investigación; ya que en el presente trabajo se utilizaron poblaciones totales de linfocitos y sería interesante definir que subpoblaciones de linfocitos son sensibilizados después de la infección cecal con E. histolytica en los gerbos, además, falta investigar la duración de la memoria inmunológica. Así como se hace necesario purificar antígenos para poder definir que moléculas están involucradas en este fenómeno.

Futuros trabajos indicarán que tan válido puede ser extrapolar al humano los resultados obtenidos de este modelo, a pesar de la similitud que guardan ambos tipos de infección.

CONCLUSIONES

- 1.- Se logró adaptar y mantener una colonia homogénea de gerbos en bioterio.
- 2.- Se demostró que linfocitos de bazo y GLMs de gerbos responden a un mitógeno típico de linfocitos T (Con A).
- 3.- El extracto total y la fracción membranal (P-15) de Entamoeba histolytica presentaron actividad mitogénica sobre linfocitos de GLMs y bazo de gerbos normales.
- 4.- La inoculación intracecal de trofozoitos de E. histolytica en gerbos, provoca el reconocimiento específico al incubar linfocitos de GLMs y bazo de estos animales con proteínas amibianas (utilizando una microtecnica de transformación blastoide).
- 5.- El grado de reconocimiento específico de las proteínas amibianas fue mayor en los linfocitos de GLMs. (respuesta inmune local) que en los de bazo (respuesta inmune sistémica).
- 6.- La inoculación intracecal de trofozoitos de E. histolytica en gerbos provocó la activación de una respuesta inmunitaria celular sistémica, medida por pruebas de intradermorreacción.

APENDICE DE 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 con Hidróxido de sodio o con ácido clorhídrico.
Se esteriliza a 15 lbs por 15 mín., se verifica esterilidad y se almacena a 4 °C.

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

Cloruro de sodio		8.5 g.
Agua destilada	cpb	1000 ml.

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

Albúmina sérica bovina 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 ácido y se titula con NaOH y fenolftaleína como indicador para diluirlo a 1N para la prueba. La dilución es cercana a 1:2.

8.- RPMI-1640.

Para lavar células:

RPMI-1640 (GIBCO, EUA).	10.39	g.
Bicarbonato de sodio (J. T. Baker, Méx).	2.00	g.
HEPES (SIGMA, EUA).	2.08	g.
Penicilina	100.0	UI/ml.
Estreptomícina	100.0	UI/ml.
Agua destilada y desionizada cbp	1000.0	ml.

Para medio de cultivo completo:

Lo anterior y

Suero fetal de bovino (GIBCO, EUA)	5 %
2-Mercaptoetanol	5×10^{-5} M.

Tanto el RPMI-1640 para lavado como para cultivo se esterilizan por filtración. Se verifica esterilidad y se almacena a -20°C .

10 Timidina tritiada (^3H - Tdr).

NET-027 THYMIDINE, (METHYL- H)

New England Nuclear

Actividad específica 6.7 Ci/mmol.

Concentración 1.0 mCi/ml.

11.- Acido tricloroacético al 5 % (p/v).

Acido tricloroacético (SIGMA) 5.0 g.

Agua destilada cbp 100.0 ml.

12.- Acido tricloroacético al 10 % (p/v).

Acido tricloroacético (SIGMA) 10.0 g.

Agua destilada cbp 100.0 ml.

13.- Metanol al 70 % (v/v).

Metanol 70.0 ml.

Agua destilada 30.0 ml.

- 14.- Líquido de centelleo
Comercialmente como Insta-Gel (PACKARD).
- 15.- Concanavalina A (Con A) 5 %.
Concanavalina A, tipo IV-S (SIGMA) 1.0 g.
RPMI para cultivo 5.0 g.
Ya hidratado se almacena en alícuatas a -20°C .
- 16.- Concanavalina A (Con A) 10 %.
Concanavalina A, tipo IV-S (SIGMA) 1.0 g.
RPMI para cultivo 10.0 ml.
Ya hidratado se almacena en alícuatas a -20°C .
- 17.- Cloruro de Benzalconio al 1 %.
Comercialmente como benzal.
- 18.- Pentobarbital sódico al 5 %.
Comercialmente como Anestésal (SMITH-KLINE).
- 19.- Metronidazol 25 mg por ml.
Comercialmente como Flagyl (RHONE-POULENC).
- 20.- Catgut 000 (DAVIS-GECK).
- 21.- Tiomersal
Comercialmente como Merthiolate, Tintura 1:1000 (LILLY).

BIBLIOGRAFIA

- Acosta A.G., Barranco C., Isibasi A., Campos R. y Kumate J.: Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti~~amiba~~ en bilis de ratas inmunizadas con trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivadas en medio axénico. Arch. Invest. Med. Mex.); 2; (1982).
- Acosta A.G., Cote V., Isibasi A. y Kumate J.: Anticuerpos anti-Entamoeba histolytica de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. Inmunol. VI.,4; 24-27 (1985).
- Acosta A.G., Rocha L.M., Reyes M.R., Cote V. and Santos J.I.: Antiamoebic properties of human calostrum. Recent advances in mucosal. Immunology, parte B, (Plenum Publishing) Corporation), (1987).
- Aust-Kettis A. and Sundqvist K.G.: Activation of lymphocytes from healthy donors and patients with amebiasis by extracts of Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex) 13 (Suppl 3): 245, (1982).
- Bazin H.: The secretory antibody system. In: Immunological aspects of the liver and gastrointestinal Tract. Ferguson A. and MacSween R.N. (Eds) Lancaster. 147-165 (1976).
- Biagi F.F., Robledo I., Servin H. and Marván G.: Influence of some steroids in the experimental production of amebic hepatic abscess. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 318-320 (1963).
- Bray R.S. and Harris G.G.: Cellular immune responses to amebic liver abscess in guinea-pig. Clin. Exp. Immunol. 29:147-151 (1977)
- Calderón J.: The role of complement in host defense against Entamoeba histolytica. In: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin J.I. (Ed). John Wiley & Sons, N.Y., 147-165 (1988).
- Calderón J., Muñoz M.L. and Acosta H.M.: Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. J. Exp. Med., 151: 184-193 (1980).
- Capín R., Capín N.R., Carmona M. and Ortiz-Ortiz L.: Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Med. (Mex.) 11 (Suppl. 1), 173-180 (1980a).
- Capín R., Capín N.R., Carmona M. and Ortiz-Ortiz L.: Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Med. (Mex.) 11 (Suppl.1), 173-180 (1980b).

- Carrera G.M. and Faust E.C.: Susceptibility of the guinea pig to Entamoeba histolytica of human origin. Am J. Trop. Med. 29: 647-667 (1949).
- Chadee K. and Meerovitch E.: Entamoeba histolytica: Antibody responses and lymphoreticular changes in gerbils (Meriones unguiculatus) in response to experimental liver abscess and amebic extract injection. Z. Parasitenkd 70: 781 (1984a).
- Chadee K., Smith J.M. and Meerovitch E.: Entamoeba histolytica: Electrophoretic isoenzyme patterns of strain and their virulence in the cecum of gerbils (Meriones unguiculatus). Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 : 870, (1985c).
- Chávez A., Segura M., Diaz J. and Sepúlveda J.: Actividad eritrofágica de los trofozoitos de Entamoeba histolytica sobre los hematies de diferentes especies de animales. Arch. Invest. Med. (Mex.) 5 (Suppl. 2), 365-372 (1974).
- Diamantstein T., Klos M, Gold D and Hahn H: Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. I. Mitogenicity of Entamoeba extracts for human peripheral T lymphocytes. J. Immunol., 126: 2084-2086 (1981).
- Diamond L.S., Phillips B.P. and Bartgis I.L.: The clawed jird (Meriones unguiculatus) as an experimental animal for the study of hepatic amoebiasis. Arch. Invest. Med. (Mex.), 5 (Suppl. 2), 465-470 (1974).
- Diamond L., Tanimoto W.M. and Martínez-Palomo A.: Production of cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.) 9 (Suppl. 1), 223-228 (1978).
- Eaton R.D.P., Meerovitch E. and Costerton J.W.: A surface-active lysosome in Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 678-680 (1969).
- Ganguly N.K., Mahajan R.C. and Sharma S.: Isolation of antigen fraction responsible for delayed hypersensitivity in amoebiasis. Ind. J. Med. Res. 70, 17 (1979).
- Ganguly N.K., Mahajan R.C., Sharma S., Chandanani R.E., Gupta A.K., Datta D.V. and Chnuttani P.N.: Immunoglobulin and complement levels in cases of invasive amoebiasis. Ind. J. Med. Res. 67: 221 (1978).
- Ghadirian E. and Meerovitch E.: Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amebic liver abscess in hamster. Parasite Immunol 3: 329 (1981).
- Ghadirian E. and Meerovitch E.: Macrophage requirement for host defence against experimental hepatic amoebiasis in hamster. Parasite Immunol. 4: 219 (1982).

- Gold D. and Kagan I.: Susceptibility of various strains of mice to Entamoeba histolytica. J. Parasitol 64: 937 (1978).
- Gonzalez R.A. and Martínez-Palomo A.: Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Protozool. 30: 692-700 (1983).
- Grundt M.S., Cartwright T.L., Lundin L., Thors C. and Hult G.: Antibodies against Entamoeba histolytica in human milk and serum in Kenya. J. Clin. Microbiol. 17: 753-758 (1983).
- Guerrero A.M., Sepúlveda B., González S.M. y Ramírez E.M.E.: Adición de complemento al suero humano hiperinmune inactivado. Su efecto sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.) 3 (Suppl. 2), 325-334 (1972).
- Healy G.R., Kagan I.G. and Gleason N.N.: Use of the indirect hemagglutination test in some studies of seroepidemiology of amebiasis in the western hemisphere. Health. Lab. Sci. 7: 109-116 (1970).
- Healy G.R. and Gleason N.H.: Studies on the pathogenicity of various strains of Entamoeba histolytica after prolonged cultivation with observations of strain differences in the rats employed. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 294 (1966).
- Jones W.R.: The experimental infection of rats with Entamoeba histolytica; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Ann. Trop. Med. Parasitol. 40: 130-140 (1946).
- Joyce M.P. and Ravdin J.I.: Antigens of Entamoeba histolytica recognized by immune sera from liver abscess patients. Clin. Res. 34: 22A (1986).
- Juniper K., Worell C.L., Minshew M.C., Roth L.S., Cypert H. and Lloyd R.E.: Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 157 (1972).
- Jurumilinta R. and Kradolfer F: The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. Ann Trop. Med. Parasitol. 58: 375-381 (1964).
- Kagan I.G.: The immunology of amebiasis. Arch. Invest. Med. (Mex), 4 (Suppl. 1) 261-272 (1973).
- Krestschmer R.R.: Inmunología de la amebiasis. En: Amebiasis. Ed. Martínez-Palomo A. (Ed) Panamericana, 78-133 (1986).
- Krupp I.M.: Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 57 (1970).
- Krupp I.M.: Comparative study of the antibody response in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 421 (1971).

- Lunde M.N., Chaparas S.D. and Diamond L.S.: Skin test potency in guinea pigs of Entamoeba histolytica antigens (histolysin) prepared from axenically cultivated amoebae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 455 (1969).
- Martinez C.S., Gorab A., Muñoz O. y Reyes M.: Coproanticuerpos en amebiasis intestinal invasora. Arch. Invest. Med. (Mex.) 10: 121-126 (1979).
- Mattern C.F.T. and Keister D.B.: Experimental amebiasis. I. Pathogenicity of axenically culture Entamoeba histolytica in the brain of the newborn mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 393: (1977).
- Meerovitch E., and Chadee K.: In vivo models for pathogenicity in amebiasis. In: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin J.I. (ed). John Wiley & Sons, N.Y., 147-165 (1988).
- Neal R.A.: Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strain of Entamoeba histolytica in rats. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 44, 339-352 (1951).
- Neal R.A.: Experimental amoebiasis and the development of anti-amoebic compounds. Parasitology. 86: 175-191 (1983).
- Norman L., Gold D. and Kagan I.G.: The serologic response of hamster to experiemntal liver inoculations with Entamoeba histolytica as measured by indirect hemagglutination test and enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 198 (1979).
- Ortiz-Ortiz L., Garmilla C., Tanimoto W.M. y Zamacona R.G.: Hiper-sensibilidad celular en amebiasis. I. Reacciones en hamster inoculados con Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.) 4 (Suppl. 1), 191-196 (1973).
- Ortiz-Ortiz L., Sepulveda B. and Chávez A.: Nuevos estudios acerca de la acción de sueros humanos normales e inmunes sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.), 5 (Suppl. 2), 337 (1974).
- Ortiz-Ortiz L., Zamacona G., Sepúlveda B. and Capín R.N.: Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 127-134 (1975).
- Patterson M., Healy G.H. and Shabot J.M.: Serologic testing for amoebiasis. Gastroenterology. 78: 136 (1980).
- Pérez-Tamayo R.: Pathology of the amebiasis. In: Amebiasis: Martínez-Palomo A. (Ed). Elsevier Science Publishers Amsterdam. The Netherlands. 42-78 (1986).
- Pittman F.E., El-Hashimi W.K. and Pittman J.C.: Studies of human amebiasis II. Light and electron microscopic observations of

- colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. Gastroenterology. 65: 558-603 (1973).
- Proctor E.M. and Gregory M.A.: The observation of a surface active lysosome in the Trophozoites of Entamoeba histolytica from the human colon. Ann. Trop. Med. Parasitol. 66,339-342 (1972)
- Ravdin J.I., Croft B.Y. and Guerrant R.L.: Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 377 (1980).
- Ravdin J.I., Sperelakis N. and Guerrant R.L.: Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 146: 335-340 (1982).
- Reed S.L., Sargeant P.G. and Braude A.I.: Resistance to lysis by human serum of pathogenic E. histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77;248-253 (1983).
- Reinertson J.W. and Thompson P.E.; Experimental amebic hepatic in hamsters. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 : 518 (1951).
- Rondanelli E.G., Carosi G., Filice G.R. and Carneri I; Observations of surface active lysosomes and other organelles in monoaxenically cultivated trophozoites of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. Int. J. Parasitol. 4, 433-435 (1974).
- Ross G.W. and Knight R.: Dietary factors affecting the pathogenicity of Entamoeba histolytica in rats. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67: 560 (1973).
- Sepúlveda B.: Immunology of amebiasis. In: Molecules. Larralde C., Willm K., Ortiz-Ortiz L. and Sela M. Ro. Academic Press, New York. 163: (1977).
- Sher A. and Ahmad S.: Detection and characterization of humoral antibodies from amebic immune sera. Ind. J. Exp. Biol. 15: 1083 (1977).
- Smith J.M., Chadee K. and Meerovitch E.: Failure to establish experimental Entamoeba histolytica infection in mongolian gerbils (Meriones unguiculatus) naturally infected with Entamoeba muris. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 875-876 (1985).
- Sepúlveda B., Chávez A., Iturbe A.I. and Ortiz-Ortiz L.: Efecto de la gammaglobulina inmune antiamebiana sobre el trofozoito de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.) 4 (Suppl. 1), 79-86 (1973).
- Sharma P., Krishna-Prasad B.N. and Dutta G.P.: Coproantibody in intestinal amoebiasis using axenic Entamoeba histolytica antigen. Indian J. Med. Res. 74: 215-218 (1978).
- Sharma P., Das P. and Dutta G.P.: Use glutaraldehyde-treated sheep erythrocytes in indirect haemagglutination test for

amoebic coproantibody. Indian J. Med. Res. 74; 215-218 (1981)

Stemberger H: Zytolytisch immunreaktionen in vitro gegen trophoziten von Entamoeba histolytica. Immunol. Infect. 6: 71 (1978).

Stokes C.R., Soothill J.F. and Turner M.W.: Immune exclusion is a function of IgA. Nature 255: 745-746 (1975).

Thompson P.E.: Experimental amebiasis and chemotherapy. Arch. Invest. Med. (Mex.) 2 (Suppl 1) 245-254 (1971).

Thompson P.E., Graedels S.K., Schneider C.R., Stucki W.P. and Gordon R.M.: Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of Entamoeba histolytica. Bull WHO 39: 349 (1975).

Tomasi T.B. and Bienenstock J.: The significance of secretory immunoglobulins. Adv. Immunol. 9: 1-96 (1968).

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

Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya-Velazquez F. and Martínez-Palomo A.: Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117, 81-91 (1984).

Tsutsumi V.: Pathology of experimental amebiasis. In: Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J.I. (ed) John Wiley & Sons N.Y. 147-165 (1988).

Westphal A.: Die intrazakale der maus mit Entamoeba histolytica. Zfschr F.Tropenmed Parasitol. 21: 220 (1970).