

72
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ABSORCION INTESTINAL DE ANTIGENO DE Entamoeba histolytica EN RATONES Balb/c

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ENRIQUE GONZALEZ RIVAS



México, D.



Septiembre de 1994

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

....." Primeramente

siendo irracionales como las bestias, di a los hombres
juicio, les proveí de una mente.....

En un principio, teniendo ojos, veían defectuosamente
y pudiendo oír, no prestaban oído, sino que se
agolpaban

como fantasmas en sueños, al indeciso relato de su
pasado confuso.."

(Prometeo encadenado) ESQUILO

* D E D I C A T O R I A *

A mis padres porque hicieron posible esta realidad, aquí impresa, por la confianza y apoyo que han brindado a lo largo de mi trayectoria en la vida.

De manera especial a todos mis hermanos y con inmenso amor para la mujer que comparte mi existencia.

A todos ellos mi más profundo agradecimiento.

* A G R A D E C I M I E N T O S *

DE MANERA ESPECIAL:

A la Dra. CECILIA XIMENEZ GARCIA

M en C. FERNANDO RAMOS REYES

POR SU ACERTADA DIRECCION DE ESTE TRABAJO Y SU INVALUABLE AMISTAD.

A LOS DOCTORES:

RUY PEREZ TAMAYO

EMMA ISABEL MELENDRO

POR SU VALIOSO APOYO Y ACERTADOS COMENTARIOS.

AL EXELENTE JURADO:

Dra. CECILIA XIMENEZ GARCIA

M. en C. LUISA ALBA LOIS

M. en I.B.B. GABRIELA GARCIA PEREZ

Dra. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

Q.F.B. FERNANDO RAMOS REYES

POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS.

A TODOS LOS COMPAÑEROS DE TRABAJO Y EN GENERAL AL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA EXPERIMENTAL.

POR SOPORTARME TODO ESTE TIEMPO, MI MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO.

* I N D I C E *

	Paginas
RESUMEN _____	1
I.- INTRODUCCION _____	3
II.- ANTECEDENTES _____	8
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	20
IV.- OBJETIVOS _____	21
V.- MATERIAL Y METODOS _____	22
VI.- RESULTADOS _____	30
VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES _____	45
VII.- REFERENCIAS _____	52

R E S U M E N.

En la amibiasis, se considera que solo hay producción de anticuerpos circulantes cuando la infección es invasora, sin embargo en México se presenta un alto índice de seropositividad en individuos aparentemente sanos o portadores; estos resultados podrían explicarse en el caso de una posible invasión asintomática o por la estimulación del aparato inmunológico sistémico por antígenos liberados por las amibas lumbales. Por otro lado existen evidencias experimentales de que la administración por vía oral de trofozoitos amibianos puede inducir respuestas sistémicas.

Para determinar el mecanismo de inducción de dicha respuesta, usamos un modelo animal para estudiar la absorción intestinal de antígenos amibianos. Ratonos Balb/c fueron inoculados oralmente con trofozoitos de Entamoeba histolytica radiomarcados metabólicamente y sacrificados a diferentes tiempos, siguiendo la marca en diferentes tejidos y órganos; al mismo tiempo se hizo un estudio histopatológico del intestino de estos ratones para detectar lesiones de la mucosa imputables a la acción de E. histolytica. La marca fue detectada en intestino, hígado, y suero y no se observaron lesiones intestinales.

Posteriormente con una técnica de ELISA se detectó la presencia de antígeno amibiano en circulación de vena porta o axilar de otro grupo de ratones, después de haberse inoculado con trofozoitos amibianos.

Los resultados obtenidos sugieren que la absorción de antígeno ambiental a través de la mucosa intestinal es posible aún en ausencia de lesiones intestinales, y que éste puede ser un recurso alterno para la inducción de una respuesta sistémica en la amibiasis luminal.

I.-I N T R O D U C C I O N .

La amibiasis es la infección causada en el humano por el protozoo Entamoeba histolytica; la infección es de distribución mundial sin embargo afecta principalmente a países en desarrollo, entre ellos México, probablemente porque la transmisión y la invasividad varían bajo diversas condiciones ecológicas y sociales (Walsh, 1986a).

En estos países, el parásito infecta a más del 40 % de la población. En la mayoría de los individuos, el parásito vive como comensal y solo un pequeño porcentaje (1-10%) de los individuos infectados desarrollan amibiasis invasora. A pesar de que los datos epidemiológicos son aún muy limitados, se estima en forma razonable que la amibiasis ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte por parásitos y es una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial (Walsh, 1986b).

El resultado de la interacción del parásito con el huésped varía desde una infección asintomática, hasta una enfermedad intestinal invasora que puede diseminarse a otros órganos. Se considera que del 80 al 99% de las infecciones en humanos con E. histolytica son asintomáticas; estas infecciones usualmente se detectan al practicar un examen de rutina de heces por la excreción de quistes o bien en un examen serológico (Meerovitch y col., 1978).

En la infección intestinal invasora ocurre invasión de la mucosa intestinal, rectosigmoides y/o apéndice cecal; las lesiones ocasionadas por el parásito se localizan a través de las diferentes estructuras de la mucosa intestinal en donde suelen aparecer

úlceras en forma de "botón de camisa" las cuales pueden identificarse por examen rectosigmoidoscópico al inicio de la infección, durante el cuadro de diarrea simple, diarrea sanguinolenta ó disentería (Pérez-Tamayo, 1989).

En ciertas regiones tales como México y Venezuela, del 2 al 15% de los casos de diarrea aguda en niños que requieren hospitalización, se asocian con una infección por E. histolytica (Gutiérrez-Trujillo, 1980).

Las formas potencialmente mortales de amibiasis invasora son: la colitis fulminante, el ameboma del colon y la tifloepididimitis amibiana aunque éstas son 10 veces menos frecuentes que el absceso hepático amibiano; sin embargo su grado de mortalidad es más alto, fluctuando entre 20 y 70%, mientras que la mortalidad por absceso hepático es cercano al 20% (Sepúlveda, 1982).

La amibiasis extraintestinal puede desarrollarse junto con la disentería amibiana y el momento de su aparición puede variar desde unos cuantos meses hasta años después de iniciada la disentería. El hígado es el órgano al que más comunmente se disemina la infección; en este caso, los trofozoítos de E. histolytica alcanzan el parénquima hepático a través del sistema porta, produciendo una o más áreas grandes de necrosis o "abscesos". El diagnóstico se realiza comunmente en base a la sintomatología que refiere el paciente, apoyada en una cuenta alta de leucocitos y existencia de lesiones ocupantes en hígado demostradas por radiografía de tórax, gammagrafía, ultrasonido o tomografía axial computarizada (Cuarón y col., 1972). Este padecimiento es por lo menos 10 veces más

frecuente en adultos que en niños y la proporción de afección hombre /mujer es de 3:1. (Gutiérrez-Trujillo, y col., 1970). En algunos casos, puede presentarse una extensión directa o metastásica al espacio pleural o pericárdico o bien a sitios más distantes como el cerebro (Flores-Barroeta, y col., 1970).

Biología de E. histolytica.

Este parásito se considera uno de los organismos eucarióticos más simples pero a la vez muy complejo. Presenta dos formas biológicas; la forma activa o trofozoíto, y la forma de resistencia o quística. Los trofozoítos tienen un tamaño de 10 a 40 μm , son anaerobios facultativos, su superficie celular es irregular y presentan muchas vacuolas lisosomales fagocíticas, pseudópodos, prolongaciones filiformes que las unen al substrato y un uroide o extremo caudal, además de una disposición citoplásmica sencilla ya que carecen de citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplásmicos; tampoco presentan mitocondrias. El trofozoíto contiene un solo núcleo de 3 a 5 μm con una fina cromatina periférica y un nucleolo central. El citoplasma consiste de una zona clara (ectoplasma) y una zona granular (endoplasma) que contiene numerosas vacuolas. Los trofozoítos son capaces de consumir oxígeno apesar de la ausencia de mitocondrias, ya que presentan enzimas glucolíticas inusuales que se habían encontrado solamente en ciertas bacterias. Poseen una membrana de aproximadamente 10 nm de espesor, la cual está rodeada por un glucocálix externo. La mayor parte de los componentes de esta cubierta son liberados al medio en forma de microexudado, lo que

indica que el parásito posee antígenos solubles (Martínez -Palomo, 1982).

Los trofozoítos no son importantes en la transmisión puesto que son extremadamente sensibles al ambiente y mueren rápidamente ante cualquier cambio en el mismo.

La etapa quística de este protozoario es la forma infectiva para el hombre, ya que es altamente resistente a la destrucción por los factores ambientales y puede permanecer viable por muchas semanas en presencia de humedad y se caracteriza por ser tetranucleado (Healy, 1986).

Cuando los quistes son ingeridos por una persona, ya sea en alimentos o agua contaminada y llegan al colon, se desenquistan, surgiendo de cada quiste una sola amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez por división citoplásmica 8 trofozoítos uninucleados. Estos trofozoítos son móviles y se adhieren a la superficie del intestino, principalmente en las áreas de estasis del colon y proliferan por división binaria. Los trofozoítos arrastrados en la materia fecal, son estimulados a enquistarse (Dobell, 1928).

Las amibas no requieren huéspedes intermediarios y al parecer no se reconocen reservorios animales en la naturaleza. Los únicos reservorios para la infección del hombre son los huéspedes humanos asintomáticos o portadores, los cuales diariamente excretan al rededor de 15 millones de quistes que accidentalmente llegan a los alimentos o son ingeridos cuando las condiciones de higiene son inadecuadas (Healy, 1986).

Dos de los aspectos más interesantes en la biología de este parásito son, la inexplicable variabilidad en su potencial patogénico y la restricción por áreas geográficas de la forma invasora de la amibiasis. Los expertos en amibiasis desde hace ya varias décadas, han tratado de explicar el comportamiento peculiar de E.histolytica como comensal (forma más frecuente) y como invasor, en base a 3 hipótesis diferentes: 1) E.histolytica es una sola especie que siempre produce ulceración intestinal, lo cual puede o no dar manifestaciones clínicas; 2) E. histolytica comprende a dos especies diferentes de amibas que morfológicamente son similares y solo una de las cuales es patógena y 3) la especie está compuesta por un número desconocido de diferentes cepas que pueden actuar como comensales en intestino o como patógenos que producen ulceración en intestino grueso y dan lugar a síntomas (amibiasis invasora) (Orozco y col., 1988).

Para determinar la patogenicidad de una cepa se han evaluado diversas actividades del trofozoíto, como la capacidad de formar abscesos en hígado de animales (Lushbaugh y col., 1974), la habilidad eritrofagocítica (Trissl y col., 1978) y la capacidad de los trofozoítos ya sea íntegros o sus extractos para destruir monocapas de células en cultivo (Mattern y col., 1978). También se ha visto que las amibas patógenas se aglutinan en un mayor grado con Concanavalina-A, la actividad proteolítica es mayor en las cepas patógenas que en las no patógenas (Gadasi y Kessler, 1983). Asimismo, para diferenciar estas cepas se ha utilizado el estudio del patrón isoenzimático; hasta la fecha se han identificado un

total de 23 zimodemos diferentes para cepas de E. histolytica aisladas de intestino de humanos de diferentes áreas del mundo. Las amibas recuperadas de casos de amibiasis invasora se agrupan en 10 patrones isoenzimáticos diferentes (II, IIa, VI, VII, XI-XIV, XIX, y XX); éstos están definidos por la presencia de una banda beta y la ausencia de una banda alfa en la enzima fosfoglucomutasa y por una banda de corrimiento rápido en la enzima hexocinasa; todos los demás zimodemos se encuentran en las amibas aisladas de casos de portadores (Sargeant, 1988., Meza, y col., 1986). Estos hallazgos parecen apoyar la hipótesis de Brumpt (1925) de que la amibiasis invasora, es causada por una especie de amiba que biológicamente es distinta de las amibas no patógenas. Sin embargo las enzimas estudiadas participan en la vía glicolítica del parásito, por lo cual no parecen tener un papel definido en la patogenicidad, además de que no se ha podido establecer una relación clara entre la composición antigénica de E. histolytica y su patogenicidad. Es evidente que se requieren más estudios en esta área y aunque ya se han realizado algunos en este sentido y han demostrado que las cepas de portadores difieren de las cepas invasoras, no hay aún suficientes evidencias que permita separarlas como especies diferentes. Por otro lado la expresión de la patogenicidad parece depender de factores tanto del parásito como del huésped.

II.- A N T E C E D E N T E S.

Inmunología de la amibiasis.

Un aspecto de importancia en el control de la amibiasis es el estudio de la respuesta inmune que se activa en el individuo

infectado. La inducción de inmunidad protectora funcional en la amibiasis humana aún no se ha demostrado satisfactoriamente; sin embargo, se sabe que una vez invadida la mucosa aparecen respuestas inmunes celulares y humorales bien definidas. Estas pueden inicialmente comprender exclusivamente las células inflamatorias que se acumulan en el sitio de la invasión, sobre todo aquellas que se encuentran en los bordes de las úlceras amibianas, donde ocurrirá el primer contacto real entre antígenos amibianos y las células de la red inmunológica (Trissl, 1982). Se considera que los antígenos de E. histolytica, en especial los localizados en la superficie celular, pudieran ser los más importantes para la inducción de una respuesta inmune ya que serían éstos los primeros que se pusieran en contacto con las células del sistema inmune del huésped. Estos antígenos de superficie parecen contener carbohidratos ya que son capaces de unirse a lectinas como la Concanavalina A (Con-A) (Kobiler y Mirelman, 1981). Sin embargo el papel de dichos antígenos de superficie no es muy clara en la inducción de las respuestas inmunes del huésped, ya que se ha observado que el número de antígenos de E. histolytica en diferentes fracciones es mayor que el nivel de antigenicidad y por otro lado parece ser que la inmunogenicidad en fracciones citoplásmicas es mayor que en las fracciones de membrana (Boonpucknanig y col., 1967, Sepúlveda, 1980, Sawhney y col., 1980).

Respuesta Inmune Celular en la Amibiasis. Estudios de Stern y col., (1984) usando un modelo experimental de ratones desnudos a

los que se indujo amibiasis hepática, han resaltado la importancia del macrófago como una célula efectora crítica del huésped. Estas observaciones "in vivo" indican que los mecanismos inmunes mediados por células parecen ser responsables de la limitación de la diseminación por metástasis o por contigüidad en la amibiasis hepática así como de la inducción de protección contra su recurrencia.

Guerrero y col., (1976) demostraron que los linfocitos de pacientes recuperados de amibiasis hepática son citotóxicos para los trofozoítos de E. histolytica.

Salata y col., (1984) observaron también la muerte de trofozoítos amibianos por monocitos activados con Con-A o con fitohemaglutinina (PHA); al añadir suero inmune no se potenció la muerte de las amibas, lo cual parece indicar que es un proceso independiente de anticuerpos. Estudios realizados con microscopía, demostraron la necesidad de contacto trofozoíto-célula blanco para que la muerte celular ocurra.

Así mismo se ha comprobado la participación de las células T al demostrar que un extracto acuoso de E. histolytica puede estimular "in vitro" a linfocitos de sangre periférica de enfermos con absceso hepático amibiano; estos linfocitos T sensibilizados también son capaces de producir linfocinas "in vitro" e inducen actividad amebicida en macrófagos (Diamantstein, y col., 1981).

En 1987 Salata y col., estudiaron el papel del interferón-gama en la activación de macrófagos derivados de monocitos "in vitro", sugiriendo que los macrófagos activados son los responsables de la

muerte de trofozoítos de amibas patógenas. Los anticuerpos contra INF-gama inhiben en gran medida, el efecto citolítico de los macrófagos sobre los trofozoítos aunque no completamente.

Los eventos en la secuencia de la respuesta inmune sugieren que la inmunidad celular se desarrolla después de que ha ocurrido la invasión. Esto puede indicar el papel de la respuesta inmune mediada por células en la resistencia a la reinfección por el parásito (Sepúlveda, 1982). Las observaciones compatibles con este punto de vista incluyen la anergia celular que se observa en los estudios tempranos de la invasión por amibas patógenas, la mayor incidencia de amibiasis invasora en los animales y en humanos inmunosuprimidos, la aparición y persistencia de hipersensibilidad retardada a antígenos amibianos después de la recuperación de absceso hepático amibiano (AHA) y la observación clínica de que la recurrencia de AHA es muy poco frecuente (Salata, y Ravdin, 1986).

Respuesta Inmune Humoral. Los mecanismos de defensa inmune humoral contra la infección amibiana no han sido completamente caracterizados, principalmente la respuesta inmune local. Debido a que la mucosa intestinal es una barrera de defensa muy importante contra el parásito, el estudio de la respuesta inmune local contra E. histolytica es de gran relevancia; algunas investigaciones han sugerido la existencia de una reacción inmunológica local en la amibiasis invasora ya que existen coproanticuerpos contra amiba en el 80% de casos con disentería amibiana, los cuales parecen pertenecer a la clase IgA (Martínez, 1979, Ximénez y col., 1990). También se han detectado anticuerpos IgA secretorios anti-amiba en

la bilis de ratas inmunizadas intracecalmente (Acosta y col., 1986), en la leche humana (Grundy y col., 1983) y en saliva humana (Del Muro y col., 1990). Por lo cual se considera que la IgA secretora anti-amiba tiene un papel importante en la protección durante las etapas tempranas de la infección, ya que estos anticuerpos reaccionan con antígenos presentes en la membrana de los trofozoítos de E. histolytica e inhiben su adherencia (Campos-Rodríguez, y col., 1986; Carrero, y col. 1994).

En cuanto a la respuesta inmune sistémica, se ha podido establecer en pacientes adultos con amibiasis intestinal, que las IgGs totales se encuentran significativamente elevadas, lo que no ocurre con las IgM e IgA (Trissl, 1982, Ximénez, y col., 1990). También se ha observado una estrecha relación entre la elevación de anticuerpos séricos anti-amibianos y la enfermedad invasora como en el caso de pacientes con absceso hepático amibiano (Resano, y col., 1982., Yang, y col., 1991). Un punto controversial concerniente a los anticuerpos circulantes anti-amibianos es que éstos no desempeñan ningún efecto protector, pese a que se ha demostrado que el suero de pacientes con alta concentración de anticuerpos contra amiba inhiben el crecimiento de E. histolytica "in vitro", sin embargo, el efecto protector de las inmunoglobulinas séricas contra la amiba no se ha determinado especialmente "in vivo" (Sepúlveda, 1982, Trissl, 1982).

Los antígenos solubles liberados por las amibas intactas, así como los resultantes de la desintegración amibiana, son importantes porque podrían explicar la inmunización sin previa invasión

tisular.

Por otro lado, se han publicado estudios epidemiológicos, en donde la serología positiva alcanza el 70% de los casos de amibiasis supuestamente luminal y asintomática (Savanat, y col., 1974). En nuestro país se han hecho encuestas seroepidemiológicas confiables como la de Landa y col., (1972) en donde se encontró positividad entre 5 y 6% de la población aparentemente sana estudiada en el D.F., y el trabajo realizado a nivel nacional por Gutiérrez-Trujillo y Aubanel, (1972) en donde encontraron anticuerpos antiamibianos entre el 2 y 9% de los habitantes de 46 poblaciones de toda la República. Recientemente Caballero-Salcedo, y col. (1994) realizaron un estudio seroepidemiológico a nivel nacional utilizando la técnica de hemaglutinación indirecta, estudiando un total de 67'668 muestras de suero de diferentes edades y condiciones socioeconómicas, determinaron un porcentaje de 8.41% de seroprevalencia positiva. Estos resultados solo pueden explicarse aceptando el concepto de invasión asintomática o la estimulación del aparato inmunológico sistémico por partículas subcelulares liberadas por las amibas luminales.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados de falsos positivos se establecen más frecuentemente en áreas endémicas en donde los individuos están constantemente expuestos a reinfecciones que refuerzan la respuesta sistémica, y aunque el nivel de anticuerpos séricos decrece con el tiempo, puede persistir a un nivel bajo por varios años (Trissl, 1982).

Se sabe que la respuesta inmune secretora se produce aún en

ausencia de invasión de la mucosa, pero la estimulación antigénica intestinal puede no necesariamente estar acompañada por una suficiente estimulación sistémica que produzca una respuesta detectable. Se considera que la respuesta sistémica puede inducir una memoria inmunológica larga, y la memoria inmunológica local es más corta; por lo tanto los anticuerpos del suero indicarían amibiasis invasora reciente o pasada, mientras que los anticuerpos de secreciones como la leche y la saliva indicarían la presencia de infecciones recientes. Estos resultados solamente reflejan el problema insalvable de diferenciar entre bajo grado de invasión y la amibiasis exclusivamente luminal (Grundy, y col., 1983, Del Muro, y col., 1990)

El bajo nivel de inmunogenicidad de antígenos de superficie observado en este parásito (Boonpucknanig y col., 1967., Sawhney y col., 1980), explicaría la posible evasión de la respuesta del hospedero por las amibas. Por otro lado las amibas liberan constantemente antígenos solubles al medio extracelular, evadiendo de esta manera la respuesta inmune del huésped, cuando esta se encuentra dirigida hacia el microexudado proveniente del parásito más que hacia el invasor mismo. Por si esto fuera poco también se ha observado que las amibas son capaces de movilizar los anticuerpos que llegan a su superficie y eliminarlos subsecuentemente mediante el fenómeno de "formación de casquete", haciendo que las amibas sean todavía menos susceptibles a la respuesta inmune del huésped (Calderón y col., 1980).

Serodiagnóstico de la amibiasis.

El diagnóstico de amibiasis invasora depende de la demostración de lesiones extra intestinales, o bien de la evidencia clínica y/o disentería o rectosigmoidoscópica de colitis, con evacuaciones con moco y sangre en la que se demuestren trofozoítos eritrofagocíticos de E. histolytica. (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983)

El empleo de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la amibiasis ha ido en aumento en los últimos años, los principales esfuerzos se han centrado en la identificación de moléculas que resulten específicamente antigénicas y que puedan ser empleadas en las diferentes pruebas inmunológicas (González, y col., 1992).

Entre estos métodos se usan: la inmunofluorescencia indirecta, inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunolectroforesis (EFI), inmunodifusión (ID), fijación del complemento (FC) y el radioinmuno análisis (RIA), entre otros. El RIA es sin duda el más sensible, pero su aplicación se ha visto limitada debido a la naturaleza de los materiales empleados. La técnica de ELISA es en la actualidad una de las más populares por ser accesible, por su alta sensibilidad, por ser más reproducible y relativamente rápida. Estas técnicas presentan diferencias en cuanto al antígeno empleado y el título de anticuerpos considerado como positivo, lo cual hace que sean difíciles las comparaciones entre los estudios que utilizan diferentes técnicas (Walsh, 1986a).

En general los métodos serológicos que se usan, detectan la presencia de anticuerpos contra la amiba en suero y otras secreciones; sin embargo solo se ha visto una estrecha relación

entre la elevación de anticuerpos sericos antiambianos y la enfermedad en el absceso hepático ambiano (Resano y col., 1982., Yang y col., 1991).

En el caso de la amibiasis intestinal hay discrepancias en cuanto a los resultados de la serología, ya que la detección de coproanticuerpos y anticuerpos séricos en poblaciones adultas, no constituyen un factor predictivo de amibiasis intestinal aguda, en zonas donde la amibiasis se comporta en forma endémica (Ximénez y col., 1990).

En base a estos resultados se ha visto que la detección del antígeno, es una medida más eficaz para establecer un diagnóstico etiológico de certeza. El ELISA para la detección de antígeno ambiano en heces se utilizó por primera vez en México por Palacios y col., (1978). Otros investigadores utilizaron la misma técnica para la detección del antígeno en heces de pacientes con amibiasis intestinal (Root y col. 1978 y Randall y col. 1984). Estudios comparativos entre el examen coproparasitoscopico y la técnica de ELISA mostraron que esta última es mucho más sensible (Grundy, 1982). También la técnica de ELISA se ha usado para la identificación de antígeno ambiano en el suero de pacientes con amibiasis invasora, demostrando que es un procedimiento sensible, específico y susceptible de ser adaptado para el serodiagnóstico de la amibiasis invasora (Hernández y col. 1982). En este sentido, el encontrar antígeno ambiano en la sangre circulante de los pacientes, indicaría la evidencia de un proceso infeccioso actual o reciente ocasionado por E. histolytica (Resano y col. 1982).

Absorción de antígenos a través de Intestino.

El aparato digestivo tiene como característica el estar en contacto con gran cantidad y diversidad de antígenos, por lo que se requiere en este lugar una gran cantidad de tejido linfoide. Se considera a este tejido linfoide del tubo digestivo como un sistema inmunitario local, denominado tejido linfoide asociado a intestino (GALT). El GALT esta formado por células aferentes y eferentes; las placas de Peyer, apéndice y amígdalas son zonas aferentes donde se captan antígenos, capaces de iniciar respuestas inmunitarias, mientras que los linfocitos de lámina propia y los intraepiteliales son células primordialmente eferentes, responsables de la inmunidad celular y de producir anticuerpos, en particular de la clase IgA (Altamirano y Lopez, 1992).

El epitelio intestinal que recubre las placas de Peyer es de tipo plano con escasas microvellosidades, formadas por células planas denominadas "M" por tener micropliegues; las placas de Peyer son sitios de endocitosis de macromoléculas de la luz intestinal hacia los folículos linfoides, dándoles propiedad de sitios de inicio de respuestas inmunitarias.

Los antígenos que circulan por la superficie intestinal abarcan desde nutrientes o proteínas provenientes de la digestión de los alimentos, así como la microflora comensal natural del intestino hasta microorganismos enteropatógenos y se ha observado que las células "M" pueden transportar indistintamente estos antígenos. Se considera que a este nivel se puede modular la respuesta inmune, ya que es posible que la ineficiencia de las células "M" en el

transporte de antígenos solubles lumbales y partículas no adheribles impidan la inducción de la respuesta inmune contra los antígenos de la dieta y la microflora normal intestinal (Kraehenbuhl y col. 1992., Wold y col., 1989., Weltzin y col. 1989). Se sabe que microorganismos, partículas y lectinas que se adhieren a las membranas apicales de las células "M" son endocitadas y transportadas con alta eficiencia; y esto es consistente con la observación de que materiales que se adhieren a la superficie de la mucosa tienden a desarrollar fuertes respuestas inmunes secretoras (Wold y col. 1989).

Algunos virus se adhieren selectivamente a células "M" utilizándolas solo como transporte para cruzar el epitelio y distribuirse sistémicamente; tal es el caso del reovirus tipo 1, el virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el virus de la polio y el retrovirus HIV-1 (Weltzin y col. 1989).

También un amplio rango de bacterias patógenas gram (-) se ha visto que se adhieren selectivamente o preferentemente a células "M"; estas incluyen: Escherichia coli, Vibrio cholerae y Salmonella typhi (Michetti y col. 1992).

El paso de antígenos de la dieta a través de la barrera gastrointestinal en animales experimentales está bien documentado (Hemmings y Williams, 1978., Udall y col., 1981), así como también en humanos (Husby y col. 1985., Paganelli y Levinsky, 1980., Gallagher y col. 1983). Se ha demostrado que es posible detectar nutrientes proteícos en circulación después de su ingestión, y pueden desarrollarse tres consecuencias inmunológicas: una

respuesta local a nivel de intestino (anticuerpos secretores IgA); más raramente se puede desarrollar una respuesta a nivel sistémico; y más frecuentemente, es posible inducir un estado de tolerancia inmunológica, dependiendo de la naturaleza del inmunógeno, la dosis y la presencia o ausencia de adyuvantes. Así se ha observado que la tolerancia sistémica es consecuencia de la ingestión de un amplio rango de antígenos solubles, y en contraste es más difícil inducir una tolerancia para antígenos particulados, ya que hay una amplia información sobre la generación de respuesta a nivel local o sistémico después de la administración oral de células o virus (Mowat, 1987).

Se sabe que la cantidad de proteínas antigénicamente intactas que atraviesan la barrera intestinal es muy pequeña; sin embargo el antígeno puede ser detectado en circulación por pruebas de radio marcado y por métodos de RIA o por ELISA. Uno de los aspectos más cuestionables en este tipo de experimentos es que la degradación enzimática de antígenos radiomarcados puede permitir el paso de marca radioactiva libre o de pequeños péptidos marcados hacia la sangre y éstos subsecuentemente se unen a proteínas del plasma (Udall y col. 1981, Skogh, 1982, Husby y col., 1985).

Aunque las células "M" de las placas de Peyer representan un punto de entrada para algunos microorganismos, son necesarias para que se induzca una respuesta inmune secretora de anticuerpos IgA, que impida la adherencia e invasión de las mucosas y por consiguiente la invasión sistémica por estos microorganismos.

III.- P L A N T E A M I E N T O D E L P R O B L E M A .

La mucosa intestinal es una importante barrera de defensa contra una gran cantidad y diversidad de antígenos y de microorganismos que pueden ingresar al cuerpo. En la mucosa se encuentra distribuido el denominado tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT).

Por otra parte, hay evidencia experimental de que los antígenos de la dieta son capaces de atravesar la barrera gastrointestinal intactos.

En la amibiasis, se considera que solo hay producción de anticuerpos circulantes cuando la infección es invasora. Sin embargo, en México al ser una área endémica para esta enfermedad, se presenta un alto índice de seropositividad en individuos aparentemente sanos o portadores; estos resultados podrían explicarse en el caso de una posible invasión asintomática o por la estimulación del aparato inmunológico sistémico por partículas subcelulares liberadas por las amibas lumbales, como ocurre en otros modelos de infección por patógenos intestinales, en particular Giardia lamblia (Ackers, 1982). También se ha determinado que la administración oral de trofozoítos amibianos sin fijar o fijados con glutaraldehído, inducen respuestas secretoras principalmente del isotipo IgA, y que es posible inducir una

respuesta sistémica utilizando esta vía de administración posiblemente como resultado de la migración de células formadoras de anticuerpos que drenan de los nódulos linfáticos o de la absorción del antígeno soluble hacia la circulación (Villarreal y col., 1992).

IV.-O B J E T I V O S.

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de antígeno amibiano en la circulación sanguínea de ratones Balb/c, después de la administración por vía oral de lisados de trofozoítos amibianos, y documentar a través del estudio histopatológico la existencia o no de lesiones tisulares en el intestino imputables a E. histolytica.

V.- MATERIAL Y METODOS.

Cultivo axénico de amibas.

Se cultivaron trofozoítos de Entamoeba histolytica HM1:IMSS, en medio TYI-S-33 (caldo de extracto de levadura con hierro y suero) (Diamond, y col., 1978), complementado con 3% de vitaminas y 10% de suero fetal de bovino (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island, N.Y. USA). Los trofozoítos se incubaron de 48 a 72 hrs a 37 °C, en botellas de plástico estériles de 50 ml (Costar, Cambridge, MA. USA) con aproximadamente 40 ml de medio de cultivo.

Radiomarcado de amibas.

Los trofozoítos de E. histolytica se marcaron metabólicamente con L-Cisteína (³⁵S) (1175 Ci/mmol) y L-Leucina(³H) (145 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA). Para esto, las amibas de un cultivo de 48 hrs se incubaron en medio TYI-S-33 sin cisteína y sin ácido ascórbico por 6 hrs. Posteriormente se agregó L-Cisteína (³⁵S), 50 µCi/20 ml de medio de cultivo y L-Leucina (³H), 50 µCi/20 ml de medio y se continuó la incubación por 12 hrs más. Antes de agregar la marca, el volumen del medio de cultivo se redujo a la mitad por centrifugación.

Los trofozoítos marcados se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de fosfato de potasio 19 mM, ph 7.2 (PD) por centrifugación a 200Xg/10 min; se ajustó la concentración de amibas a 10X10⁶/ml, en (NaHCO₃, 0.5 M).

Incorporación de marca por los trofozoítos.

Para determinar la cantidad de marca incorporada por los

trofozoítos, la suspensión de amibas se precipitó con ácido tricloroacético (TCA); se probaron 2 métodos uno en solución y el otro en papel. En el primer caso, a 0.5 ml de una suspensión con 5×10^6 de trofozoítos radiomarcados en NaHCO_3 0.5M, se le agregaron 50 μl de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 1 mg/ml y 0.5 ml de TCA al 20% (v/v), se incubó la mezcla durante 30 min a 4 °C. El precipitado se separó por filtración usando un embudo Büchner y una membrana de papel de nitrocelulosa y se lavó dos veces con TCA al 10%. En el segundo caso, 50 μl de la suspensión se pegaron a membranas de papel de nitrocelulosa, incubándose con TCA al 20% (v/v) durante 30 min a 4°C y se lavó con TCA al 10%; en ambos casos el precipitado adherido a la membrana de nitrocelulosa, se dejó secar por 12 hrs a 37°C, y se colocó en un frasco con 6 ml de líquido de centelleo (Insta-Gel, Packard, Instrument, Company Inc. Illinois USA). La cantidad de marca presente se determinó con un contador de centelleo (Packard TRICARB 300, United Technologies PACKARD), utilizando el programa de $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ y leyendo cada muestra durante un minuto.

Seguimiento de antígeno amibiano marcado en ratones Balb/c.

Se usaron 30 ratones de la cepa Balb/c, de 8 a 9 semanas de edad, divididos en 6 grupos de 5 ratones por grupo. A cada ratón se le administró por vía oral 5×10^6 trofozoítos radiomarcados, resuspendidos en 0.5 ml de NaHCO_3 0.5 M, excepto a un grupo que se usó como control (0 hrs) Cada grupo se sacrificó a las 0, 1, 2, 3, 8 y 24 hrs respectivamente, obteniéndose los siguientes órganos: sangre, bazo, hígado, pulmón, riñón, intestino delgado e intestino

grueso, así como placas de Peyer y ganglios mesentéricos; todas estas muestras con excepción de la sangre se colocaron directamente en viales de centelleo con 6 ml de líquido de centelleo (Insta-Gel). La sangre se obtuvo por incisión de vena axilar; recogién dose con pipeta pasteur heparinizada y se centrifugó a 400Xg/15 min; se separaron muestras de plasma y células sanguíneas y estas se pusieron en 6 ml de líquido de centelleo, en la siguiente proporción: sangre total 20 μ l, plasma y células sanguíneas 10 μ l. Todas las muestras se leyeron en un contador de centelleo Packard como se describió anteriormente.

Obtención de suero hiperinmune contra amiba.

Se utilizaron 2 conejos machos Nueva Zelanda Blancos de aproximadamente 2 Kg de peso y 3 meses de edad. Los conejos se inmunizaron cada 15 días y se sangraron 8 días después de cada inmunización para seguir su respuesta. Cada conejo se inoculó con 10×10^6 trofozoítos de E. histolytica, crecidos axénicamente por 72 hrs, resuspendidos en 1 ml del amortiguador PD y 1 ml de adyuvante; en las dos primeras inmunizaciones se utilizó adyuvante completo de Freund (Gibco) y en las dos siguientes adyuvante incompleto de Freund (Gibco); las inmunizaciones se hicieron por vía intramuscular con 0.5 ml en cada pierna y 1 ml por vía subcutánea en diferentes partes del lomo. Las últimas tres inmunizaciones se hicieron con la misma cantidad de trofozoítos pero sin adyuvante y solamente por vía intramuscular.

Los títulos de anticuerpo se evaluaron por la técnica de ELISA. Cuando los animales presentaron un buen título de

anticuerpos se sacrificaron por punción cardiaca hasta blanco; la sangre obtenida se centrifugó a 400Xg/15 min, se separó el suero y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Purificación de gamaglobulinas de conejo.

a) Precipitación con sulfato de amonio. A 30 ml del suero de conejo se le agregaron lentamente y en agitación, 30 ml de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 8; la muestra se mantuvo a 4°C por 30 a 40 min. Posteriormente se centrifugó esta solución a 8,000Xg/20 min a 4°C (Centrífuga Beckman modelo J2-21) y el sedimento se resuspendió en 15 ml de agua destilada; se agregaron 10 ml de sulfato de amonio y se dejó en agitación constante por 30 min a 4°C ; se centrifugó nuevamente y el precipitado se resuspendió en amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.5, se dializó contra esta misma solución, cambiándose la diálisis cada 12 hrs durante dos días; el último cambio se hizo con amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 8. y se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). El dializado se almacenó en alícuotas a -20°C.

b) Purificación de IgG, por columna de afinidad (Proteína-A-Sepharosa). Se montó una columna de Sepharosa-Proteína- A (Pharmacia Fine Chemicals Upsala Suecia) de 1.5 X 2.5 cm, equilibrada con PBS. Una muestra de 1 ml de inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio, con una concentración de 55 mg/ml, se colocó en la columna y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La columna se lavó con PBS y se obtuvieron alícuotas de 3 ml, a las que se les determinó su D.O. a 280 nm en un espectrofotómetro (Carl Zeiss, Alemania). La columna

se lavó hasta que la D.O. de las fracciones fué cercana a 0 (<0.01). Después, se pasaron por la columna 4.5 ml de una solución de Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.3; el pH del eluido se neutralizó con una solución Tris-Base 0.5 M. La columna se lavó nuevamente con PBS. Las fracciones del eluido con glicina-HCl que contenían la IgG se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración, en celdas de ultrafiltración (Amicon, Corporation, MA. USA), usando una membrana XM-100 DIAFLO (AMICON); al concentrado se le determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry, se hicieron alícuotas de 200 μ l las que se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Asimismo, se comprobó la actividad de las IgGs purificadas mediante ELISA y se analizó su pureza por electroforesis en un gel de poliacrilamida (Hudson y Hay, 1989).

Preparación del conjugado IgG-Peroxidasa.

Se disolvieron 6 mg de peroxidasa de rábano (Sigma, Chemical Co. St. Louis MO. USA) en 1 ml de agua bidestilada; se agregaron 0.2 ml de periodato de sodio 0.1 M, y esta solución se agitó suavemente durante 20 min a temperatura ambiente; la solución se dializó durante 12 hrs contra 2 lts de una solución amortiguadora de acetatos 1 mM, pH 4.4 a 4°C y en oscuridad. Al dializado se le agregaron 20 μ l de una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.5 para elevar su pH, e inmediatamente se mezcló con 1 ml de la IgG purificada (10 mg/ml), previamente dializada contra la solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.5; la muestra se incubó durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Después, se adicionaron a ésta mezcla 100 μ l de solución de

borohidruro de sodio (4 mg/ml) en agua destilada, incubándose durante 2 hrs a 4°C; posteriormente se dializó contra una solución amortiguadora de boratos 0.1 M, pH 7.4.

El conjugado IgG-Peroxidasa (2.32 ml) se pasó por una columna de Sephadex-G200 (Pharmacia Fine Chemicals) de 1.5 X 35 cm, equilibrada con PBS (Hudson, y Hay, 1989); la columna se eluyó a una velocidad de 4 ml/h, y se colectaron fracciones de 2 ml en un colector de fracciones (LKB-211 Multirac, LKB). El perfil de elución de la columna se obtuvo mediante la determinación de la D.O. de las diferentes fracciones a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro (Carl zeiss); las fracciones que contenían el conjugado se mezclaron y se dializaron contra glicerol, para su concentración (volumén final de 3 ml); el conjugado concentrado se guardó a -20°C en la oscuridad.

Detección de antígeno (Ag) ambiano en suero de ratones Balb/c.

Se usaron 5 grupos de 10 ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad; un grupo se usó como control y cuatro como experimentales; a cada ratón, de los grupos experimentales, se les administró por vía oral 5×10^6 trofozoítos resuspendidos en 0.5 ml de NaHCO₃ 0.5 M. Pasados 30 min se sangró a un grupo por la vena porta (V.P.) y a otro por la vena axilar (V.A.); a los 60 min se sangró a otro grupo por V.P. y al otro grupo por la V.A.; los ratones del grupo control se sangraron por V.P., la sangre obtenida se centrifugó a 400Xg/15 min y se separó el suero.

La presencia del Ag ambiano en el suero de los ratones fué determinada por la técnica de ELISA como se describió previamente

(Villarreal y col., 1992). Para esto, se recubrieron pozos de placas de poliestireno para microtitulación (Costar) con 50 μg /pozo de la IgG contra amiba, resuspendida en 100 μl de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, incubándose durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó una vez con una solución de PBS-BSA 0.5% -Tween 20 al 0.5% y dos veces con PBS-Tween 20 al 0.5%. Posteriormente se bloquearon los pozos con PBS-BSA al 3%, incubándose por 2 hrs a 37°C. Los pozos se lavaron 3 veces como en el paso anterior y se incubaron 1 h con las muestras de suero, a temperatura ambiente y en agitación constante; las muestra se probaron por duplicado diluidas 1:2 con PBS-BSA-Tween 20.

Los pozos se lavaron nuevamente y se agregaron 50 μl /pozo del anticuerpo (Ac) contra amibas-peroxidado (conjugado IgG-Peroxidasa) diluido 1:100 y se incubaron nuevamente como en el paso anterior. Después, se lavó y se reveló la placa agregándole 50 μl /pozo de la solución con el sustrato, que contenía 10 mg de ortofenilendiamina en 10 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5 y 4 μl de H_2O_2 al 30%; la reacción se paró con 200 μl /pozo de H_2SO_4 1 M, aproximadamente a los 5 min. La D.O. se midió directamente en la placa a 490 nm con un micro lector de ELISA (Bio-Teck Instruments, Inc. Winooski VT, USA).

En este ensayo se incluyó también, una curva patrón con: 0, 2, 10, 25, 50, 100 y 200 ng/pozo de Ag de amiba, diluido en suero de ratón.

Estudio Histopatológico.

El intestino completo de ratones sin tratar y tratados de 2 experimentos de absorción del Ag ambiental (sacrificados a las 3 hrs), fueron fijados en solución de formaldehído al 10% por 48 hrs, cortados transversalmente en fragmentos de 0.5 cm, se deshidrataron y se incluyeron en parafina, haciendo microcortes de 6μ se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. Los microcortes montados en preparaciones permanentes fueron examinados histológicamente buscando daño a la mucosa sin conocer el grupo de origen de dichas preparaciones.

Análisis estadístico.

Se hizo análisis estadístico de los datos obtenidos por ELISA, en los dos ensayos de detección de Ag ambiental en circulación utilizando el programa estadístico "Sigma plot". El análisis de varianza ANOVA se usó para determinar si existían diferencias entre los grupos tratados y el grupo control. Para comparar las diferencias entre cada grupo de ratones (experimentales y grupo control) se usó la prueba de t-student cuando la varianza fue homogénea y la prueba de U de Mann-Whitney en el caso de varianzas heterogéneas.

VI.- R E S U L T A D O S .

Los resultados del marcado metabólico de 4 experimentos se presentan en la tabla I; se puede observar que solamente del 0.34% al 1.2% de la marca utilizada fué incorporada por las amibas. Para diferenciar si la marca en las amibas era debida a incorporación o pegado del aminoácido radiomarcado, se precipitó la suspensión de amibas con TCA. Mediante este procedimiento se observó que el 77% de la marca fué precipitable (tabla II). Estos porcentajes nos muestran que en las amibas marcadas y lavadas existe tanto aminoácido marcado incorporado metabólicamente como pegado inespecificamente; también se observo que existe diferencia considerable en cuanto a los dos métodos empleados para la precipitación en solución y en papel.

TABLA I

Marcado metabólico de las amibas.

Experimento	Cantidad de marca agregada cpm.	Cantidad de marca incorporada por las amibas cpm (%)	N° de amibas/cpm.
1	284'617 920	971'040 (0.75)	173
2	251'750 010	1'756 440 (0.69)	86
3	1'674 077 700	5'740 416 (0.34)	75
4	1'487 567 200	17'622 360 (1.2)	7

Resultados de 4 experimentos desarrollados en las mismas condiciones.

TABLA II

Precipitación de las amibas marcadas con TCA.

	MARCA TOTAL	MARCA PRECIPITADA cpm	% DE PRECIPITACION
	156'075	73'023	47
en solución	156'075	42'528	2
	31'215	24'013	77
en papel	31'215	23'719	76

Se probaron dos métodos de precipitación. En solución, se precipitaron 0.5 ml de la solución de amibas marcadas agregándole 0.5 ml de TCA al 20%. En la precipitación en papel, se usaron 50 μ l de la solución de amibas marcadas precipitándose directamente sobre papel de nitrocelulosa.

Una vez marcadas las amibas se administraron a ratones por vía oral; cada ratón recibió 5×10^6 amibas lo que equivale a 28'900, 57'400, 66'000 y 699'300 cpm/ratón en los experimentos 1 a 4 respectivamente (tabla I) dependiendo de la eficacia del marcado metabólico. Tomando en cuenta los resultados de la precipitación con TCA, de la marca administrada a cada ratón solamente el 77% correspondió a marca incorporada lo que representó finalmente 22'253, 44'198, 50'820 y 473'253 cpm/ratón en los experimentos 1 a 4 respectivamente.

El seguimiento de la marca radiactiva en los diferentes órganos de los ratones a los que se les administraron las amibas marcadas, se muestra en la figura 1; cada punto en las figuras representó el promedio de 5 animales. Los resultados de los 4 experimentos no se pudieron promediar debido a las diferencias tan grandes en el marcado metabólico de las amibas; sin embargo en todos los experimentos se aprecia el mismo patrón de distribución de la marca. Se puede observar una cantidad de marca considerable en

hígado, intestino delgado e intestino grueso y una cantidad moderada en suero y ganglios mesentéricos. En bazo, pulmón, riñón y placas de Peyer no se detectó marca. También se observa que la cantidad de marca detectada en los órganos es mayor durante las primeras tres horas después de la inoculación, lo que sugiere que la absorción de dicho antígeno es muy rápida.

Otra forma de detectar sustancias es empleando métodos inmunológicos, y con este fin se montó un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Para ésto, se inmunizaron dos conejos con amibas completas, de acuerdo al esquema descrito en material y métodos; una vez que los conejos respondieron se sangraron y se titularon los sueros por ELISA. La línea de corte para distinguir entre un suero positivo y otro negativo se estableció utilizando el criterio del promedio del suero preinmune (mínima dilución 1:100) + 2 desviaciones estandar; los resultados se muestran en la figura 2. Se observa que ambos conejos desarrollaron un título de 1:16'000; no obstante estos resultados, se decidió trabajar los sueros por separado.

Las IgGs de los sueros hiperinmunes se purificaron por pase a través de una columna de proteína A-sepharosa; los anticuerpos obtenidos de esta forma presentaron un buen grado de pureza, ya que en la electroforesis en gel de poliacrilamida solo se observaron las bandas correspondientes a las IgGs (figura 3). De estas IgGs se utilizó una parte para acoplarlas a peroxidasa; el acoplamiento del anticuerpo con la enzima resultó muy eficiente ya que al separar

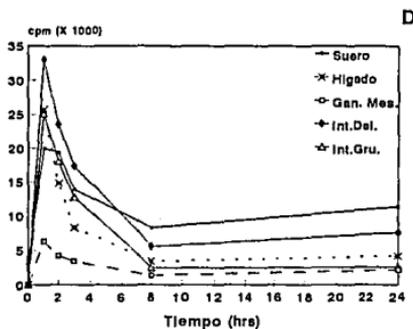
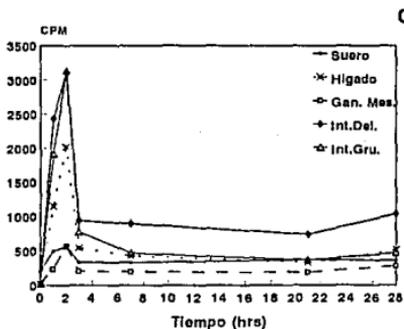
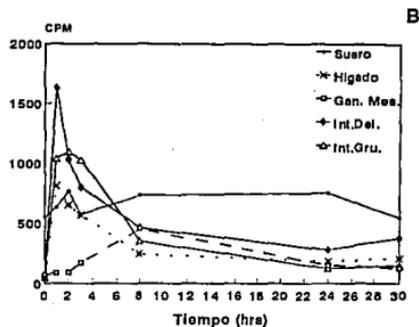
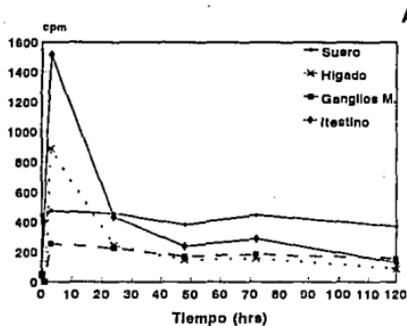


Fig 1. Detección de marca radioactiva en diferentes órganos y a diferentes tiempos, después de la administración de 5×10^6 de amibas marcadas por vía oral/ratón. A) Experimento 1; 28,900 cpm/ratón. B) Experimento 2; 57,400 cpm/ratón. C) Experimento 3; 66,000 cpm/ratón. D) Experimento 4; 699,300 cpm/ratón. cada punto representa el promedio de 5 animales.

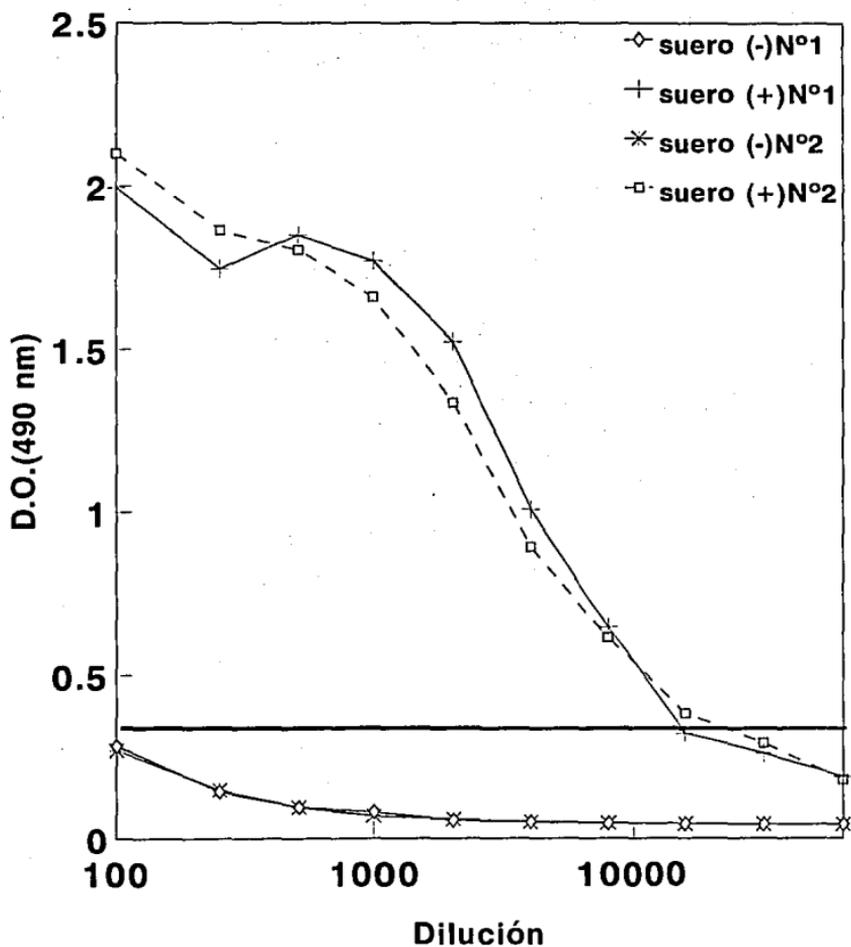


Fig 2. Titulación del suero de los conejos contra ameba por ELISA; el valor de corte entre una muestra positiva y otra negativa se determinó sumando el promedio de 2 desviaciones estándar de los sueros negativos en la dilución más baja utilizada (1:100).

el conjugado del material no unido mediante pase a través de una columna de sephadex G-200 en el perfil de elución sólo se observó un pico (datos no mostrados).

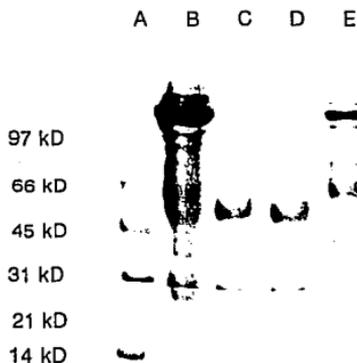


Fig 3. electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS en condiciones reductoras, de IgG de conejo contra amibas. A) marcadores de PM; B) suero precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C) gamaglobulinas de bívino; D) gamaglobulinas de conejo purificadas en columna sepharosa-proteína A; E) fracción no absorbida a la columna de sepharosa-proteína A.

Se estimó la sensibilidad del conjugado preparado por ELISA; para ésto, se hicieron diferentes diluciones del anticuerpo peroxidado y se agregaron 50 μl de cada dilución a pozos de microtitulación a los que se les habían pegado 1'500 amibas; posteriormente se agregó el substrato de la enzima y se determinó la intensidad de color generado en un lector de ELISA a 490 nm. Los resultados se muestran en la tabla III y se aprecia que a medida que se hacen diluciones del conjugado la D.O. disminuye y que la

dilución 1:1000 dió lecturas apreciables a simple vista, lo que con las diluciones 1:4000 a 1:50'000 no ocurrió.

TABLA III

Actividad del anticuerpo (Ac) de conejo peroxidado contra amiba por ELISA;

Dilución	1:250	1:1000	1:4000	1:20'000	1:50'000
D.O.	0.6	0.255	0.098	0.063	0.052

A 50 μ l de diferentes diluciones del Ac peroxidado se agregaron a pozos con 1'500 amibas, posteriormente se agregó el sustrato de la enzima y se determinó la D.O. a 490 nm.

Para determinar la sensibilidad del conjugado se realizó un ELISA directo; con este fin se agregaron diferentes diluciones del conjugado a pozos de microtitulación que contenían diferentes cantidades de Ag amibiano soluble. Los resultados se presentan en la tabla IV y se aprecia con las 3 diluciones del conjugado utilizadas, al aumentar la concentración de Ag, la lectura de D.O. fue superior al control donde no había Ag

TABLA IV.

Sensibilidad del Ac peroxidado contra antígeno (Ag) soluble de amiba por ELISA.

Dilución del conjugado	Ag soluble amibiano (ng)					
	0	0.25	1	5	10	25
1:100	0.084	0.147	0.169	0.195	0.215	0.3
1:250	0.078	0.130	0.127	0.140	0.153	0.284
1:500	0.079	0.110	0.119	0.127	0.135	0.166

50 μ l de cada dilución del conjugado se agregaron a pozos que contenían diferentes cantidades de Ag amibiano soluble; la reacción se reveló agregando el sustrato de la enzima y se determinó la D.O. a 490 nm.

Posteriormente se montó otro ELISA para detectar y cuantificar la presencia de Ag amibiano en una muestra. Para esto el Ac anti-amiba purificado se utilizó como Ac de captura y el Ac peroxidado contra amiba se utilizó como Ac de revelado. En la estandarización de la prueba se probaron diferentes cantidades de Ac de captura (0,5,25, y 50 $\mu\text{g/pozo}$), diferentes cantidades de Ag amibiano soluble, (0, 2, 10,25,100 y 200 ng, diluido en 50 μl de PBS; "sistema limpio") y 2 diferentes diluciones del Ac peroxidado (1:100 y 1:200). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas V a y V b. A los valores obtenidos con determinadas condiciones de Ac de captura y de revelado, se les restó el valor de su respectivo control donde no existía Ag de amiba. En general se observa que las lecturas con la dilución 1:100 del Ac de revalado son mayores que con la dilución 1:200, lo cual era de esperarse. Para distinguir entre un valor positivo y otro negativo lo que se hizo fue sumar al control negativo 2 veces su desviación estandar y los resultados superiores a este valor se consideraron como positivos; de esta forma la sensibilidad del ensayo vario entre 2 y 35 ng del Ag.

Ya que el ensayo se utilizaría para detectar Ag amibiano en el suero de ratones, se decidió probar los reactivos en un sistema en presencia de suero de ratón; en esta ocasión el Ag se suspendió en suero normal de ratón diluido 1:2. Los resultados se muestran en la tabla VI a y VI b. Al igual que en el sistema limpio a los resultados obtenidos se les resto el valor del control negativo y se hicieron las mismas consideraciones para determinar la

TABLA V

Deteccion de Ag de amiba por ELISA en un "sistema limpio".

a)

Ag amibiano (ng)	Ac 1	de 5	captura 25	(μ g) 50
0	0	0	0	0
2	0	0.017	0.062	0.055
10	0	0.093	0.102	0.095
25	0.15	0.172	0.162	0.111
50	0.161	0.175	0.222	0.303
100	0.243	0.36	0.427	0.508
200	0.347	0.432	0.612	0.616

b)

Ag amibiano (ng)	Ac 1	de 5	captura 25	(μ g) 50
0	0	0	0	0
2	0.009	0	0	0.013
10	0.02	0.031	0.032	0.057
25	0.043	0.067	0.015	0.086
50	0.071	0.106	0.135	0.098
100	0.114	0.128	0.182	0.281
200	0.174	0.236	0.315	0.304

El Ag amibiano se diluyó en 50 μ l de PBS-BSA-Tween y se reveló con el Ac peroxidado diluido 1:100 (a) ó 1:200 (b).

sensibilidad. Aquí se observó que el suero reduce considerablemente el valor de fondo de los controles negativos, aun cuando las lecturas fueron superiores cuando se utilizó la dilución 1:200 del Ac de revelado. En cuanto a la sensibilidad, está vario de menos de 2 ng de Ag a 39 ng dependiendo de las condiciones, siendo las mejores cuando se utilizó 25 y 50 μ g de Ac de captura y una dilución de 1:200 del Ac de revelado.

TABLA VI.

Detección de Ag de amiba por ELISA

a)

Ag amibiano (ng)	Ac		de 5	captura 25	(µg) 50
	1				
0	0		0	0	0
2	0.007		0.012	0.008	0.008
10	0.013		0.027	0.017	0.023
25	0.028		0.032	0.059	0.032
50	0.051		0.045	0.064	0.065
100	0.123		0.073	0.127	0.128
200	0.167		0.13	0.183	0.201

b)

Ag amibiano (ng)	Ac		de 5	captura 25	(µg) 50
	1				
0	0		0	0	0
2	0.017		0	0.009	0.026
10	0.031		0.008	0.017	0.034
25	0.137		0.041	0.063	0.063
50	0.082		0.07	0.071	0.104
100	0.088		0.138	0.152	0.271
200	0.172		0.252	0.251	0.374

En esta ocasión se utilizó un sistema en presencia de suero de ratón. El Ag amibiano se diluyó en 50 µl de suero de ratón normal diluido 1:2 con PBS-BSA-Tween, este ensayo se reveló con el Ac peroxidado diluido 1:100 (a) o 1:200 (b).

En base a estos resultados se decidió utilizar 50 μg de Ac decaptura/pozo, el suero problema diluido 1:2 y el conjugado diluido 1:200.

Ya montado el ELISA el ensayo se usó para detectar Ag de amiba en el suero de ratones inoculados por vía oral con 5×10^6 trofozoítos de Entamoeba histolytica suspendidos en 0.5 ml de NaHCO_3 . Los animales se sangraron de la V.A. ó de la V.P. a los 30 ó 60 min después de haberles administrado las amibas. Los resultados se muestran en la figura 4; donde se observa que fué posible detectar la presencia de Ag en 3 de 5 ratones sangrados por V.P. a los 30 min y en 4 de 5 ratones sangrados por V.P. a los 60 min; del grupo sangrado por V.A. a los 60 min solo 1 ratón de 5 mostró valores en el límite de corte.

El valor de D.O. utilizado como línea de corte fué de 0.285 nm, tomando en cuenta el criterio del promedio del grupo control + 2 desviaciones estandar. Al mismo tiempo que se procesaron los sueros problema en el ELISA, se procesaron sueros con concentraciones conocidas de Ag de amiba (datos no mostrados); interpolando los valores de los sueros positivos con los obtenidos de la curva patrón de Ag amibiano, se observa que en los animales en donde fué posible detectar el Ag amibiano, este se encontró en concentraciones mínimas de 4-20 ng /ml de suero.

Posteriormente, se repitió el experimento, aumentando el número de ratones a 10/grupo; sin embargo, en esta ocasión solo se

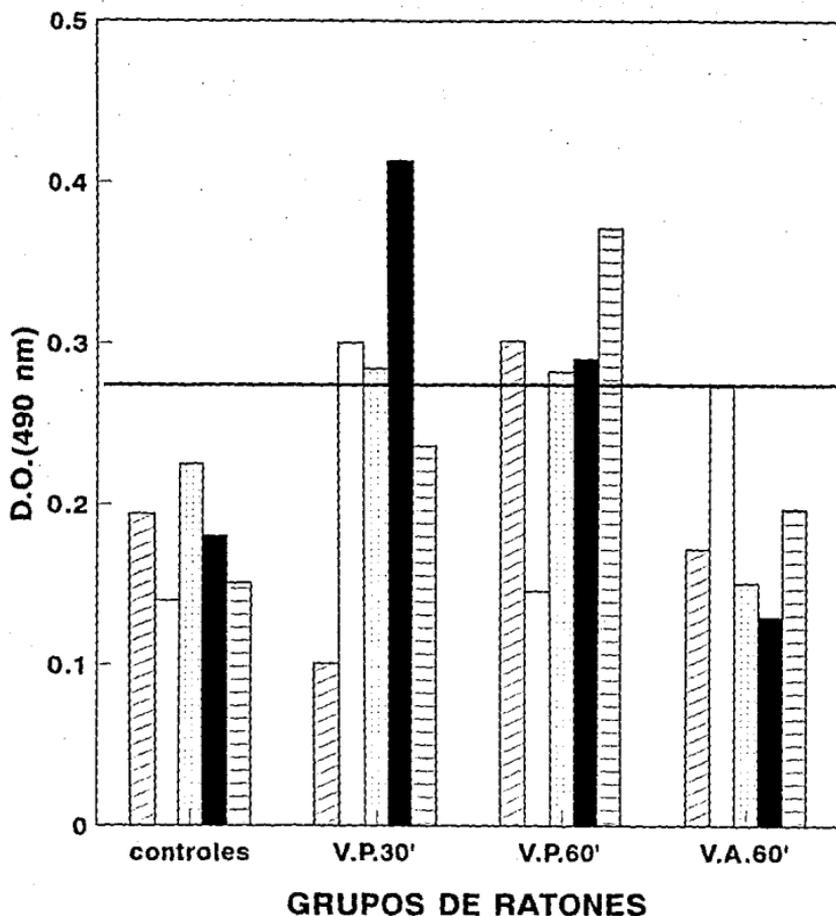


Fig 4. Detección de antígeno amibiano en suero de ratones inoculados con 5×10^4 trofozoitos resuspendidos en 0.5 ml de NaHCO_3 0.5 M; los animales se sacrificaron a los 30 y 60 minutos después de la inoculación, sangrándose por la vena porta o axilar. El valor de corte para diferenciar entre un positivo y un negativo se determinó sumando el promedio de los controles + 2 desviaciones estándar y fue 0.285 nm .

detectó el Ag en 2 ratones del grupo sangrado por V.P. a los 60 min, en 3 ratones del grupo sangrado de la V.A. a los 30 min y en 1 ratón del grupo sangrado por V.A. a los 60 min (figura 5). En este ensayo el valor de corte para los positivos fué de 0.429 ng y se observa que la sensibilidad del ensayo disminuyó, ya que en esta ocasión se detectáron 40 ng del Ag/ml de suero.

Al realizar el analisis estadístico para comparar cada grupo con el grupo control, se observó que las muestras de suero obtenidas de V.P. a 30 y 60 min después de la administración de trofozoítos amibianos fueron estadísticamente diferentes con el grupo control ($p=0.015$ y $p=0.009$), mientras que en los grupos sangrados por V.A. solamente se observaron diferencias en los ratones sacrificados a los 30 min después de la administración de trofozoítos ($p=0.006$).

Para poder asegurar la detección del Ag amibiano en el suero de los ratones, se hizo un análisis de varianza de los datos obtenidos por el ELISA; los datos del análisis de varianza indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los ratones tratados ($p= 0.042$).

En cuanto a la revisión histopatológica de las preparaciones microscópicas de los intestinos de los ratones inoculados con los lisados amibianos, no se observó daño alguno en ninguna de las preparaciones (figura 6).

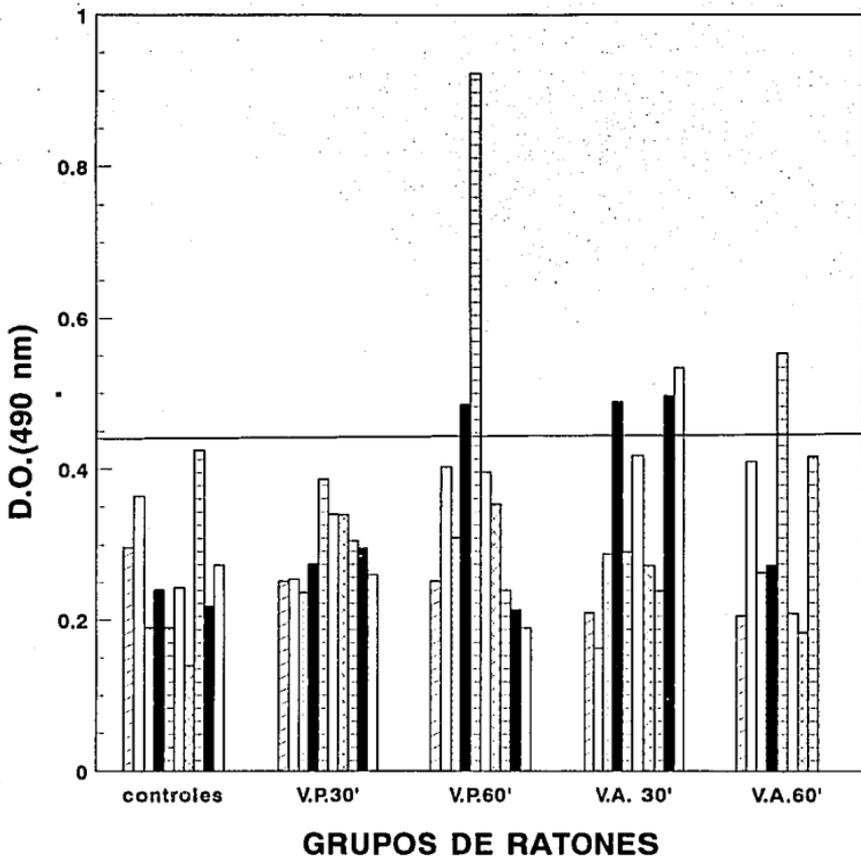


Fig 5. Detección de antígeno amibiano en suero de ratones inoculados con 5×10^4 trofozoítos resuspendidos en 0.5 ml de NaHCO_3 0.5 M; los animales se sacrificaron a los 30 y 60 minutos después de la inoculación, sangrándose por la vena porta o axilar. El valor de corte para diferenciar entre un positivo y un negativo se determinó sumando el promedio de los controles + 2 desviaciones estandar y fue de 0.429 nm.

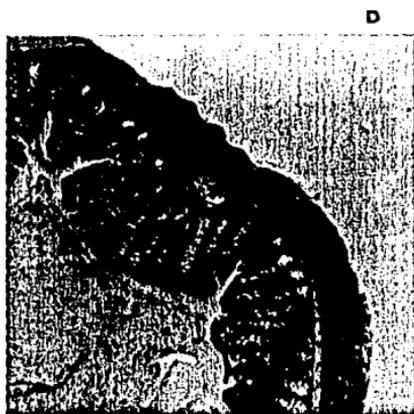
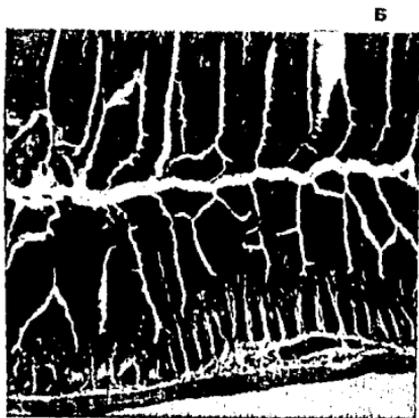
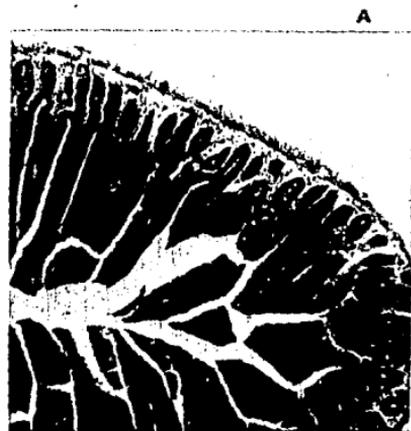


Figura 6. Corte histológico de duodeno (A y B) y de colon (C y D) de ratones controles (A y C) y ratones a los que se les administrarán trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS por vía oral (B y D). Como se puede observar no existe daño histopatológico en los animales experimentales. (Tinción con hematoxilina-eosina y aumento de 100 X)

VII.- D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S .

En el presente estudio pudimos observar que *E. histolytica* incorpora metabólicamente a los aminoácidos radiomarcados de manera muy ineficiente. Ya que solo del 0.34 al 1.2% de la marca total agregada al medio de cultivo fue incorporada por las amibas (tabla I); a pesar de que hay poca información sobre este procedimiento, nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Kobiler y Mirelman, (1981); ellos reportan un rango de radiomarcado de 10 a 40 amibas/cpm y en nuestros experimentos, obtuvimos valores de 174, 86, 75 y 7 amibas/cpm (tabla I). La variabilidad en cuanto a la cantidad de marca incorporada por las amibas en los 4 experimentos muestran que es necesario modificar el método de radiomarcado para mejorar su eficacia y reproducibilidad.

En cuanto a los dos métodos empleados para la precipitación del Ag marcado se observó que es más confiable cuando se precipita directamente en papel de nitrocelulosa ya que los resultados obtenidos por duplicado son prácticamente iguales, mientras que en la precipitación en solución las diferencias entre los duplicados son mayores, lo cual sugiere pérdida de las proteínas marcadas durante el procedimiento. Los resultados de esta precipitación nos indican que de la marca administrada a los ratones en la suspensión de amibas, el 77% correspondió a marca incorporada metabólicamente (tabla II).

A pesar de la variación del marcado metabólico de los trofozoítos amibianos en los 4 experimentos, se observó el mismo

patrón de absorción de la marca radioactiva; esta marca pudo ser detectada principalmente en intestino delgado y grueso, hígado y suero, lo cual es lógico considerando la vía de administración; así la actividad detectada en intestino representa la porción del antígeno no absorbido mientras que en el hígado se detectaron cantidades considerables por ser el órgano al que primero se dirigen las sustancias absorbidas del tubo digestivo y lo cual ocurre durante las primeras tres horas; después, la marca empieza a decrecer paulatinamente. Esta cinética concuerda con el patrón de absorción obtenido por Warshaw y col., (1974) aunque ellos solo siguen la marca en suero y en hígado después de la administración por vía oral de ^3H -BSA. También los resultados de la absorción de marca radioactiva obtenidos en este trabajo, concuerdan en términos generales con los reportados por Skogh, (1982) que detectó albúmina-sérica-humana marcada con ^{125}I en la sangre de ratones después de 15 minutos de haber sido administrada por vía oral. Por otra parte, Hemmings y Williams, (1978) midiendo la precipitación de la proteína marcada en los tejidos macerados y en el suero, determinaron que los valores en el suero son sorprendentemente bajos, mientras que en el hígado el contenido de radiomarca es alto; también encontraron proteínas marcadas en el suero parcialmente degradadas las cuales conservan su antigenicidad.

El no detectar marca considerable en placas de Peyer y ganglios mesentéricos y ser éstos los sitios donde son endocitados y transportados muchos de los antígenos lumenales nos indicaría ó que la absorción es muy rápida, por lo cual sería conveniente hacer

detecciones en estos sitios sobre todo a tiempos más cortos ó que los antígenos de amiba no son ó son pobremente absorbidos a este nivel.

Los datos reportados en la literatura nos sugieren que el Ag radiomarcado administrado por vía oral a cada ratón no se absorbe intacto por la vía intestinal ya que la gran mayoría se degrada enzimáticamente. Se ha determinado que solo del 2 al 40% de proteínas ingeridas oralmente pasan intactas a la circulación (Skogh, 1982., Hemmings y Williams, 1978).

Se ha demostrado también que la detección de marca a nivel sistémico, después de la administración de proteínas radiomarcadas por vía oral, no proporciona información sobre si lo que se está detectando es la proteína marcada, fragmentos de ésta o marca libre; por lo tanto para poder asegurar que se había absorbido el Ag y no solamente la marca, se procedió a detectar este Ag por un método más específico, mediante una reacción Ag-Ac.

La técnica ELISA ha sido aplicada en la identificación de antígenos microbianos en diferentes líquidos biológicos y en la mayoría de los casos, ha demostrado ser sensible, específica y susceptible de ser adaptada para el serodiagnóstico (Palacios y col., 1978, Root y col., 1978, Grundy, 1982). La posibilidad de emplear el ELISA para la búsqueda de Ag circulante de E. histolytica en ratones inoculados oralmente, nos llevó en primer término a establecer las condiciones óptimas para el desarrollo de ésta prueba; esta primera etapa fue un prerequisite indispensable antes de su aplicación ya que el ensayo realizado directamente con el

suero problema llega a dar resultados erráticos, lo cual puede dar lugar a conclusiones equivocadas o a resultados de difícil explicación como ha sido demostrado por diversos autores (Chessum y Denmark, 1978, Wetherall y col., 1980). Nuestro sistema mostró una sensibilidad de 2 a 39 ng del Ag/ml de suero que es baja comparándola con la reportada por otros investigadores; esto podría deberse a que el Ac utilizado como Ac de captura y de revelado no se purificó por cromatografía de afinidad, lo cual se sabe que es un procedimiento que aumenta la sensibilidad en este tipo de ensayos (Hernández y col., 1982). Por otro lado, los resultados de los dos ensayos inmunoenzimáticos muestran una marcada dispersión dentro de los grupos experimentales en comparación con los controles (Fig. 4-5).

A pesar de que el ensayo desarrollado no mostró la sensibilidad necesaria para detectar cantidades mínimas de Ag amibiano en circulación, fue posible detectar el Ag en el 60% de los animales del grupo V.P. 30 min y en el 80% de los correspondientes al grupo V.P. 60 min en el primer experimento, y en el 20% del grupo V.P. 60 min y 12% del grupo V.A. 60 min del segundo experimento. Y en ninguno de los sueros obtenidos del grupo de animales controles se encontraron valores positivos.

Además el análisis de varianza de los resultados obtenidos nos indica que hay diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados.

Por otro lado, cabe mencionar que considerando las bajas concentraciones del Ag en el torrente sanguíneo es necesario

incrementar la sensibilidad del ensayo a través de la producción de un Ac antiambiano de mejor calidad o Ac monoclonal con alta afinidad para aumentar las posibilidades de detección de Ag circulante como ha sido observado en estudios epidemiológicos en humanos (Abd-Alla y col., 1993).

En cuanto al estudio histopatológico de los animales a los que se les dieron las amibas por vía oral no se observó daño tisular a nivel de la mucosa intestinal. Se sabe que en la amibiasis intestinal aguda, la invasión por el parásito ocurre durante las primeras etapas de interacción entre los trofozoítos y la mucosa del intestino; sin embargo, no se ha podido desarrollar un modelo experimental apropiado y reproducible para su estudio. Por otra parte, algunos investigadores utilizando modelos "in vitro", han demostrado daño tisular ocasionado por la interacción de trofozoítos amibianos con epitelios intestinales de animales (Mora-Galindo y col., 1982, Orozco y col., 1982). También Navarro-García y col., (1993), detectó daño tisular a los 60 minutos midiendo los efectos morfológicos y electrofisiológicos producidos por la interacción de lisados amibianos sobre el epitelio intestinal. Analizando esta información, se esperaría que la cantidad de lisado amibiano administrado a cada ratón produjera cierto daño tisular en la mucosa intestinal, ya que se han identificado una gran variedad de citotoxinas, factores citopáticos y enterotoxinas en dichos lisados amibianos. Sin embargo, hay que puntualizar que estos estudios fueron hechos "in vitro".

Por otro lado, estudios hechos "in vivo" han demostrado que la

secreción de moco, forma un microambiente protector sobre los epitelios intestinales que impide el acceso de la amiba hacia las células epiteliales (Leitch y col., 1985).

Chadee y Meerovitch, (1984) utilizando jerbos como modelos de amibiasis intestinal "in vivo" reportaron daño histológico a nivel de la mucosa cecal después de los 10 días de inoculación con trofozoítos de Entamoeba histolytica crecidos monoxenicamente. Sin embargo después se reportó que dicho modelo falló al no ser reproducible argumentando que la invasión previa con E. muris puede interferir en el subsecuente establecimiento de E. histolytica (Smith y col., 1985). Posteriormente Shibayana-Salas y col., (1992) utilizando este mismo modelo detectan lesiones microscópicas del epitelio intestinal, con discreta invasión de la lámina propia después de 24 hrs, lo cual es contradictorio con lo reportado por Chadee y Meerovitch, (1984). Esto nos muestra la gran problemática que se genera al no contar con un modelo animal adecuado y reproducible para el estudio de la amibiasis intestinal.

El no observar ninguna clase de lesiones en intestino por lo menos hasta el tiempo analizado y detectar el Ag en circulación es indicativo de que es posible la absorción de este Ag a través de la mucosa intestinal aún en ausencia de lesiones.

Sin embargo, aún queda por dilucidar el papel que desempeña la absorción de Ag de E. histolytica en la posible inducción de una respuesta inmune ya que es claro que en ciertas condiciones las proteínas de la dieta pueden funcionar como antígenos capaces de inducir la producción de anticuerpos a nivel intestinal como a

nivel sistémico.

También se ha determinado que la administración oral de trofozoítos amibianos puede inducir una respuesta secretora y también propiciar una respuesta de tipo sistémica, posiblemente como resultado de la migración de células formadoras de anticuerpos que drenan de los nódulos linfáticos o de la absorción del antígeno soluble hacia la circulación (Villarreal y col., 1992).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este modelo animal, sugieren que la absorción del antígeno amibiano puede ser una vía alterna para la inducción de una respuesta de anticuerpos sistémicos en la amibiasis. Además pone de manifiesto la necesidad de un estudio más minucioso de la respuesta de anticuerpos en la amibiasis intestinal asintomática, para reevaluar la seroepidemiología de esta enfermedad especialmente en áreas endémicas.

VIII.- R E F E R E N C I A S.

- 1.- Abd-Alla, M., Jackson, H., Gathiram, V., Ravdin, J., (1993): Differentiation of pathogenic E. histolytica infections from nonpathogenic infections by detection of Galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2845-50.
- 2.- Ackers, J. P., (1982) Immunology of amibas, giardia, and trichomonads. *Compr. Immunol.* 9: 403-18.
- 3.- Acosta, G., Barranco, C., Isibasi, A., Campos, R., (1982) Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 13 (Supl. 3): 51-65.
- 4.- Altamirano, G., Lopez, M., (1992): *Inmunología de las mucosas*, Distribuidora y Editora Mexicana S.A. México, D.F. pp. 67-75.
- 5.- Boonpucknanig, S., Lynraven, S., Nairn, C., Ward, A., (1967): Localization of Entamoeba histolytica antigen. *Nature.* 216: 1213-27.
- 6.- Brumpt, E., (1925): Etude sommaire de l'Entamoeba dispar n. sp. amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med. (Paris)* 94: 943-56. In Martínez-Palomo, A. (ed) *Amibiasis*, Medica Panamericana, México.
- 7.- Calderón, J., Muñoz, L., Acosta, H., (1980): Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. *J. Exp. Med.* 151: 184-93.
- 8.- Carrero, J.C., Diaz, M.Y., Viveros, M., Espinoza, B., Acosta, E., Ortiz-Ortiz, L. (1994): Human secretory immunoglobulin A anti- E. histolytica antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infection and Immunity.* 62: 764-67.
- 9.- Campos-Rodríguez, R., Andrade, P., Acosta, G., (1986): Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 17 (Supl. 1): 277-88.
- 10.- Caballero-salcedo, A., Viveros, M., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepulveda-Amor, J., Gutierrez, G., Ortiz-Ortiz, L. (1994): Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 : 412-19.

- 11.-Chadee, K., Meerovitch, E., (1984): The mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) as an experimental host for Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 47-54.
- 12.-Chessum, S., Denmark, D., (1978): Inconstant ELISA. Lancet. i: 161-76.
- 13.-Cuarón, A., Gordon, F., Landa, L., (1972): La evolución de la centelleografía en el diagnóstico del absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3 (Supl.2): 403-15.
- 14.-Del Muro, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W., Ortiz-ortiz, L., (1990): Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. J. Infect. Dis. 162: 1360-64.
- 15.-Diamantstein, J., Klos, M., Gold, D., Hahn, H., (1981): Interaction between Entamoeba histolytica and the immune system. J.Immunol. 126:2084-6.
- 16.-Diamond, S., Harlow, R., Cunnick, C., (1978): A new median for axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431-32.
- 17.- Dobell, C., (1928): Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. II. Description of the whole life-history of Entamoeba histolytica in cultures. Parasitology. 20: 357-412. In Martínez-Palomo, A. (ed) Amibiasis, Medica Panamericana, México.
- 18.-Flores-Barroeta, F., Saavedra, R., Velazco, F., (1970): Invasión de Entamoeba histolytica a diversos órganos y tejidos en sujetos humanos. Arch. invest. Méd. (Méx.) 1 (Supl. 1): 129-36.
- 19.- Gadasi, H., Kessler, E. (1983): Correlation of virulence and collagenolytic activity in E. histolytica. Infected. Immun. 39: 528-31.
- 20.-Gallagher, J., Goulding, J., Gibney, J., (1983): Acute and chronic immunological response to dietary antigen. Gut. 24: 831-35.
- 21.-González, A., Haque, R., Rehman. I., Aguirre, A., Jaramillo, C., Castañón, G., (1992): A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of Entamoeba histolytica. J.Clin. Microbiol. 30: 2807-13.
- 22.- Grundy, M.S., (1982): Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of Entamoeba histolytica trophozoite antigens in stool samples. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 396-400.

23.-Grundy, M.S., Cartwright-Taylor, L., Landin, L., (1983): Antibodies against Entamoeba histolytica in human milk and serum in Kenya. *J.Clin. Microbiol.* 17: 353-58.

24.-Guerrero, M., Riós, D., Landa, L., (1976): Interaction between trophozoites of Entamoeba histolytica and lymphocytes of patients with invasive amebiasis. In: Sepulveda, B., Diamond, L.S. (eds.) *Memorias de la conferencia Internacional Sobre Amibiasis*, México City: Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 6:529-39.

25.- Gutierrez-Trujillo, G., Sánchez, M., Sánchez, R., (1970): Influencia de la edad en las características del absceso hepático del niño. *Gac. Méd. Mex.* 100: 145-53.

26.-Gutierrez-Trujillo, G., Aubanel, M., (1972): Encuesta seroepidemiológica en niños de la ciudad de México. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 2: 371-76.

27.- Gutierrez-Trujillo, G. (1980): Características principales de la amibiasis en el niño. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 11 (Supl.1): 281-86.

28.-Healy, G.R., (1986): Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. *Rev. Infec. Dis.* 8: 239- 46.

29.-Hemmings, W.A., Williams, E.W., (1978): Transport of large breakdown products of dietary protein through the gut wall. *Gut.* 19: 715-23.

30.-Hernández, R., Hernández, O., Cervantes, M., Rodríguez, G., (1982): Identificación de Antígeno amibiano circulante en el hombre por análisis inmunoenzimático. *Desarrollo de la técnica.* *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 13 (supl. 3): 297-300.

31.-Hudson, C., Hay, F., (1989): Affinity techniques for molecules and cell. In: *Practical Immunology* Hudson, C. & Hay, C.F. (editors) (3th edition) Oxford, U.K. Blackwell Scientific publication. pp 61-65.

32.-Husby, J., Jensenius, C., Svehag, E., (1985): Passage of undegraded dietary antigen in to the blood of healthy adults. *Scand. J. Immunol.* 22: 83-92.

33.-Kobiler, D., Mirelman, D., (1981): Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayer of human cell. *J. Infectious Diseases.* 144: 539-46.

34.-Kraehenbuhl, J.P., Neutra, N.R., (1992): Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiological Reviews*. 72: 853-79.

35.-Landa, L., Aubanel, M., Segovia, E., (1972): Seroepidemiología de la amibiasis en adultos. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 3 (Supl. 2): 377-80.

36.-Leitch, G., Dickey, A., Udezulu, I. (1985): Entamoeba histolytica trophozoites in the lumen and mucus blanket of rat colons studied "in vivo". *Infection and immunity*. 47: 68-73.

37.-Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., Randal, J., (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75.

38.-Lushbaugh, B., Kairalla, B., Leadohl, B., Pittman, E., (1974): Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 248-54.

39.-Martínez, C.S., (1979): Coproanticuerpos en amibiasis intestinal. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 10: 121-26.

40.-Martínez-Palomo, A., (1982): The biology of Entamoeba histolytica. In: Brown, K. N. (ed.) *Tropical Medicine Research Studies*. Chichester, England: Research Studies Press, Jhon Wiley and sons. 161 pp.

41.-Martínez-Palomo, A., Martínez-Baez, M., (1983): Selective primary health care: *Rev. Infect. Dis.* 5: 1093-102.

42.-Mattern, F., Keister, B., Gaspar, A., (1978): Experimental amebiasis. III a rapid "in vitro" assay for virulence of Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 882-87.

43.-Meerovitch, E., Hartman, D., Ghadirian, E., (1978): Protective immunity and possible autoimmune regulation in amebiasis. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 9 (Supl. 1): 247-54.

44.-Meza, I., Dela Garza, M., Meraz, A., Gallegos, B., Tanimoto, M., Martínez-Palomo, A., (1986): Isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica isolates from asymptomatic carriers: use of gradient acrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (6): 1134-39.

45.-Michetti, P., Mahan, M., Slauch, M., Mekalanos, J., Neutra, M., (1992): Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen Salmonella typhimurium. *Infection and Immunity*. 60: 1786-92.

46.-Mora-Galindo, J., Martínez-Palomo, A., González, R., (1982): Interacción entre Entamoeba histolytica y epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 233-44.

47.-Mowat, A. M., (1987): The regulation of immune responses to dietary protein antigens. Immunology Today. 8: 93-98.

48.-Navarro-García, R., López-Revilla, R., Tsumi, V., (1993): Dose-and time-dependent functional and structural damage to the colon mucosa by Entamoeba histolytica trophozoite lysates. Parasitol Res. 79: 517-22.

49.-Ollerich, M., (1980): Enzyme immunoassays in clinical chemistry. J. Clin. Chem. Biochem. 18: 197-208.

50.-Orozco, E., Castelo, S., Martínez-Palomo, A., (1982): Detección del daño celular temprano producido por Entamoeba histolytica sobre epitelios. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 169-75.

51.-Orozco, E., De la Cruz, F., Rodríguez, A., (1988): Virulence related properties in Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed) Amibiasis: human infection by E. histolytica. New York, Jhon Wiley and Sons: 314-22.

52.-Paganelli, R., Levinsky, J., (1980): Solid phase radioimmunoassay for detection of circulating food protein antigens in human serum. J. Immunological Methods. 37: 333-41.

53.-Palacios, O., De la Hoz, R., Sosa, H., (1978): Determinación del antígeno amibiano en heces por el método ELISA para la identificación de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl.1): 339-48.

54.-Perez-Tamayo, R., (1989): Patología de la amibiasis. In: Martínez-Palomo, A. (ed) Amibiasis, Medica Panamericana, México. pp 42-78.

55.-Randall, G., Goldsmith, R., Shek, J., (1984): Use of the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for detection of E. histolytica antigen in fecal samples. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 593-95.

56.-Resano, F., Trujillo, J., Jiménez, G., (1982): Detección de antígeno amibiano por el método de ELISA en el suero de pacientes con absceso hepático. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 301-05.

57.-Root, D., Colex, F., Williamson, J., (1978): The development and standarization of an ELISA method for the detection of Entamoeba histolytica antigens in fecal samples. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 203-10.

58.-Salata, R., Cox, G., Ravdin, J., (1984): The Killing of virulent Entamoeba histolytica trophozoites by phytohemagglutinin-elicited citotoxic T-lymphocytes. Clin. res. 32: 365-76.

59.-Salata, R., Ravdin, J., (1986): Review of the human immune mechanisms directed against Entamoeba histolytica. Rev. Infec. Dis. 8: 261-72.

60.-Salata, R., Murray, W., Ravdin, J., (1987): Role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for Entamoeba histolytica trophozoites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 72-84.

61.-Sargeant, P.G., (1988): Zymodemes of Entamoeba histolytica. In: Ravdin, J. (ed.) Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica. John wiley & Sons, New York. 370-84.

62.-Savanat, T., Sabcharoen, A., Charoenpang, K., Tantiranich, S., (1974): Immunological tests in asymptomatic intestinal amebiasis. J. Trop. Méd. public. Health. 5: 359-64.

63.-Sawhney, S., Chakravarti, N., Jain, P., Vinayak, K., (1980): Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 26-29.

64.-Sepúlveda, B., (1980): Induccion de inmunidad antiamebiásica en primates subhumanos con antígeno lisosomal de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1): 245-50.

65.-Sepúlveda, B., (1982): Amebiasis: Host-Pathogen Biology. Rev. Infect. Dis. 4: 836-842.

66.-Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A., (1992): Early invasive intestinal amebiasis in mongolian gerbils. Arch. Med. Res. 23: 187-90.

67.-Skogh, T., (1982): Overestimate of ¹²⁵I-protein uptake from the adult mouse gut. Gut. 23:1077-80.

68.-Smith, J., Chadee, K., Meerovitch, E., (1985): Failure to establish experimental E. histolytica infection in mongolian gerbils naturally infected wit E. muris. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 875-76.

69.-Stern, L., Graybill, R., Drutz, J., (1984): Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 372-80.

70.-Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz, R., Perez, E., (1978): Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strain. *J. Exp. Med.* 148: 1137-45.

71.-Trissl, D. (1982): Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1154-84.

72.-Udall, N., Bloch, J., Fritze, L., Walker, A., (1981): Binding of exogenous protein fragments to native proteins. *Immunology.* 42: 251-57.

73.-Villarreal, B.B., Melendro, E.I., Ramos, F., Ximénez, C., (1992): Local and systemic antibody response in Balb/c mice immunized with Entamoeba histolytica trophozoites. *Arch. Med. Res.* 23: 69-72.

74.-Walsh, J.A., (1986 a): Amebiasis in the world. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 17 (Supl. 1): 385-89.

75.-Walsh, J.A., (1986 b): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Ifec. Dis.* 8: 228-38.

76.-Warshaw, A., Walker, W., Isselbacher, K., (1974): Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology.* 66: 987-92.

77.-Wetherall, C., Hallsworth, G., Mc Donald, J., (1980): Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Haemophilus influenzae type b antigen. *J. Clin. Microbiol.* 11: 573-80.

78.-Weltzin, R., Lucia-Jandris, P., Michetti, P., Fields, B., Kraehenbuhl, J., Neutra, M., (1989): Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cell. Demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J. Cell. Biology.* 108: 1670-85.

79.-Wold, A., Dahlgren, U., Hanson, L., Mattsby, I., (1989): Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. *Infec. and Immunity.* 57: 2666-73.

80.-Ximénez, C., Hernández, J., Melendro, E.I., Ramiro, M., (1990): Coproanticuerpos y anticuerpos séricos antiamebianos en la amebiasis intestinal aguda. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 21 (Supl. 1): 239-44.

81.-Yang, J., Peng, W., Yao, J., Chen, X., (1991): Immunological diagnosis of amoebic liver abscess. *Annals of Trop. Med. and Parasitology.* 85: 371-72.