



21  
2ey  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

COMPARACION DE LA RESPUESTA INMUNE  
CELULAR Y HUMORAL EN GERBOS (Meriones  
unguiculatos) INOCULADOS INTRACECALMENTE  
CON TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica*  
CEPA HM1 - IMSS.

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A I  
MIREYA FIGUEROA BARRON

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Comparación de la respuesta inmune celular y humoral en  
carbos ( Meriones unguiculatus ) Inoculados  
intracelalmente con trofozoítos de Entamoeba histolytica  
cepa 18/1-IMSS.

que presenta la pasante: Mireya Figueroa Barrón  
con número de cuenta: 9131625-7 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de Julio de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Pablo Martínez Labat

VOCAL Dr. Marco A. Vega López

SECRETARIO M. en C. Fernando Alba Hurtado

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Gloria Ortiz Gasca

SEGUNDO SUPLENTE C.P.B. Victor M. Zandajas Buitrón

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres : Constantino Figueroa Salgado y A. Tomasa Barrón de Figueroa, por su ejemplo, amor y apoyo los cuales han sido la fuente de motivación para la realización de una más de mis metas.**

**A mis hermanos : Edgar , Gabriela ,Claudia y Lorena , por su cariño y ayuda en la realización de mi trabajo.**

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Inmunología del Hospital Infantil de México, quienes me brindaron su apoyo en la realización de éste trabajo.

A mi coasesor y estimado amigo Q.F.B. Saúl Torres Alcántara por su colaboración en la elaboración y desarrollo de mi tesis.

A mi director de tesis M. en C. Fernando Alba Hurtado por su apoyo y colaboración para su diseño.

A mis maestros y compañeros de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su ayuda, motivación y compañía a lo largo de mi carrera.

## INDICE GENERAL

	Pág.
1 - Abreviaturas .....	II
2 - Lista de figuras y gráficos .....	IV
3 - Lista de tablas .....	V
4 - Resumen .....	1
5 - Introducción .....	2
6 - Planteamiento del problema .....	17
7 - Objetivos .....	19
8 - Materiales y métodos .....	20
9 - Resultados .....	27
10.- Discusión .....	53
11.- Conclusiones .....	56
12.- Apéndice de reactivos .....	57
13.- Bibliografía .....	61

## ABREVIATURAS

Ac .....	Anticuerpo
Ag .....	Antígeno
Ci .....	Curies
CPM .....	Cuentas por minuto
ELISA .....	Ensayo Inmunoenzimático
E. histolytica .....	Entamoeba histolytica
ET .....	Antígeno amibiano extracto total
IgA .....	Inmunoglobulina A
IgE .....	Inmunoglobulina E
IgM .....	Inmunoglobulina M
Ig's totales .....	Inmunoglobulinas totales
lt.....	litro
uCi .....	micro curies
ug .....	microgramos
ul .....	microlitros
um .....	micrometros
ul .....	microlitros
mM .....	milimolar
ml .....	mililitro
nm .....	nanómetro
OMS .....	Organización Mundial de la Salud
P-15 .....	Antígeno amibiano fracción membranal P-15
pHMB .....	para-hidroximercuribenzoato
PMN .....	polimorfonucleares

SAF .....	Solución amortiguadora de fosfatos
SAF-ASB .....	Solución amortiguadora de fosfatos-albúmina sérica bovina
SAF-TWEEN .....	Solución amortiguadora de fosfatos-tween
SFB .....	Suero fetal bovino
SSF .....	Solución salina fisiológica
3H-Td .....	Timidina tritiada



## LISTA DE FIGURAS Y GRAFICAS

	Pág.
Fig. 1 Trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	6
Fig. 2 Gerbo ( <i>Merion unguiculatus</i> ) .....	16
Fig. 3 Placas de inmunoelectroforesis .....	27
Gráf. 1. Determinación de IgA en sueros de rata y gerbo .....	29
Gráf. 2. Determinación de IgG en sueros de rata y gerbo .....	31
Gráf. 3. Determinación de IgM en sueros de rata y gerbo .....	33
Gráf. 4. Determinación de Ig's totales en sueros de rata y gerbo .....	35
Gráf. 5. Determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de .....	38
rata y gerbo hacia P-15.	
Gráf. 6. Determinación de Ig's totales en sueros de gerbo .....	40
hacia P-15.	
Gráf. 7. Determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de .....	43
rata y gerbo hacia ET.	
Gráf. 8. Determinación de Ig's totales en sueros de gerbo .....	45
hacia ET.	
Gráf. 9. Respuesta de linfocitos de bazo de gerbos hacia .....	48
P-15 y ET.	
Gráf. 10. Respuesta de linfocitos de bazo e Ig's totales de .....	50
gerbos hacia ET.	
Gráf. 11. Respuesta de linfocitos de bazo e Ig's totales de .....	51
gerbos hacia P-15.	

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Absorbancias en la determinación de IgA en sueros de rata y gerbo.	28
Tabla 2.- Absorbancias en la determinación de IgG en sueros de rata y gerbo.	30
Tabla 3.- Absorbancias en la determinación de IgM en sueros de rata y gerbo.	32
Tabla 4.- Absorbancias en la determinación de Ig's totales en sueros de rata y gerbo.	34
Tabla 5.- Absorbancias en la determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de gerbo hacia P-15.	37
Tabla 6.- Absorbancias en la determinación de Ig's totales en sueros de gerbo hacia P-15.	39
Tabla 7.- Absorbancias en la determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de gerbo hacia ET.	42
Tabla 8.- Absorbancias en la determinación de Ig's totales en sueros de gerbo hacia ET.	44
Tabla 9.- CPM en linfocitos de bazo de gerbos hacia ET y P-15.	47
Tabla 10.- CPM en linfocitos de bazo y absorbancias para Ig's totales de gerbos hacia ET	49
Tabla 11.- CPM en linfocitos de bazo y absorbancias para Ig's totales de gerbos hacia P-15.	52

## RESUMEN

El propósito en el presente trabajo fue estudiar la respuesta inmunitaria humoral y celular en gerbos (*Meriones unguiculatus*) provocada por la inoculación intracecal de trofozoitos de *E. histolytica*.

Se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa axénica HM1-IMSS. Se trabajó con 35 gerbos machos los cuales fueron divididos en 5 grupos. Catorce animales fueron inoculados con  $5 \times 10^5$  trofozoitos en el ciego, otros catorce con SSF y 7 se emplearon como grupo de gerbos sanos. Posteriormente se obtuvieron suero y linfocitos de bazo a los 0, 10 y 30 días post-inoculación. La determinación de los isotipos de inmunoglobulinas séricas se realizó por análisis inmunoenzimático de tipo indirecto con anti-inmunoglobulinas de rata, la respuesta celular mediante transformación blastoide en linfocitos de bazo por incorporación de timidina tritiada. Las respuestas se evaluaron hacia dos antígenos amibianos, antígeno fracción membranal P-15 y antígeno extracto total.

Se identificaron anticuerpos anti-amiba del isotipo IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales cuyos niveles se incrementaron conforme el periodo post-inoculación ( $p < 0.05$ ). La respuesta celular se comportó de manera semejante, aumentando conforme el periodo de inoculación ( $p < 0.05$ ). Al comparar ambas respuestas se encontró, que la respuesta humoral fue mayor hacia el antígeno amibiano extracto total y la respuesta celular hacia el antígeno fracción membranal P-15 ( $p < 0.05$ ).

## INTRODUCCION

### Amibiasis.

La amibiasis es definida por la OMS como la situación en que se porta el parásito *E. histolytica*, con manifestaciones clínicas o sin ellas . En la mayoría de los individuos el parásito vive como comensal y en algunas ocasiones, por mecanismos aún desconocidos, causa invasión de la pared intestinal provocando el desarrollo de la infección (24,75).

La amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal y cuando se vuelve extraintestinal puede producir una amplia variedad de alteraciones anatómicas, afectando principalmente el hígado. Cuadros clínicos bien definidos muestran, colitis ulcerativa amibiana, megacólon tóxico o disenteria amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana . La amibiasis hepática se caracteriza por la presencia de una o más áreas grandes de necrosis o abscesos. La amibiasis extraintestinal puede afectar todos los órganos del cuerpo; esto llega a suceder en muy raras ocasiones y generalmente ocurre en sujetos gravemente parasitados (65).

La infección provocada por *E. histolytica* ocurre en todo el mundo particularmente en África, América del Sur, India y México. La morbilidad y mortalidad son significativas, aproximadamente 10% de la población mundial padecen esta enfermedad (63,74).

La amibiasis intestinal es una enfermedad muy frecuente en México, aproximadamente del 10 al 20% de la población es portadora de éste parásito. La amibiasis tiene caracteres endémicos en la República Mexicana, con zonas de predominio más elevado, que no tienen relación alguna con el clima. La exposición al contacto infeccioso con *E. histolytica* ocurre en todas las edades, con ligero predominio en la edad escolar. En pacientes adultos el 2% desarrollan absceso hepático amibiano. Las malas condiciones sanitarias y la falta de educación higiénica favorecen su propagación, de la misma forma en que sucede con otras enfermedades infecciosas (9,35,45).

### Características y morfología de *Entamoeba histolytica*.

La *E. histolytica* es una amiba patógena. Al parecer es uno de los organismos eucarióticos más primitivos.

La actividad dinámica y el pleomorfismo de los trofozoitos o formas móviles están basados en una disposición citoplásmica sencilla. Son sensibles a los cambios físico-químicos. La variación local de pH, osmolaridad y potencial redox pueden alterar la forma y motilidad de la célula. El enfriamiento a menos de 37° C provoca la disminución de la motilidad, las amibas se vuelven esféricas y se separan de la superficie, mientras que aquellas que forman grumos tienden a disgregarse. Este protozooario pequeño (10 a 40 µm), inicia su ciclo vital cuando el hospedero ingiere alimentos y bebidas contaminados con quistes. El parásito se libera en el intestino delgado (ileón) y bajo circunstancias aún desconocidas, puede invadir la mucosa intestinal y eventualmente destruir prácticamente cualquier tejido del organismo humano, desde los epitelios de recubrimiento, hasta órganos sólidos y huesos. Al mismo tiempo el parásito evade con éxito las respuestas de defensa moleculares y celulares del hospedero humano y encuentra los requerimientos necesarios para su multiplicación (52).

Tiene propiedades de superficie que la diferencian de cepas no patógenas como: aglutinar en presencia de la lectina concanavalina A y una alta tasa de eritrofagocitosis.

Posee un sistema vacuolar el cual no ha sido explorado con detalle, pero por medio del microscopio electrónico de transmisión se han identificado varios tipos de vacuolas citoplásmicas como: vacuolas fagocíticas, autofágicas, de micropinocitosis, de macropinocitosis, además de lisosomas primarios y secundarios y cuerpos residuales. Los lisosomas de las amibas difieren de las células eucarióticas superiores en que las enzimas de las primeras no se encuentran en forma soluble dentro de las vacuolas, sino que son parte integral de la membrana (24).

A pesar de la notable motilidad y elasticidad de los trofozoitos, se sabe muy poco sobre la organización estructural de su citoesqueleto. Se sabe que éste participa en la adherencia hacia células blanco mediante la formación de microfilamentos y energía

metabólica, además de un receptor amibiano específico, una lectina galactosa específica que se encuentra en la membrana (50). La adherencia de trofozoitos es fundamental para la lisis celular, ya que en experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que la adherencia a la mucosa es un paso preliminar a la invasión intestinal (4,44,59,68). Este efecto puede ser inhibido mediante el uso de carbohidratos o anticuerpos monoclonales, reduciendo así el efecto citopático de las amibas (6,48,66,69).

La membrana plasmática de los trofozoitos mide aproximadamente 10 nm de espesor. Esta membrana es más gruesa que la membrana plasmática de las células de mamíferos, muchas de las cuales miden aproximadamente 8 nm. La membrana plasmática de los trofozoitos cultivados de *E. histolytica*, está rodeada por una cubierta superficial. Esta cubierta es de interés debido a que contiene algunas de las proteínas amibianas reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario del hospedero durante el establecimiento de la amibiasis invasiva. Es posible que la virulencia de las amibas pueda estar relacionada con la composición y propiedades de los componentes de la cubierta de superficie (57). Estos componentes son liberados al medio en forma de microexudado, lo que sugiere que posee antígenos solubles que son constantemente eliminados al medio extracelular. La interacción de ciertos componentes de la superficie celular con algunos ligandos produce movilización rápida de los complejos formados. Este fenómeno de formación de casquete ha sido analizado en amibas patógenas, la movilización y liberación subsecuente de este casquete puede hacer que las amibas sean menos susceptibles a la respuesta inmune humoral del hospedero (10).

La *E. histolytica* presenta diferentes morfologías dependiendo del ambiente en que se encuentre y son:

**Trofozoitos:** es la forma móvil, se multiplican por fisión binaria y se enquistan, produciendo quistes tetranucleados típicos, después de dos divisiones nucleares sucesivas de quistes uninucleados. Es la fase parásita (fig. 1) (52).

**Prequite:** En éste estadio la *E. histolytica* se multiplica por un proceso de división binaria, después de algunas divisiones la motilidad de las amibas disminuye y los organismos muestran menos pseudópodos, se hacen redondas y más pequeñas, pierden su pared y se

puede observar el núcleo, éste contiene vacuolas de glucógeno que aportan energía durante la maduración (81).

**Quiste:** El prequiste es seguido por la secreción de una membrana gruesa y dos o tres divisiones adicionales del núcleo, transformándose en quiste. Los quistes son redondos o ligeramente ovalados, su diámetro varía de 8 a 20  $\mu\text{m}$ . En preparaciones no teñidas y vistas al microscopio, aparecen como cuerpos hialinos con pared refráctil, el citoplasma es incoloro, los cuerpos cromatoidales y los núcleos se observan claramente al teñir la muestra con yodo, que también tiñe el glucógeno de color pardo rojizo. La pared está compuesta por elementos fibrilares que forman una red compacta, constituida a su vez por varias capas concéntricas (53).

**Amiba metaquística:** de cada quiste emerge una amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez ocho trofozoitos uninucleados después de la división en intestino delgado (52).

Actualmente se carece de información detallada sobre los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, debido a que no se ha logrado diseñar un medio de cultivo en el que se reproduzcan estas formas de resistencia en condiciones axénicas.

La *E. histolytica* cuenta con enzimas glucolíticas inusuales que solamente se habían encontrado en bacterias, tiene patrones de isoenzimas (zimodemos) que pueden participar en la patogenicidad del parásito (24,49). Además es un anaerobio facultativo, este metabolismo puede ser ventajoso para el parásito al permitirle cambiar del ambiente de la luz intestinal donde la presión del oxígeno es reducida, al que encuentra al invadir órganos sólidos con abundante aporte sanguíneo.

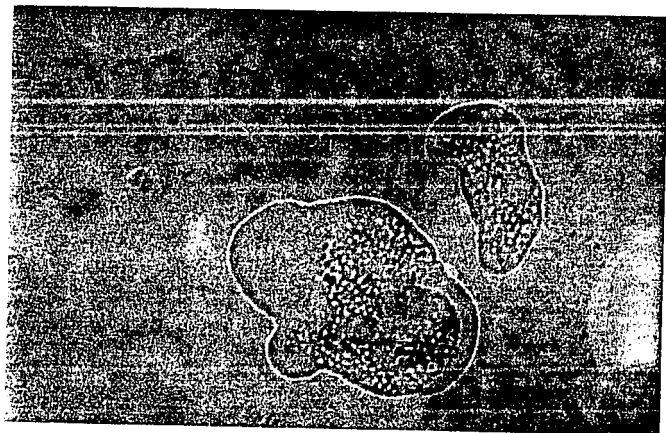


Figura 1. Trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

#### Respuesta inmune en la amibiasis.

Las investigaciones sobre la inmunología de la amibiasis son de época reciente y la gran mayoría de ellas pertenece a la última década. Anteriormente hubo algunas contribuciones de interés; pero es sobre todo a partir de la obtención del antígeno amibiano de cultivos axénicos de *E. histolytica* (28), cuando los estudios inmunológicos acerca de la amibiasis logran notables avances. Se ha demostrado que las reacciones inmunitarias hacia la amibiasis se ajustan a los principios generales de la inmunología, es decir, son reacciones



semejantes a las que ocurren en cualquier otra infección, participan tanto los fenómenos de inmunidad humoral dependientes de anticuerpos y complemento, como los de inmunidad celular dependientes de linfocitos T (81,92).

#### **Interacción entre *Entamoeba histolytica* y neutrófilos.**

En la infección por *E. histolytica*, la característica más importante es la invasión de los tejidos.

Los factores responsables de la patogénesis de la infección invasiva pueden deberse a la virulencia del parásito y a los mecanismos de defensa del hospedero. La primera línea de defensa inmune son los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (50).

Se han realizado estudios sobre estas interacciones en humanos utilizando cepas axénicas de *E. histolytica* aisladas de pacientes con amibiasis invasora. La cepa patógena axénica HM1-IMSS lisa a los neutrófilos debido a que provoca cambios en su membrana, su desgranulación y la muerte del neutrófilo sin que la viabilidad de la amiba se vea afectada (63,82).

En experimentos con varias cepas amibianas axénicas se observó, que cepas patógenas eliminan a los neutrófilos, mientras que cepas no patógenas como la cepa Laredo son eliminadas por neutrófilos sin ningún problema (26,50,82).

Se ha observado que los productos de desgranulación de los neutrófilos contribuyen en la destrucción de hepatocitos que están en contacto con trofozoitos de *E. histolytica* y/o a la lisis de células que se encuentran a su alrededor. Los neutrófilos participan en los estados iniciales de la patogénesis en absceso hepático amibiano en humanos (82).

## El complemento en la amibiasis.

El complemento afecta a bacterias y protozoarios mediante dos mecanismos: la opsonización y la citólisis directa (12).

En algunos experimentos se ha demostrado que el suero humano sin anticuerpos es capaz de destruir trofozoitos de *E. histolytica* (61).

Cepas axénicas de *E. histolytica* activan ambas vías del complemento. La vía alterna del complemento es activada sin la presencia de anticuerpos y la vía clásica con ellos, provocando la muerte rápida de los trofozoitos y la inhibición del crecimiento amibiano *in vitro*. La activación es debida a la presencia del factor C3 sobre la lisis de trofozoitos. La cinética y magnitud de la disposición y lisis indican que bajo ciertas condiciones, la vía clásica del complemento juega un papel importante en la respuesta hacia el parásito (11,61).

El complemento es un importante factor en la diseminación de la amibiasis. Esto ha sido demostrado en hámsters previamente descomplementados utilizando veneno de cobra, los cuales posteriormente fueron inoculados intrahepáticamente con trofozoitos de *E. histolytica* y comparados con un grupo testigo, encontrando que en los animales en que se utilizó el veneno de cobra las lesiones hepáticas fueron mayores y con metástasis a otros órganos. Este tratamiento no alteró la respuesta inmune humoral hacia las amibas, indicando que el efecto sobre el absceso hepático amibiano en hámster depende de los niveles del complemento que estén presentes en la infección causada por el protozoario (14).

En trabajos realizados en pacientes con absceso hepático amibiano se ha tratado de estudiar el papel del complemento en este padecimiento, sin embargo los resultados en humanos difieren a los encontrados en hámster ya que la cantidad de complemento en estos pacientes varía en cada individuo, en algunos los niveles aumentan y en otros disminuyen (14).

Se ha encontrado que las cepas patógenas de *E. histolytica* no activan la vía alterna del complemento, estos resultados podrían permitir especular que las amibas que son capaces de evitar la activación del complemento por esta vía, son también capaces de invadir el intestino, llegar al torrente sanguíneo y localizarse en los sitios extraintestinales, mientras

que las cepas amebianas que activan el complemento por la vía alterna serían destruidas rápidamente en sus intentos por invadir órganos blanco (46).

### **Respuesta humoral en amebiasis.**

La inmunidad humoral se caracteriza por la presencia de anticuerpos circulantes específicos que se pueden identificar por medio de diversas técnicas para reacciones serológicas. La presencia de antígenos o agentes patógenos en la luz intestinal puede provocar una respuesta inmune local o sistémica (1,62).

En la amebiasis invasora se han encontrado anticuerpos circulantes específicos anti-ameba principalmente de clase IgG e IgM (1).

Se ha demostrado la existencia de anticuerpos específicos de clase IgG contra algunos antígenos de la membrana celular y glicocalix de trofozoitos de *E. histolytica*. Sin embargo, también se han identificado anticuerpos que pertenecen a otras clases de inmunoglobulinas como IgE e IgA (82). En algunos estudios se han encontrado anticuerpos de la clase IgM e IgA en las secreciones intestinales de pacientes con absceso hepático amebiano. Esto sugiere la existencia de una respuesta inmune local durante este padecimiento. También se ha demostrado la presencia de IgA específica en leche y calostro humano, así como en líquido intestinal (2,7).

Se ha encontrado que la IgA secretora humana tiene un alto contenido en carbohidratos como la N-acetil galactosamina, la cual es reconocida por el receptor tipo lectina para eritrocitos presente en la membrana de la ameba provocando su inhibición (90,91). De esta manera el calostro y líquido intestinal rico en anticuerpos IgA secretorios, pueden inhibir a través de este mecanismo, la adherencia de las amebas a las células epiteliales del intestino de un hospedero (1).

En pacientes asintomáticos el desarrollo de estos anticuerpos es raro, en general se acepta que altos títulos de anticuerpos circulantes son indicativos de amebiasis invasora. Los

títulos de anticuerpos van disminuyendo paulatinamente después de que los pacientes sanan, sin embargo pueden encontrarse títulos de anticuerpos circulantes aún después de varios años de haber padecido la infección (64).

Los anticuerpos séricos no son protectores, puesto que la amibiasis invasora se presenta aún en personas con altos títulos de anticuerpos. En estudios *in vitro* se ha descubierto que suero humano inmune y la gammaglobulina aislada del propio suero tienen efecto inhibitor en el desarrollo de cultivos de *E. histolytica*. La gammaglobulina comercial no tiene este efecto inhibitor. Además el suero inmune neutraliza la virulencia de cultivos de amibas patógenas y tiene efecto citolítico sobre los trofozoítos (22,80).

En animales de experimentación se ha encontrado la producción de anticuerpos anti-amiba provocada por la inoculación o inmunización de éstos con antígenos amibianos (15).

En hámster la inyección de suero humano confiere protección parcial, probablemente del tipo de inmunidad pasiva, contra la inoculación intrahepática de *E. histolytica* patógena (79).

#### **Inmunidad mediada por células.**

La inmunidad mediada por células ha sido estudiada por varios métodos: hipersensibilidad en la piel, proliferación de linfocitos T *in vitro* con antígenos amibianos (38), respuesta inmune mediada por células durante la amibiasis invasora (33) y la producción de un factor inhibitor de macrófagos (MIF) (25).

En algunos estudios se ha encontrado que en la etapa inicial de la enfermedad, los pacientes con absceso hepático amibiano presentan reacciones cutáneas tardías en la mayoría de los casos. Sin embargo las mismas reacciones persisten en la mayor parte de los pacientes después de su curación (46). Similares resultados se han obtenido con la prueba de la inhibición de la migración de macrófagos. La prueba es generalmente negativa antes de iniciar el tratamiento y positiva después de la curación. En hámster con amibiasis hepática

esta prueba da resultados comparables, (71). En cobayos las primeras observaciones de hipersensibilidad se obtuvieron al ser inoculados con *E. histolytica* (8).

Otra prueba *in vitro* para estudiar la existencia de inmunidad celular es la transformación blastoide de los linfocitos bajo el estímulo de un antígeno específico. En pacientes con absceso hepático amibiano en la fase inicial de la enfermedad se encuentra baja respuesta proliferativa blastógena de linfocitos incubados con antígeno amibiano, mientras que en fase de recuperación la respuesta aumenta (31,38).

Los datos anteriores indican que en la fase inicial de la enfermedad existe una disminución de la respuesta inmune celular y en la etapa de curación la respuesta inmune celular se manifiesta favoreciendo la recuperación del paciente (21,33,76).

Se ha determinado que fracciones amibianas ricas en una lectina inhibible con N-acetil-D-galactosamina inducen gran actividad proliferativa en linfocitos de pacientes recuperados de amibiasis aguda invasiva (76).

En otros trabajos se ha encontrado que en los linfocitos T de pacientes no infectados se produce proliferación por medio de proteínas solubles amibianas de cultivos axénicos, pero no proliferación de linfocitos B. Esto ha sido comprobado al estudiar la respuesta mitogénica con proteínas amibianas y al mismo tiempo comparar la respuesta con un mitógeno, la concanavalina A (mitógeno para linfocitos T). La respuesta mitogénica de los linfocitos es mayor con proteínas amibianas que con concanavalina A, esto sugiere que las proteínas amibianas se unen a un gran número de receptores de los linfocitos T activándolos ó activando diferentes subpoblaciones (36,37,55).

#### **Modelos animales para el estudio de amibiasis experimental.**

A pesar de los estudios clínicos no se ha aclarado la reinfección constante de los individuos infectados por *E. histolytica*, por ello se ha tratado de reproducir la infección en animales de laboratorio.

En un principio a los animales se les administraban quistes por vía oral . Posteriormente se intentó el enquistamiento de trofozoitos *in vitro* sin obtener buenos resultados, ya que hasta la fecha no se ha encontrado el medio de cultivo adecuado para el desarrollo de quistes de amiba (13).

Actualmente los animales de laboratorio que se utilizan para el estudio de la amibiasis son infectados mediante la inoculación directa de trofozoitos en el intestino grueso o en el hígado (16,18).

Las primeras investigaciones se realizaron con perros y gatos obteniéndose importantes resultados, como el hecho de que las heces disintéricas que contienen trofozoitos no infectan a otros animales cuando se les administran oralmente, mientras que los quistes administrados por la misma vía sí producen lesiones intestinales. Actualmente el uso de estos animales es limitado, debido a la dificultad para manipularlos, la falta de uniformidad e insuficiente número de animales (87).

Los roedores son utilizados actualmente con mayor frecuencia como modelos para el estudio de la amibiasis experimental. Sin embargo se ha observado en general que los animales adecuados para amibiasis hepática no lo son para amibiasis intestinal. Debido a ello los animales empleados en el estudio de amibiasis son elegidos por su susceptibilidad hacia las diferentes manifestaciones de infección amibiana.

Actualmente los animales más utilizados para estos estudios son: ratas, ratones, cobayos, hamsters y gerbos.

#### **Ratas.**

Las ratas han sido utilizadas desde hace muchos años en estudios sobre amibiasis. En 1946 Jones y cols. (41) infectaron ratas recién destetadas al inocular amibas por vía intrarectal e intracecal. Los trofozoitos inoculados provenían de cultivos mixtos o de gatos previamente infectados. Con éste estudio se logra implementar el primer sistema para medir las lesiones intestinales amibianas (41). Posteriormente se realizaron trabajos para evaluar la virulencia de *E. histolytica* sobre diferentes cepas de ratas, en las cuales se encontró una mayor susceptibilidad en ratas Wistar que en ratas Sherman. Esto demostró que la genética

posiblemente juega un papel importante en el hospedero ante la invasión por *E. histolytica* (39,95)

#### **Ratón.**

Se ha encontrado que los ratones presentan baja susceptibilidad y variabilidad de respuesta ante la infección amibiana. Westapal en 1970 (34,54), encontró que los ratones no tienen resistencia natural a la amibiasis y que el establecimiento de la infección depende de la cepa de amiba que sea utilizada (97). Estudios realizados por otros investigadores (34,54) han demostrado que en ratones la infección amibiana es muy difícil de reproducirse, por lo que estos animales son muy poco empleados en amibiasis experimental.

#### **Cobayos.**

Carrera y Faust en 1949 (13) al inocular en la región ileo-cecal un cultivo monoaxénico de *E. histolytica* produjeron úlceras necróticas en el intestino grueso de cobayos.

En otras investigaciones se ha encontrado que las lesiones intestinales inducidas en cobayos con *E. histolytica* son similares a las encontradas en el material de biopsias de pacientes con amibiasis intestinal (67).

También se ha encontrado que trofozoitos de *E. histolytica* de cultivos monoxénicos se establecen en el hígado de cobayo, solamente cuando los niveles de colesterol se encuentran anormalmente elevados (8).

Por otro lado los abscesos hepáticos amibianos producidos en cobayo son menos severos que los observados en el hámster (28).

#### **Hámster.**

En 1951 Reinertson y Thompson (71) produjeron abscesos hepáticos en hámsters al inocular intrahepáticamente trofozoitos de *E. histolytica* de cultivos axénicos y monoxénicos, encontrando que con ambos tipos de cultivo los animales desarrollaban absceso hepático amibiano. Con esto descartaron la idea de que la asociación de bacterias con los trofozoitos provocaba mayor patogenicidad y por ésta razón se producía absceso

hepático. En estudios posteriores se evaluó la respuesta celular en absceso hepático experimental encontrándose que la inmunidad mediada por células timo dependientes juega un papel importante en la respuesta hacia la infección con *E. histolytica* (32,72).

Tsutsumi y cols. en 1984 (84), concluyen que el hámster es el animal de experimentación que se recomienda para diferentes estudios relacionados con amibiasis hepática, por presentar una alta susceptibilidad a la infección, así como lesiones uniformes e histológicamente similares a las observadas en humanos. En contraste, las lesiones intestinales amibianas no se reproducen fácilmente en este animal.

### **Gerbos.**

En gerbos el primer reporte de su uso en procesos patológicos producidos por *E. histolytica* fue realizado por Diamond y cols. (27). Ellos estudiaron las lesiones hepáticas producidas por la inoculación *in situ* de trofozoítos y observaron una menor virulencia que en el hámster, independientemente del sitio de inóculo.

En 1984 Chadee y Meerovitch (17) encuentran que el daño producido por trofozoítos inoculados en hígado es debido a una respuesta inflamatoria aguda. Posteriormente Shibayama y cols. estudian la morfología de las lesiones en gerbos inoculados intrahepáticamente con trofozoítos de *E. histolytica*, concluyendo que la necrosis de los hepatocitos puede ser debida al contacto directo con las amibas, aunado a los productos liberados por la lisis de células inflamatorias como se ha observado en hámster (83).

Debido a que el gerbo es susceptible al desarrollo de la amibiasis experimental se ha empleado también como modelo para el estudio de la amibiasis intestinal experimental.

Chadee y cols. en 1985 (18, 20) estudiaron la infección amibiana en gerbos inoculando trofozoítos de *E. histolytica* de una cepa axénica por vía intracecal e intrahepática, sacrificando a los animales a los 10 y 30 días post-inoculación. En la infección hepática encontraron granulomas y abscesos que aumentaron en volumen hacia los 30 días post-inoculación. En la infección cecal observaron inflamación y daño en el tejido, presentando microerosiones en la mucosa superficial y lesiones ulcerativas, aún cuando se



encontraron muy pocas amibas en el tejido. El daño fue más severo conforme aumentaba el periodo post-inoculación. Esto indica que existen factores que provocan resistencia y el subsecuente control de la infección. La hemorragia local, el edema, el daño en epitelio integlandular, así como los cambios celulares en diferentes planos del tejido cecal, se relacionan con la descripción de la lesión difusa y la lesión no específica reportada en amibiasis intestinal aguda en humanos.

Los antígenos de este parásito, las enzimas y otros metabolitos pueden alterar específicamente la distribución de células inmunocompetentes en órganos linfoides sistémicos o locales. Durante el desarrollo de la amibiasis intestinal, las lesiones y el inicio de la proliferación en áreas paracorticales de ganglios linfáticos mesentéricos es seguida por la disminución de células T. Esto sugiere que los linfocitos T pueden controlar el desarrollo de las lesiones cecales (18,42,85).

Las amibas obtenidas de casos asintomáticos de amibiasis pueden colonizar el ciego de gerbos, sin embargo el desarrollo de amibiasis 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 (19). Sin embargo los protozoarios y las bacterias del ciego pueden afectar el crecimiento y la colonización de los trofozoítos (16).

Debido a los reportes mencionados anteriormente, cuyos hallazgos histopatológicos indican que el gerbo sufre la infección amibiana en forma semejante al humano, es necesario estudiar y ampliar los aspectos inmunológicos entre la relación hospedero-parásito, con la expectativa de conocer si el gerbo pudiera ser un modelo apropiado para el estudio de la amibiasis intestinal ( Fig. 2 ).

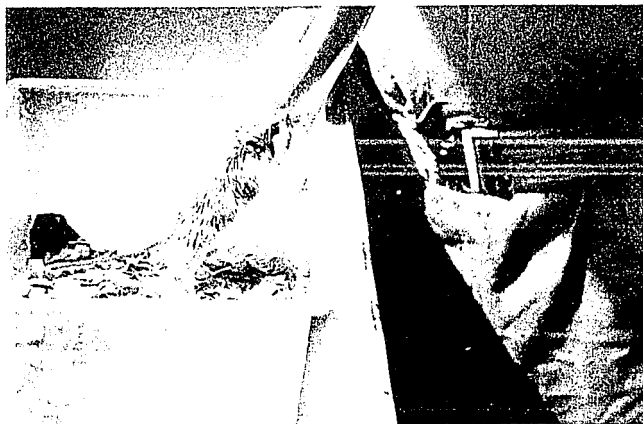


Figura 2. Gerbo (*Merion unguiculatus*).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La amibiasis es una enfermedad frecuente en nuestro país, sin embargo sólo algunos individuos infectados con *E. histolytica* desarrollan colitis amibiana y con menos frecuencia absceso hepático amibiano (24).

El estudio de este padecimiento se encuentra limitado debido a que hasta la fecha no se ha encontrado un modelo experimental que permita el estudio de amibiasis intestinal y hepática con manifestaciones similares al humano y que permita conocer los factores que desencadenan la virulencia del parásito y la respuesta inmune del hospedero.

Diferentes autores han encontrado que la manifestación de la enfermedad y el grado de respuesta inmune varían dependiendo del modelo experimental.

Actualmente se han realizado diversos estudios de amibiasis hepática en gerbos (*Meriones unguiculatus*), en los cuales han encontrado que la infección provocada en este animal se manifiesta en forma aparentemente semejante a la observada en humanos (16, 17, 83).

Sin embargo se conoce muy poco sobre la respuesta inmune del gerbo ante la infección intestinal amibiana.

El propósito de este trabajo es adicionar más datos que nos permitan conocer los aspectos inmunitarios en este probable modelo. El estudio pretende valorar la respuesta humoral y celular en el gerbo ante los antígenos amibianos fracción membranal P-15 y extracto total, posterior a un inóculo intracecal de trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS. Para la determinación de anticuerpos anti-amiba, no existen actualmente antiseros contra inmunoglobulinas de gerbo, sin embargo debido a una comunicación personal con el Dr. G. Acosta (ESM-IPN) y el Dr. J.P. Vaerman de la Universidad de Louvain en Bélgica, en la cual comentaron una reacción cruzada entre las inmunoglobulinas de rata y gerbo, fue que se decidió estudiar como se desarrollaba la respuesta humoral en este animal, mediante la determinación de anticuerpos anti-amiba en suero empleando para ello

anti-inmunoglobulinas de rata. La respuesta celular se evaluó mediante técnicas de transformación blastoide de linfocitos de bazo por incorporación de timidina tritiada.

## OBJETIVOS

- Estudiar la respuesta inmunitaria en gerbos (*Meriones unguiculatus*) a 0, 10 y 30 días post-inoculación intracecal de trofozoitos de *E. histolytica*.
- Determinar el nivel de anticuerpos en suero hacia dos antígenos amibianos; extracto total y fracción membranal P-15 mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).
- Tipificación del isotipo de anticuerpos anti-amiba en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*.
- Observar si existe una relación entre la respuesta inmunitaria humoral con la respuesta de linfocitos de bazo encontrada en los mismos gerbos, medida por la incorporación de 3H-Td mediante una microtécnica de transformación blastoide.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales de experimentación.**

Se utilizaron 35 gerbos machos (*Meriones unguiculatus*) de 55 a 65 días de edad y con un peso de 60 a 80 g. Se alimentaron con productos comerciales para ratones y agua *ad libitum*.

### **Obtención de amibas para inoculación.**

Se utilizó la cepa axénica de *E. histolytica* HM1-IMSS. Todos los trofozoitos fueron cultivados en condiciones axénicas en el medio TYI-S-33 (28,29), durante 72 horas, a 37°C, tiempo en el cual las amibas se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento. Las amibas se despegaron de las paredes de los tubos de cultivo colocándolos en baño de agua-hielo (4°C) por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 450 x g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y los trofozoitos fueron resuspendidos en el mismo medio. Se contaron las amibas en un hematómetro y se ajustaron a  $5 \times 10^5$  trofozoitos / 0.2 ml. Las amibas utilizadas fueron donadas por el Dr. Víctor Tsutsumi del laboratorio de Parasitología Experimental del CINVESTAV-IPN.

### **Inoculación intracecal en gerbos con trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.**

Se utilizaron 35 animales los cuales se dividieron en 5 grupos de 7. Los grupos 1 y 3 fueron inoculados con trofozoítos de *E. histolytica* y los grupos 2 y 4 con SSF, los cuales se utilizaron como grupos testigo, los animales del grupo 5 se emplearon para determinar las respuestas basales (animales a los cuales no se les realizó técnica quirúrgica). Quince días antes de la inoculación, los gerbos fueron tratados con metronidazol (Flagyl por sondeo intragástrico) durante tres días a dosis de 200 mg / kg de peso. El tratamiento previo fue con el fin de eliminar protozoarios comensales como *E. muris* y *Trichomonas sp.* (16). Cada animal se mantuvo en ayuno 12 horas antes de la cirugía. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg / Kg de peso. Se realizó asepsia de la región abdominal . Posteriormente se hizo una incisión media abdominal exponiendo el ciego, en el cual fueron inoculados en el ápice a los grupos 1 y 3,  $5 \times 10^5$  trofozoítos / 0.2 ml, los grupos 2 y 4 fueron inoculados con SSF. El grupo 5 no fue inoculado. La herida fue suturada con catgut 000 , aplicando finalmente un antiséptico local. Los animales se mantuvieron en observación hasta 30 días después de la inoculación.

#### Antígenos amibianos.

Los antígenos amibianos se obtuvieron de la siguiente manera:

**Extracto total (ET).** Trofozoítos cultivados en medio TYI-S-33 de 72 horas se colocaron en hielo para despegarlos de las paredes de los tubos de cultivo. Los trofozoítos se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos (a 4°C), se eliminó el sobrenadante y los trofozoítos fueron resuspendidos en SAF (pH=7.2) estéril y frío. Se rompieron mediante congelación a -20°C y descongelación brusca a 15°C repitiéndose tres veces. Después de la última descongelación se tomó una muestra y se observó al microscopio sin observarse trofozoítos completos. Posteriormente se adicionaron 0.5 ml de SAF y 250 ul de un

inhibidor de proteasas pHMB 100 mM. (94). La cantidad de proteínas de los extractos amibianos se determinó por la reacción de Folin-Ciocalteau (Ver apéndice de reactivos). El extracto se colocó en viales que fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Antígeno de membrana (P-15).** Para su obtención se realizó la misma técnica que para el ET hasta el paso en el cual se adicionó el inhibidor de proteasas, posteriormente se centrifugó a  $14\ 000 \times g$  por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 0.5 ml de SAF. La cantidad de proteínas amibianas se determinó por el método de Lowry (Ver apéndice de reactivos). El antígeno se colocó en viales y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Obtención de linfocitos de bazo y sueros de gerbos inoculados intracelalmente con trofozoítos *Entamoeba histolytica*.**

Los animales del grupo 5 fueron sacrificados el mismo día en que se realizó la inoculación, los grupos 1 y 2 fueron sacrificados 10 días después de la inoculación y los grupos 3 y 4 30 días post-inoculación. Los animales fueron anestesiados con éter y por punción cardíaca se extrajo la sangre para la obtención de suero. En área estéril, se localizó el bazo, se extirpó y se colocó en cajas de Petri conteniendo RPMI-1640 libre de suero a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desintegró mecánicamente, se tomó la suspensión celular la cual fue filtrada a través de tela de organza estéril para eliminar tejido conectivo y grasa. La suspensión fue centrifugada a  $350 \times g$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante, y se lavó tres veces resuspendiéndose en RPMI-1640 frío y sin suero. Después del último lavado se adicionaron 4 ml de RPMI-1640 frío suplementado con 5% de SFB previamente inactivado por 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$  y mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M. Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión a



la cual se adicionaron 50 ul de azul de tripano al 0.2 % en SSF al 0.85%, la muestra fue colocada en un hemocitómetro y se contó el número de linfocitos (en un tiempo no mayor de 3 minutos). Posteriormente se estandarizó la suspensión a  $2 \times 10^6$  linfocitos / ml.

#### **Transformación blastoide para linfocitos de bazo de gerbos inoculados intracelalmente con trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.**

Se utilizaron placas de microcultivo (Costar). En cada pozo se colocaron  $2 \times 10^6$  linfocitos de bazo en 100 ul de RPMI-1640 suplementado con SFB. Se adicionó a los pozos por triplicado y por separado 0, 1, 5, 20, 50 y 100 ug de proteína de los antígenos amibianos (ET y P-15) en 100 ul de RPMI-1640 suplementado con SFB.

Las células se incubaron por 5 días en estufa a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad. 18 horas antes de finalizar el periodo de incubación, se adicionó 1 uCi por pozo de timidina tritiada (actividad específica de 6.7 Ci / mol, New England Nuclear, Boston Mass., E.U.A.) en 10 ul de RPMI-1640 suplementado con SFB.

Después del periodo de incubación las células fueron cosechadas en SAF 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 en forma secuencial ácido tricloroacético al 5 y 10% y metanol al 70%.

El filtro fue secado y se despegaron los círculos correspondientes a cada pozo de la microplaca, éstos se depositaron en viales de plástico con tapón de rosca; se adicionaron 2 ml de líquido de centelleo a cada vial. Las lecturas fueron obtenidas en CPM en un espectrofotómetro para líquido de centelleo (Contador de Centelleo Líquido Packard)(77).

### **Técnica de inmunoelectroforesis para sueros de rata y gerbo empleando anti-gammaglobulinas de rata. (Reacción inmunitaria cruzada.)**

Para probar la reactividad cruzada entre las gammaglobulinas de rata y gerbo se utilizó la técnica de inmunoelectroforesis.

En placas de agarosa al 1% (en amortiguador de barbituratos) se colocaron 10 ul de suero de gerbo, rata y hámster 1:20, las placas se colocaron en una cámara de electroforesis. El corrimiento se realizó a 120 volts durante una hora y media.

Una vez terminado el corrimiento, a los canales se adicionaron por separado 40 ul sin diluir de anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM y anti-gammaglobulinas de rata elaborados en cabra disponibles comercialmente (Sigma Chemical y Cappel Laboratories) . Las placas se mantuvieron en refrigeración durante toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron tres lavados con SSF a concentraciones decrecientes: 0.9%, 0.45% y 0.22% utilizando una hora para cada concentración.

Una vez lavadas, las placas fueron teñidas con azul de Coomassie por 5 minutos. Para quitar el excedente del colorante se sumergieron en solución de ácido acético/ glicerina. Posteriormente las placas fueron secadas a 37 ° C (51).

### **Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para suero de gerbo y rata utilizando anti-gammaglobulinas de rata.**

El ensayo se realizó para probar la reactividad cruzada encontrada por inmunoelectroforesis de los antisueros de rata con suero de gerbo.

Placas de fondo plano de poliestireno (Costar) fueron sensibilizadas con 100 ul de sueros normales de rata y gerbo en solución de carbonatos (pH=9.6), a diferentes diluciones (1:25, 1:50, 1:100 y 1:200) manteniéndose en refrigeración toda la noche. Posteriormente se lavaron (6 veces) con SAF y los sitios libres dentro del pozo fueron saturados con 200 ul de

SAF-ASB al 1% incubándose 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con SAF-Tween (Tween 20 0.5 ml/l) 6 veces. A continuación se adicionaron 100 ul por separado de anti-Ig's de rata elaborados en cabra IgA, IgG, IgM e Ig's totales (Sigma Chemical) en dilución 1:1000 en SAF-ASB incubándose durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación se realizaron 6 lavados (SAF-Tween) y se agregaron 100 ul del conjugado (anti-cabra) en una dilución 1:1000 por una hora. Nuevamente se lavó con SAF-Tween 6 veces y se adicionaron 100ul del sustrato (orto-fenilendiamina 1mg / 100ml) manteniéndolo en obscuridad por 5 minutos. La reacción se finalizó con 50ul de  $H_2SO_4$  5 M. Las lecturas se realizaron en un lector de ELISA (BIO-TEK INSTRUMENTS MICROPLATE READER) a 490 nm (23,40,51,99).

**Ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* hacia los antígenos amibianos ET y P-15.**

Las microplacas de poliestireno (Costar) se recubrieron con los antígenos amibianos ET y P-15 por separado de la siguiente manera:

Se adicionaron 100 ul de una solución de carbonatos (pH= 9.6) conteniendo 50 ug / ml de proteína amibiana en cada pozo de las microplacas. Se refrigeraron toda la noche y posteriormente se lavaron (6 veces) con SAF; los pozos fueron bloqueados con 200 ul de SAF-ASB al 1% incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con SAF-Tween 6 veces.

A estas placas recubiertas con proteínas amibianas se adicionaron 100 ul de los sueros (dilución 1:200) de los diferentes grupos de gerbos inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* (0, 10 y 30 días), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavaron las placas con SAF-Tween (6 veces) y se adicionaron a

cada uno de los pozos 100 ul de los respectivos antisueros de rata elaborados en cabra diluidos 1:1000 (IgA, IgG, IgM e Ig's totales) en SAF-ASB y nuevamente se incubó por 1 hora.

Posteriormente las placas se lavaron con SAF-Tween (6 veces) y se agregaron 100 ul de conjugado anti-inmunoglobulinas de cabra (Sigma Chemical) dilución 1:1000 en SAF-ASB a cada uno de los pozos y se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se realizó un último lavado y se adicionaron 50 ul de sustrato orto-fenilendiamina (Sigma Chemical) a cada pozo, se incubó por 5 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con 50 ul de  $H_2SO_4$  5 M. Las lecturas se realizaron en un lector de ELISA (BIO-TEK INSTRUMENTS MICROPLATE READER) a 490 nm (23,51).

#### **Análisis Estadístico**

Para comparar las respuestas obtenidas a los antígenos ambientales a los 0, 10 y 30 días post-inoculación, se utilizó análisis de varianza y la prueba múltiple de Duncan (96).

## RESULTADOS

### Determinación de anticuerpos en sueros de rata y gerbo por inmunolectroforesis empleando anti-inmunoglobulinas de rata.

Para determinar si existía reacción cruzada entre los sueros de rata, gerbo y hámster se empleó la técnica de inmunolectroforesis. Para ello se trabajó con antisueros de rata hacia los isotipos IgA, IgG e IgM además de un anti-inmunoglobulinas totales. No se observaron bandas de precipitación hacia el suero de hámster con ninguno de los antisueros de rata. Para los sueros de rata y gerbo sólo se observaron bandas de precipitación hacia los isotipos IgG e inmunoglobulinas totales. En la figura (3) se ilustran los resultados de la inmunolectroforesis para los sueros de rata y gerbo.

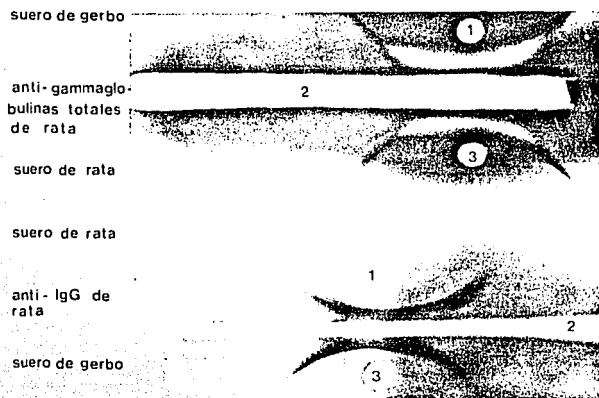


Figura 3. Placas de inmunolectroforesis para sueros de rata y gerbo. En la fotografía se observan bandas de precipitación hacia los isotipos IgG e Ig's-totales de rata en sueros de rata y gerbo.

**Determinación de anticuerpos en sueros de rata y gerbo por Ensayo inmunoenzimático empleando anti-inmunoglobulinas de rata.**

Debido a que en la inmunoelectroforesis no se pudo observar la reacción de cruce hacia todos los isotipos de inmunoglobulinas, se realizó el ensayo inmunoenzimático empleando anti-inmunoglobulinas de rata para los sueros de gerbo y rata a diferentes diluciones. Las absorbancias obtenidas para IgA de rata y gerbo son mostradas en la tabla 1. Los resultados obtenidos para IgA mostraron que existe una reacción cruzada entre IgA de rata y gerbo.

La respuesta es significativa ( $p < 0.05$ ) para el suero de gerbo en comparación con el blanco de reactivos y significativamente elevada ( $p < 0.05$ ) para el suero de rata en comparación con el suero de gerbo. Los resultados son presentados en la gráfica 1.

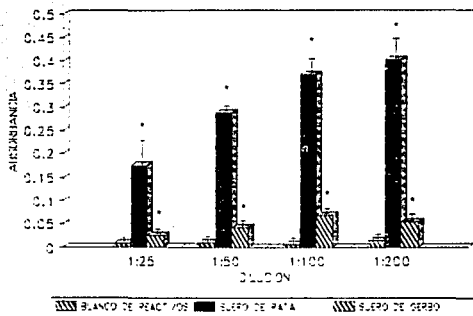
**Tabla 1. Valores de absorbancias en la determinación de IgA en sueros de rata y gerbo utilizando anti-IgA de rata.**

DILUCION	RATA		GERBO		BLANCO DE REACTIVOS (BR)	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
1:25	0.174	0.061	0.025	0.005	0.008	0.003
1:50	0.287	0.025	0.043	0.002	0.010	0.004
1:100	0.370	0.040	0.068	0.006	0.006	0.002
1:200	0.401	0.028	0.055	0.007	0.014	0.004

D.E.= Desviación estandar    x = Media

BR = SAF-ASB

DETERMINACION DE IgA EN SUEROS DE RATA  
Y GERBO CON ANTI-IgA DE RATA



Gráfica 1. Determinación de IgA mediante la técnica de ELISA con anti-IgA de rata en sueros de ratas y gerbos no inoculados a diferentes diluciones. Las respuestas obtenidas muestran que ambos sueros reaccionan con anti-IgA de rata, siendo mayor la respuesta en suero de rata ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

De la misma manera se comprobó la existencia de una reacción cruzada para IgG de rata y gerbo. Las absorbancias obtenidas para IgG de rata y gerbo son mostradas en la tabla 2. No se observó diferencia significativa en las diluciones 1:25 y 1:50 ( $p < 0.05$ ) entre los sueros de rata y gerbo. Se observó una diferencia significativamente elevada ( $p < 0.05$ ) para el suero de gerbo en comparación con el blanco de reactivos y una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre IgG de rata y gerbo en las diluciones 1:100 y 1:200, siendo mayor la respuesta en suero de rata. Los resultados son presentados en la gráfica 2.

Tabla 2. Valores de absorbancias en la determinación de IgG en sueros de rata y gerbo utilizando anti-IgG de rata.

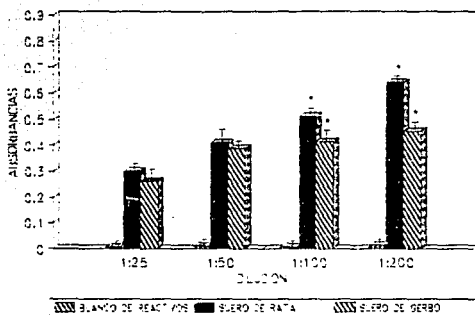
DILUCION	RATA		GERBO		BLANCO DE REACTIVOS (BR)	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
1:25	0.300	0.010	0.261	0.054	0.010	0.002
1:50	0.408	0.060	0.388	0.012	0.012	0.003
1:100	0.510	0.022	0.411	0.015	0.008	0.004
1:200	0.640	0.011	0.453	0.029	0.013	0.007

D.E.= Desviación estandar    x = Media

BR = SAF-ASB



DETERMINACION DE IgG EN SUEROS DE RATA  
Y GERBO CON ANTI-IgG DE RATA



Gráfica 2. Determinación de IgG mediante la técnica de ELISA con anti-IgG de rata en sueros de ratas y gerbos no inoculados a diferentes diluciones. Las respuestas obtenidas muestran que ambos sueros reaccionan con anti-IgG de rata, siendo mayor la respuesta en suero de rata ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

Para IgM se observó que existe reacción cruzada entre IgM de rata y gerbo. Las absorbancias obtenidas para IgM de rata y gerbo son mostradas en la tabla 3.

La respuesta fue similar a la obtenida con IgG. Existe diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) entre el suero de gerbo en comparación con la respuesta obtenida para el blanco de reactivos. No se observó diferencia significativa en la dilución 1:25 entre el suero de rata y gerbo. Se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la respuesta en suero de rata y gerbo en las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200, siendo mayor para el suero de rata. Los resultados son presentados en la gráfica 3.

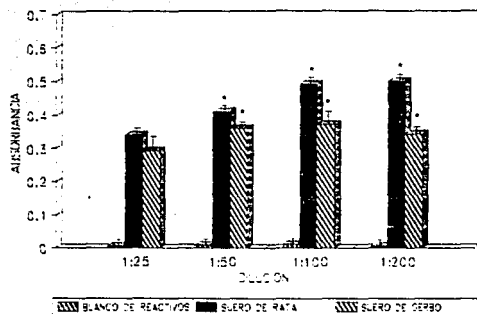
**Tabla 3.** Valores de absorbancias en la determinación de IgM en sueros de rata y gerbo utilizando anti-IgM de rata.

DILUCION	RATA		GERBO		BLANCO DE REACTIVOS (BR)	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
1:25	0.340	0.008	0.293	0.041	0.005	0.002
1:50	0.410	0.009	0.359	0.009	0.009	0.003
1:100	0.490	0.010	0.371	0.038	0.011	0.005
1:200	0.500	0.006	0.344	0.010	0.007	0.002

D.E. = Desviación estandar    x = Media

BR = SAF-ASB

DETERMINACION DE IgM EN SUEROS DE RATA  
Y GERBO CON ANTI-IgM DE RATA



Gráfica 3. Determinación de IgM mediante la técnica de ELISA con anti-IgM de rata en sueros de ratas y gerbos no inoculados a diferentes diluciones. Las respuestas obtenidas muestran que ambos sueros reaccionan con anti-IgM de rata, siendo mayor la respuesta en suero de rata ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

Las absorbancias obtenidas para Ig's totales de rata y gerbo son mostradas en la tabla 4. Los resultados para inmunoglobulinas totales (Ig's totales) muestran una diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) entre el suero de gerbo y el blanco de reactivos siendo mayor para el suero de gerbo y una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para el suero de rata en comparación con la respuesta en suero de gerbo. Los resultados son presentados en la gráfica 4.

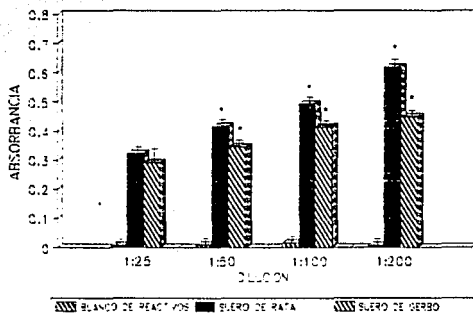
Tabla 4. Valores de absorbancias en la determinación de Ig's totales en sueros de rata y gerbo utilizando anti-gammaglobulinas totales de rata.

DILUCION	RATA		GERBO		BLANCO DE REACTIVOS	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
1:25	0.320	0.008	0.289	0.040	0.009	0.004
1:50	0.415	0.010	0.345	0.027	0.011	0.002
1:100	0.490	0.006	0.412	0.023	0.015	0.004
1:200	0.617	0.021	0.447	0.013	0.008	0.002

D.E = Desviación estandar      x = Media

BR = SAF-ASB

DETERMINACION DE Ig's TOTALES EN SUEROS  
DE RATA Y GERBO CON ANT-Ig's DE RATA



Gráfica 4. Determinación de inmunoglobulinas totales mediante la técnica de ELISA con anti-Ig's totales de rata en sueros de ratas y gerbos no inoculados a diferentes diluciones. Las respuestas obtenidas muestran que ambos sueros reaccionan con anti-Ig's de rata, siendo mayor la respuesta en suero de rata ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

En el ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos en los sueros de rata y gerbo a diferentes diluciones empleando anti-inmunoglobulinas de rata, se observó el efecto Hook (89). Se determinó que la dilución adecuada para el ensayo fue 1:200, debido a que con ésta dilución se observaron los mayores rangos de absorbancia en las respuestas hacia los diferentes isotipos de inmunoglobulinas ensayados. Estos resultados demostraron que existe reacción cruzada entre las inmunoglobulinas de rata y gerbo.

**Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, mediante la determinación de anticuerpos hacia los antígenos P-15 y ET.**

**Identificación de los isotipos de inmunoglobulinas séricas de gerbos inoculados intracecalmente.**

Por medio de la técnica de ELISA se realizó la identificación de las clases de anticuerpos presentes en sueros de gerbos inoculados con trofozoítos de *E. histolytica*. Se determinaron los isotipos IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales hacia los antígenos amibianos fracción membranal P-15 y extracto total.

**Cuantificación de anticuerpos contra el antígeno amibiano fracción membranal P-15.**

Las absorbancias obtenidas en la determinación de anticuerpos del isotipo IgA, IgG e IgM hacia el P-15 son mostradas en la tabla 5. Las respuestas obtenidas fueron las siguientes: para IgA se encontró diferencia significativa entre la respuesta a 0 y 10 y entre 10

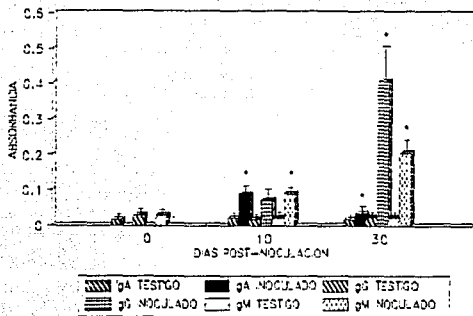
y 30 días ( $p < 0.05$ ), manifestándose un decremento en la respuesta a los 30 días post-inoculación. Para IgG no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la respuesta obtenida a los 0 y 10 días, sin embargo a los 30 días se encontró diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) en comparación con la observada a los 10 días post-inoculación. En la determinación de IgM se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la respuesta obtenida a los 0 y 10 días post-inoculación, a los 30 días se encontró diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) en comparación con la observada a los 10 días. Estos resultados son presentados en la gráfica 5.

Tabla 5. Valores de absorbancias en la determinación de anticuerpos IgA, IgG e IgM hacia el P-15 en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*.

INMUNOGLOBULINAS	DÍAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
IgA						
TESTIGO	0.014	0.008	0.020	0.006	0.018	0.008
INOCULADO			0.088	0.020	0.035	0.016
IgG						
TESTIGO	0.029	0.022	0.018	0.010	0.022	0.016
INOCULADO			0.069	0.034	0.410	0.096
IgM						
TESTIGO	0.029	0.019	0.020	0.015	0.024	0.018
INOCULADO			0.090	0.028	0.208	0.035

D.E. = Desviación estandar    x = Media

DETERMINACION DE IgA, IgG E IgM  
ANTI-ANTIGENO AMIBIANO P-15 EN SUERO



**Gráfica 5.** Determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de gerbos inoculados intracutáneamente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia el antígeno amibiano P-15 a diferentes periodos de inoculación. Se observó una respuesta mayor a los 30 días post-inoculación para IgG e IgM, sin embargo la respuesta para IgA disminuye en este periodo ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado. (\* = diferencia estadística significativa).



Las absorbancias obtenidas para Ig's totales hacia el antígeno amibiano fracción membranal P-15 son mostradas en la tabla 6. En la respuesta entre 0 y 10 días se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) encontrándose disminuida la respuesta a los 10 días. A los 30 días se presentó diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) en comparación a la obtenida a los 10 días post-inoculación. Estos resultados son presentados en la gráfica 6.

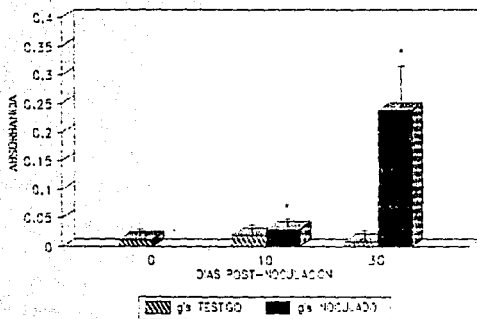
**Tabla 6.** Valores de absorbancias de inmunoglobulinas totales contra el antígeno amibiano P-15 en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*.

INMUNOGLOBULINAS TOTALES	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
TESTIGO	0.012	0.004	0.019	0.004	0.009	0.003
INOCULADO			0.030	0.007	0.238	0.091

D.E. = Desviación estandar

x = Media

DETERMINACION DE Ig's TOTALES EN SUERO  
 ANT-ANTIGENO AMBIANO P-15



Gráfica 6. Determinación de Ig's totales en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* contra antígeno ambiental P-15 a diferentes periodos de inoculación. Se observó una respuesta mayor a los 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

Los resultados de la producción de anticuerpos hacia el antígeno fracción membranal P-15 en sueros de gerbos inoculados intracalmente con trofozoitos de *E. histolytica* mostraron el siguiente orden de respuesta de mayor a menor: IgG, IgM e IgA.

#### **Determinación de anticuerpos contra ET.**

Las absorbancias obtenidas para IgA, IgG e IgM hacia ET son mostradas en la tabla 7. Los resultados de la producción de anticuerpos hacia el ET en sueros de gerbos inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* fueron los siguientes:

Para IgA se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre 0 y 10 días, aumentando significativamente entre 10 y 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). En el caso de IgG se observó diferencia significativa elevada ( $p < 0.05$ ) entre la respuesta a los 0 y 10 días, así como entre 10 y 30 días después de la inoculación. En la respuesta para IgM se encontró diferencia significativa mayor ( $p < 0.05$ ) entre 0 y 10 días y una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre 10 y 30 días post-inoculación. Estos resultados son presentados en la gráfica 7.

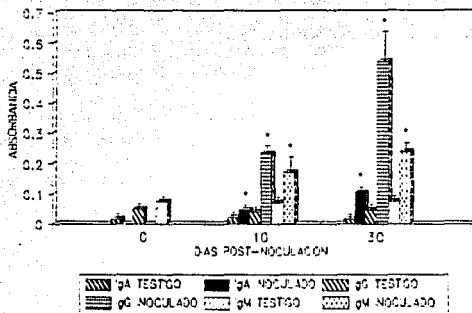
**Tabla 7.** Valores de absorbancias en la determinación de IgA, IgG e IgM hacia el antígeno extracto total amibiano en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*.

INMUNOGLOBULINAS	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
IgA						
TESTIGO	0.016	0.005	0.020	0.007	0.014	0.003
INOCULADO			0.046	0.004	0.103	0.023
IgG						
TESTIGO	0.050	0.010	0.041	0.011	0.045	0.009
INOCULADO			0.233	0.045	0.538	0.109
IgM						
TESTIGO	0.072	0.015	0.070	0.010	0.075	0.009
INOCULADO			0.171	0.043	0.236	0.053

D.E. = Desviación estandar

x = Media

DETERMINACION DE IgA, IgG E IgM  
 ANT.-ANTIGENO AMBIANO EXTRACTO TOTAL



Gráfica 7. Determinación de IgA, IgG e IgM en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* contra antígeno ET a diferentes periodos de inoculación. Se observó una respuesta mayor a los 30 días post-inoculación para todas las inmunoglobulinas ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

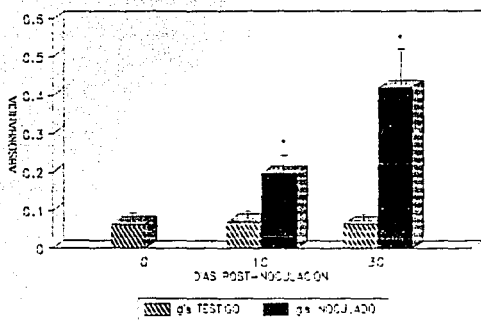
Las absorbancias obtenidas para inmunoglobulinas totales contra el antígeno extrato total amibiano son mostradas en la tabla 8. Los resultados fueron significativamente elevados ( $p < 0.05$ ) a los 10 y 30 días en comparación con los encontrados a los 0 días. Estos resultados son presentados en la gráfica 8.

**Tabla 8.** Valores de absorbancias en la determinación de inmunoglobulinas totales contra el antígeno extracto total amibiano en sueros de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica*.

INMUNOGLOBULINAS TOTALES	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
TESTIGO	0.061	0.015	0.070	0.009	0.063	0.011
INOCULADO			0.195	0.039	0.418	0.079

D.E. = Desviación estandar      x = Media

DETERMINACION DE Ig's TOTALES EN SJERO  
ANTI-ANTIGENO AMBIANO EXTRACTO TOTAL



Gráfica 8. Determinación de Ig's totales en sueros de gerbos inoculados intracutáneamente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia ET a diferentes periodos de inoculación. Se observó una respuesta mayor a los 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de siete sueros ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

**Respuesta de linfocitos de bazo de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia los antígenos amibianos fracción membranal P-15 y ET mediante la incorporación de timidina tritiada.**

Las cuentas por minuto de la estimulación de linfocitos de bazo de gerbo hacia ambos antígenos amibianos son mostrados en la tabla 9. La respuesta obtenida de linfocitos de bazo de gerbos inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* hacia los antígenos amibianos membranal P-15 y ET mostraron que a los 0 días de inoculación no existe una diferencia en el grado de respuesta ( $p < 0.05$ ).

A los 10 días de inoculación existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos siendo mayor para el ET. Sin embargo a los 30 días la respuesta es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para el antígeno P-15. Los resultados son presentados en la gráfica 9.



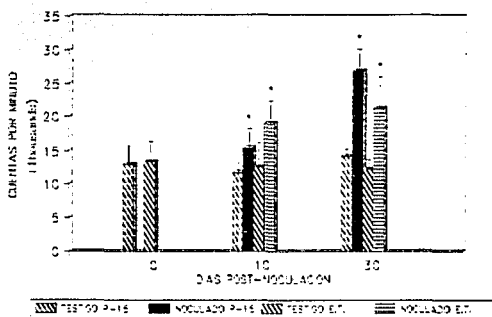
Tabla 9. CPM en la determinación de la respuesta de linfocitos de bazo de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia los antígenos ambianos P-15 y ET.

ANTIGENO	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
P-15						
TESTIGO	12995	2733	11726	3101	14130	2085
INOCULADO			15378	2606	26851	4190
EXTRACTO TOTAL						
TESTIGO	13342	2733	12469	3300	12221	2143
INOCULADO			19018	4264	21312	5042

D.E.= Desviación estandar

x = Media

RESPUESTA DE LINFOCITOS HACIA LOS  
Ag's AMBIANOS P-15 Y EXTRACTO TOTAL



Gráfica 9. Determinación de la respuesta de linfocitos de bazo mediante la técnica de transformación blastoide de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia los antígenos amibianos P-15 y ET a diferentes períodos de inoculación. Se observó una respuesta mayor hacia el antígeno amibiano fracción membranal P-15 a los 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de los linfocitos de bazo de siete animales ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

**Respuesta celular y humoral en gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E.histolytica* hacia los antígenos P-15 Y ET.**

Los resultados de las respuestas observadas en sueros hacia anti-inmunoglobulinas totales y linfocitos de bazo de gerbos inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* hacia el ET son mostrados en la tabla 10. La respuesta celular y humoral hacia éste antígeno se incrementó conforme el periodo de inoculación. Estos resultados son presentados en la gráfica 10.

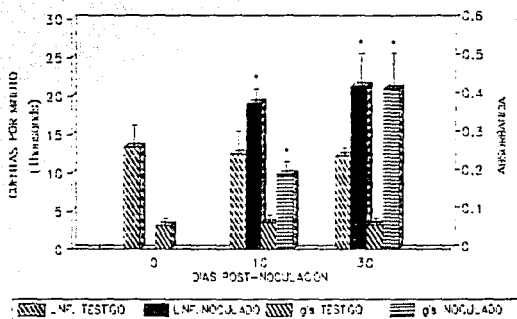
Tabla 10. CPM y absorbancias en la determinación de la respuesta de linfocitos de bazo e inmunoglobulinas totales de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia ET.

CPM	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
TESTIGO	13342	2733	12469	3300	12221	2143
INOCULADO			19018	4264	21312	5042
ABSORBANCIA						
TESTIGO	0.061	0.015	0.070	0.009	0.063	0.011
INOCULADO			0.195	0.039	0.418	0.079

D.E. = Desviación estandar

x = Media

RESPUESTA DE LINFOCITOS DE BAZO E g's  
 TOTALES HACIA ANTIGENO EXTRACTO TOTAL



Gráfica 10. Comparación de las respuestas de linfocitos de bazo e inmunoglobulinas totales de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos de *E. histolytica* mediante las técnicas de transformación blastoide y ELISA hacia ET a diferentes periodos de inoculación. Se observó que ambas respuestas se incrementan conforme el periodo de inoculación ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de linfocitos de bazo y sueros de siete animales ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

Los resultados de las respuestas de linfocitos de bazo e inmunoglobulinas hacia el P-15 son mostrados en la tabla 11. Para éste antígeno las respuestas fueron aumentando conforme el periodo post-inoculación. Los resultados son presentados en la gráfica 11.

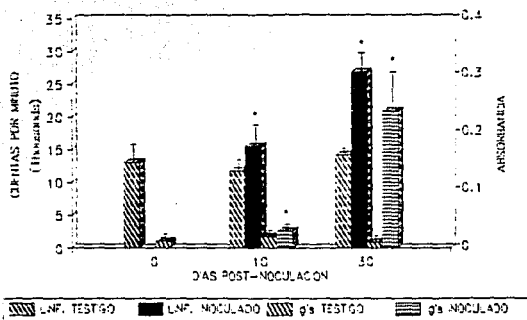
Tabla 11. CPM y absorbancias en la determinación de la respuesta de linfocitos de bazo e inmunoglobulinas totales de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* hacia P-15.

	DIAS POST-INOCULACION					
	0		10		30	
	x	D.E	x	D.E	x	D.E
CPM						
TESTIGO	12995	2733	11726	3101	14130	2085
INOCULADO			15378	2606	26851	4190
ABSORBANCIA						
TESTIGO	0.012	0.004	0.019	0.004	0.010	0.006
INOCULADO			0.030	0.007	0.238	0.091

D.E. = Desviación estandar

x = Media

RESPUESTA DE LINFOCITOS DE BAZO E g's  
 TOTALES HACIA EL ANTIGENO AMBIANO P-15



Gráfica 11. Comparación de las respuestas de linfocitos de bazo e inmunoglobulinas totales de gerbos inoculados intracecalmente con trofozoítos de *E. histolytica* mediante las técnicas de transformación blastoide y ELISA hacia P-15 a diferentes periodos de inoculación. Se observó que ambas respuestas son mayores a los 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). Cada dato fue el promedio de linfocitos de bazo y sueros de siete animales ensayados cada uno por triplicado (\* = diferencia estadística significativa).

Estadísticamente la variación en los resultados depende tanto del antígeno inoculado como de los periodos de inoculación.

## DISCUSION

En el presente trabajo se estudio la respuesta humoral y celular en gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa axénica HM1-IMSS. La elección de la vía de inoculación fue favorecida por la razón de asegurarnos el poder controlar la cantidad de inóculo al intestino, además de ser una vía empleada y documentada previamente por otros investigadores (20,21). Se trabajó con grupos de animales a los cuales les fueron extraídos linfocitos de bazo y los respectivos sueros a los 0, 10 y 30 días post-inoculación. Los periodos post-inoculación se fijaron de acuerdo a estudios histológicos realizados por otro grupo (20).

Los linfocitos de bazo fueron empleados para valorar la respuesta celular mediante una técnica de transformación blastoide y la respuesta humoral se evaluó por la determinación de anticuerpos anti-amiba por ensayo inmunoenzimático. Para estudiar ambas respuestas se utilizaron dos antígenos amibianos, fracción membranal P-15 y extracto total. Debido a que el objetivo de medir las respuestas era muy general y que no existía en el momento del experimento un antígeno amibiano específico hacia el cual pudiéramos dirigir el estudio, fue que se optó por dichos antígenos, cuyo empleo también está muy difundido (94).

El empleo de anti-inmunoglobulinas de rata para la cuantificación de anticuerpos anti-amiba en los sueros de gerbo se debió a comunicaciones personales con el Dr. G. Acosta y el Dr. J. P. Vaerman, quienes comentaron la existencia de una reacción cruzada entre las inmunoglobulinas de rata y gerbo, este hecho nos condujo a comprobar dicha reacción, empleando para ello técnicas de inmunoelectroforesis en sueros de hámster, rata y gerbo, en donde encontramos reacción de cruce entre IgG e Ig's totales de rata y gerbo, sin embargo por éste método no logramos apreciar reacción cruzada con las inmunoglobulinas de hámster. Aunque por inmunoelectroforesis no se pudo observar la reacción cruzada hacia IgA e IgM de rata, se probó por ensayo inmunoenzimático, en el cual se logró apreciar la reacción de cruce hacia todas las inmunoglobulinas de rata. Las reacciones de anti-inmunoglobulinas de rata con los sueros normales de rata y gerbo a diferentes diluciones son

presentadas en los gráficos 1, 2, 3 y 4, donde se encontró respuesta para ambos sueros en comparación con el blanco de reactivos (SAF)  $p < 0.05$ , con lo cual se demostró que hubo cierta reacción cruzada entre las Ig's de rata y gerbo.

Basándonos en éstos resultados se llevaron a cabo las determinaciones de anticuerpos anti-amiba empleando antisueros de rata en sueros de gerbos inoculados. esta forma indirecta de medir los anticuerpos fue un recurso abligado debido a que en el momento de la realización del estudio no se conocía la existencia de antisueros comerciales y el objetivo de nuestro trabajo no implicaba de momento la purificación y obtención de los antisueros.

Los anticuerpos anti-amiba que se determinaron en los sueros de gerbos fueron IgA, IgG, IgM e Ig's totales. Al determinar la respuesta de Ig's hacia el antígeno fracción membranal P-15 encontramos que los anticuerpos IgG, IgM e Ig's totales se incrementaron conforme el periodo post-inoculación, a excepción de IgA que disminuye a los 30 días ( $p < 0.05$ ). No tenemos una explicación clara para éste fenómeno, aunque posiblemente pudo deberse a una repoblación de células plasmáticas hacia la mucosa intestinal (20). Con el antígeno extracto total se observó que la respuesta aumenta para todas las Ig's hacia los 30 días post-inoculación ( $p < 0.05$ ). La respuesta hacia el antígeno extracto total fue mayor que hacia el antígeno P-15. El aumento en las respuestas a los 30 días podrían deberse a que posiblemente en éste periodo existieran trofozoitos vivos en la luz intestinal y que estos fueran responsables de la estimulación de la producción de anticuerpos.

En los resultados del estudio de la inmunidad celular encontramos respuesta hacia ambos antígenos por parte de los linfocitos de bazo que también aumentó a medida que transcurrió el tiempo post-inoculación y fue mayor hacia el antígeno amibiano fracción membranal P-15. La diferencia entre el grado de respuesta celular y humoral hacia los antígenos amibianos empleados tal vez podría deberse a mecanismos que involucran las respuestas de células Th1 y Th2 respectivamente. Actualmente existen trabajos en los cuales se estudia la respuesta de células Th1 y Th2 en protozoarios, mediante la determinación de interleucinas (30,56,78,70,73). Aunque existen algunos datos que indican que la regulación de la respuesta depende de la vía de inoculación, del tipo de antígeno empleado y de las características del parásito (56), es necesario contar con más trabajos para poder establecer



en una forma más concreta como se da la regulación de estas células ante diferentes tipos de parásitos.

Al integrar las respuestas celular y humoral observamos que existe una respuesta sistémica hacia la inoculación de trofozoitos por vía intracecal en el gerbo. Estos resultados coinciden con una investigación reciente en donde se inocularon trofozoitos fijados con formaldehído por diferentes vías, rectal, intragástrica y peritoneal en ratones, en la cual se encuentran respuestas sistémicas independientemente de la vía de inoculación (58).

El objeto de éste estudio fue conocer tanto la respuesta celular y humoral del gerbo después de la inoculación intracecal de trofozoitos de *E. histolytica*. Los resultados obtenidos se adicionan a los ya reportados en similares experimentos con gerbos y amibas, y aunque nuestro estudio presenta ciertas limitaciones como el empleo de antisueros de rata y el tipo de inoculación, éstas no son mayores que las que suelen presentarse en otros modelos animales.

Existen muchas incógnitas sobre el mecanismo de interacción antigénica con el sistema de las mucosas, pero es necesario establecer bases para poder comprenderlo. Este trabajo podría servir de herramienta en futuros diseños de experimentación para evaluar respuestas celulares y humorales hacia antígenos amibianos más específicos y posiblemente contemplando la regulación de Th1 y Th2 para dirigir respuestas más efectivas no sólo para la amibiasis sino para otros padecimientos.

## CONCLUSIONES

- Los gerbos inoculados intracecalmente con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* desarrollan respuesta inmune celular y humoral a los 10 y 30 días post-inoculación.
- La producción de anticuerpos hacia el antígeno extracto total, fue mayor que para el antígeno membranal P-15.
- Las respuestas obtenidas en la determinación de los diferentes isotipos de anticuerpos fueron en orden decreciente IgG, IgM e IgA hacia ambos antígenos amebianos.
- Al comparar la respuesta celular medida por transformación blastoide de linfocitos de bazo y la respuesta humoral evaluada por ELISA para la detección de anticuerpos se observó que en ambos casos la respuesta se incrementa conforme aumenta el periodo post-inoculación.

## APENDICE DE REACTIVOS

### I.- Método de Lowry (Folin-Ciocalteu)

Solución A : Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N.

Solución B : Sulfato de cobre pentahidratado al 0.5 % , en tartrato de sodio y potasio al 1 %.

Solución C : Mezclar 50 partes de la solución A con una parte de la solución B.

Reactivo de fenol diluido.

Disponible comercialmente como reactivo de fenol de acuerdo a Folin-Ciocalteu. Se diluye 1:1 con agua destilada al momento de usarlo.

Curva estándar.

Preparar una solución de albúmina sérica bovina, fracción V, que contenga 1 mg / ml. Hacer las diluciones que se muestran a continuación:

ml sol. estándar	ml agua destilada	concentración mg / ml
0.05	0.95	0.05
0.1	0.9	0.1
0.15	0.85	0.15
0.2	0.8	0.2
0.25	0.75	0.25
0.3	0.7	0.3
0.4	0.6	0.4
0.5	0.5	0.5

Tomar 0.3 ml de cada una de las diluciones y 0.3 ml de agua destilada (blanco).  
Añadir 2.5 ml de la solución C, mezclar y dejar en reposo a temperatura ambiente por 15 minutos. Después adicionar 0.25 ml de reactivo de fenol diluido agitar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Leer en espectrofotómetro a 700 nm. Graficar la curva estándar e interpolar las absorbancias de las muestras problema para conocer su concentración.

## 2.- Regulador de barbituratos

Tris-barbital (Instrumentation Laboratory Inc.)	1 frasco
Merthiolate al 1 %	9.0 ml.
Agua destilada	1000.0 ml.

## 3.- Merthiolate al 1 %

Thimerosal	0.1 g.
Agua destilada	10.0 ml.

## 4.- Agarosa al 1 %

Agarosa	1.0 g.
Regulador de barbituratos	100.0 ml.
Merthiolate al 1 %	1.0 ml.

### 5.- Tinción azul de Coomassie

Azul de Coomassie (Azul brillante Sigma)	1.25 g.
Acido acético glacial	50.0 ml.
Agua destilada	185.0 ml.

### 6.- Solución desteñidora

Acido acético glacial	50.0 ml.
Agua destilada	185.0 ml.

### 7.- Amortiguador de citratos 0.1 M pH=5.0

Acido cítrico	1.050 g.
Fosfato de sodio	0.890 g.
Agua destilada	50.0 ml.

Ajustar el pH si es menor de 5.0 con fosfatos, si es mayor a 5.0 con ácido cítrico.

### 8.- Solución amortiguadora de recubrimiento (Carbonatos)

Carbonato de sodio	1.59 g.
Bicarbonato de sodio	2.93 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

La solución se ajustó a pH= 9.6 con ácido clorhídrico 1 N.

9.- Sustrato para la enzima peroxidasa

1 mg / ml. de ortofenilendiamina en solución de citratos

10.- Solución amortiguadora de fosfatos-tween

Tween	0.5 ml.
Sol. amortiguadora de fosfatos (pH=7.2)	1000.0 ml.

11.- Solución amortiguadora de fosfatos-albúmina sérica bovina

Albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma)	1.0 g.
Sol. amortiguadora de fosfatos (pH=7.2)	100.0 ml.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACOSTA, A.G., Barranco, C., Isibasi, A., Campos, R., Kumate, J. : Excreción de anticuerpos de clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cultivados en medio axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl.3): 255-259 (1982).
- 2.- ACOSTA, A.G., Torres, S.E., Meraz, E., Isibasi, A., y Kumate, J. : Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en muestras de calostro humano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17:291-295 (1986).
- 3.- ANAYA, V.F., Padilla, V.F.: Effect of intestinal bacteria of the virulence of *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res. 23:183-185 (1992).
- 4.- ARROYO, R., Orozco, E. : Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. Mol. Bioch. Parasit. 23:151-158 (1987).
- 5.- AUST, K.A., Sundquist, K.G.: Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response.I. Capping and endocytosis; Influence of inhibiting and accelerating factors, variation of the expression of surface antigens. Scand. J. Immunolo. 7:35-44 (1978).
- 6.- BARRANCO, T.C., Acosta, A.G., Campos, R.R., Isibasi, A., y Kumate, J.: Inhibición por anticuerpos de la adherencia de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17:237-241 (1986).

- 7.- BERBER, E.A.C., Escobar, G.A., Zamora, G.M., and Acosta, A.G. : Identification de *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgA class human antibodies in sera and calostrá of puerperal women using immunoblotting techniques. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 21:97-101 (1990).
- 8.- 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 (1978).
- 9.- BRACHA, R. and Mirelman, D.: *Entamoeba histolytica* trophozoites; effects of bacteria microaerobia conditions and metronidazole. J. Exp. Med. 160:354-369 (1984).
10. CALDERON, J., Muñoz, M.L., Acosta, H.M.: Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. J. Exp. Med. 151:184-192 (1980).
- 11.- CALDERON, J., Schreiber, D., Robert, D. : Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. Inf. Immun. 560-565 (1985).
- 12.- CALDERON, J. : The role of complement in host defense against *Entamoeba histolytica* In: amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. (Ed.) Jonh Wiley & Sons, N.Y., 147-165 (1988).
- 13.- 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).
- 14.- CAPIN, R., Capin N.R., Carmona, M., and Ortiz, O.L. : Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Med. (Méx.) 11 (Supl. 1) 173:173-180 (1980).



- 15.- CHADEE, K. and Meerovitch, E. : *Entamoeba histolytica* : Antibody responses and limphoreticular changes in gerbils (*Meriones unguiculatus*) in response to experimental liver abscess and amebic extract injection. Z. Parasitenkd 70:781 (1984).
- 16.- CHADEE, K., Meerovitch, E. : The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:47-54 (1984).
- 17.- CHADEE, K., Meerovitch, E. : The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Am. J. Pathol. 117:71-80 (1984).
- 18.- CHADEE, K., Meerovitch, E. : *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:283-291 (1985).
- 19.- 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 (1985).
- 20.- CHADEE, K., Meerovitch, E. : *Entamoeba histolytica*: limphoreticular changes in gerbils (*Meriones unguiculatus*) with experimentally induced cecal amebiasis. J. Parasit. 71:566-575 (1985).
- 21.- CHADEE, K., Meerovitch, E., and Moreau, F. : *In vitro* and *in vivo* interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and gerbil lymphoid cells. Inf. Immun. 49:828-832 (1985).
- 22.- CHEVEZ, A., Iturbe A. : Respuesta morfodinámica de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a la acción de suero inmune correspondiente. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 4 (Supl.1):71 (1973).

- 23.- DEL MURO, R., Acosta, E., Merino, E., Glender, W., and Ortiz, O.L. : Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *The J. of Inf. Dis.* 162:1360-1364 (1990).
- 24.- DENIS, M., Chadee, K. : Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections. *Parasit. Today* 4:247-252 (1988).
- 25.- DENIS, M., Chadee, K. : *In vitro* an *in vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. *Inf. Immun.* 56:3126-3131 (1988).
- 26.- DIAMANTSTEIN, T., Klos, M., Gold, D., Hahn, H. : Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. *J. Immun.* 126:2084-2086 (1981).
- 27.- DIAMOND, L.S., Phillips, B.P., and Bartgis, J.L. : The clawed jird (*Meriones unguiculatus*) as an experimental animal for the study of hepatic amebiasis. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 5 (Supl. 2):465-470 (1974).
- 28.- DIAMOND, L.S., Tanimoto, W.M., and Martínez, P.A. : Production of cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 9 (Supl. 1):223-228 (1978).
- 29.- DIAMOND, Louis S. : Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: progress and problems. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 11 (Supl. 1) : 47-54 (1980).
- 30.- FITCH, F.W., Mckisic, M.D., Lancki, D.W., and Gajewski, T.F.: Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* 11:29-48 (1993).
- 31.- 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).

- 32.- GHADIRIAN, E., Meerovitch, E. : Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amebic liver abscesses in hamsters. *Parasite Immunology* 3:329-337 (1981).
- 33.- GHADIRIAN, E., Meerovitch, E. : In vitro amoebicidal activity of immune cells. *Inf. Immun.* 36:243-246 (1982).
- 34.- GOLD, D. and Kagan, I. : Susceptibility of various strain of mice to *Entamoeba histolytica*. *J. Parasit.* 64:937 (1978).
- 35.- GUTIERREZ, G. : Epidemiología y control de la amebiasis en México. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 17 (Supl.7):375 (1986).
- 36.- HADDEN, W.J., Hadden, E.M., Sadlik, J.R., and Coffey, R.G. : Effects of concanavalina A and succinylated derivative on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1717-1721 (1976).
- 37.- HANEBERG, B., Wesenberg, F., Aarskog, D. : Lymphocyte multiplication *in vitro* induced by mitogens and antigens. *Scand. J. Immunol.* 8:9-13 (1978).
- 38.- HARRIS, W.G., Bray, R.S. : Cellular sensitivity in amoebiasis preliminary results of lymphocytic transformation in response to specific antigen and mitogen in carrier and disease states. *Trans. Royal Trop. Med. Hyg.* 70:340-343 (1976).
- 39.- 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. Hyg.* 15:294 (1966).
- 40.- IGLESIAS, S.L., Torres, A.S., Lara, P.E., Isibasi, Y.A., Acosta, A.G. : Análisis inmunoenzimático. *Rev. Méx. Patol. Clín.* 32:53-59 (1985).

- 41.- JONES, W.R. : The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*, with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Am. Trop. Med. Parasitol. 40:130-140 (1946).
- 42.- KARAVODIN, L.M., Ash, L.R. : Weak mixed lymphocyte culture response in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Lab. Anim. Sci. 27:195-203 (1977).
- 43.- KNOBLOCH, J., Mannweiler, E. : Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:727-732 (1983).
- 44.- KOBILER, D., Mirelman, D. : Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infection and Immunity 29:221-225 (1980).
- 45.- KOTCHER, E., Miranda, M., Garcia S.V. : Correlation of clinical, parasitological and serological data of individuals infected with amebic antigen and some of its fractions. Am. J. Trop. Hyg. 29: 779-784 (1970).
- 46.- KRESTSCHMER, R.R. : Immunología de la amibiasis en: Amibiasis. Martínez, P.A. (Ed.) Panamericana, 78-133 (1986).
- 47.- KRUPP, I.M., Powell, S.J. : Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Am. J. of Trop. Med. Hyg. 20:414-420 (1971).
- 48.- LEYVA, O., Rico, G., Ramos, F., Morán, P., Melendrio, E.I., and Ximénez, C. : Inhibition of adhesion process mediated by anti-*Entamoeba histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. Arch. Med. Resch. 23:227-229 (1992).

- 49.- LOPEZ, O.M., Kreischmer, R.R. : Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 11:403-411 (1989).
- 50.- LOPEZ, R.R., Cano, M.R. : Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. Inf. Immun. 37:281-285 (1982).
- 51.- Manual de prácticas de Inmunología. E.N.C.B., I.P.N.
- 52.- MARTINEZ, P.A. Amibiasis. Méx. D.F., Ed. Médica Panamericana.
- 53.- MARTINEZ, P.A. The biology of *Entamoeba histolytica*. Res. Stud. Press/ John Willey, Chichesterl. 1st. Cell Biology, 2:5-56.
- 54.- 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).
- 55.- McCLAIN, D.A., Edelman, G.M. : Analysis of the stimulation-inhibition paradox exhibited by lymphocytes exposed. J. Exp. Med. 144:1494-1508 (1976).
- 56.- McGHEE, R.J. and Kiyono, H.: New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. Inf. Agents and Disease. 2:55-73 (1993).
- 57.- McGOWAN, K., Deneke, C.F., Thorne, G.M., Gorbach, S.L. : *Entamoeba histolytica* cytotoxin: purification, characterization, strain virulence and protease activity. J. Inf. Dis. 46:616-624 (1982).
- 58.- MORENO, F.L., Dominguez, R.C. and Enriquez, R.F.: *Entamoeba histolytica*: Induction and isotope analysis of antibody producing cell responses in Peyer's Patches and

- 58.- MORENO, F.L., Domínguez, R.C. and Enriquez, R.F.: *Entamoeba histolytica*: Induction and isotope analysis of antibody producing cell responses in Peyer's Patches and Spleen after local and systemic immunization in male and female mice. *Exp. Parasitology*. 80:541-549 (1995).
- 59.- OROZCO, E., Suárez, M.E., Sánchez, T. : Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1-IMSS. *Int. J. Parasit.* 15:655-660 (1985).
- 60.- ORTIZ, O.L., Sepúlveda, B. : Nuevos estudios acerca de la acción de sueros humanos normales e inmunes sobre el trofozoito de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*, 5 (Supl.2):337 (1974).
- 61.- ORTIZ, O.L., Capin, R., Capin, N., Sepúlveda, B., and Zamancona, G. : Activation of alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clin. Exp. Immunol.* 34:10-18 (1978).
- 62.- O'SHEA, A.M.S., Treviño, G.M.N., Arguello, L.C. : Antígenos de superficie de *Entamoeba histolytica* que interactúan con IgA específica de suero humano inmune. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 18:229-233 (1978).
- 63.- OYERINDE, J.P.O., Ogumbi, O., Alonge, A.A. : Age and sex distribution of infections with *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* in the Lagos population. *Ind. J. Epidemiol.* 6:231-234 (1977).
- 64.- PATTERSON, M., Healy, G.H., and Shabot, J.M. : Serologic testing for amoebiasis. *Gastroenterology* 78:136 (1980).

- 65.- PEREZ, T.R. : Pathology of the amebiasis. In. Amebiasis. Martinez, P.A. (Ed.) Elsevier Science Publishers Amsterdam. The Netherlands, 48-78 (1986).
- 66.- PETRI, W.A., Jackson, T.F., Gathiram, V., Kress, K., Saffer, L.D., Snodgrass, T.L., Chapman, M.D., Keren, Z., and Mirelman, D. : Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Inf. Immun. 58:1802-1806 (1990).
- 67.- 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).
- 68.- RAVDIN, J.I., Guerrant, R.L. : Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 68:1305-1313 (1981).
- 69.- RAVDIN, J.I., Petri, W.A., Murphy, C.F., and Smith, R.D. : Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Inf. Immun. 53:1-5 (1986).
- 70.- REINER, S.L., Wang, Z., et al. Th1 and Th2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. Science 259:1457-1460 (1993).
- 71.- REINERTSON, J.W., and Thompson, P.E. : Experimental amebic hepatic in hamsters. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76:518 (1951).
- 72.- RIOS, D., Capín, R., Ortiz, O.L. : Reacción inmunitaria de hamsters infectados o inmunizados con *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1) :303-308 (1978).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 73.- ROMAGNANI, S.: Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunol. Today. 12 No.8:256-257 (1991).
- 74.- SALATA, R.A., Ravdin, J.I. : Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. Rev. Inf. Dis. 8:261-272 (1986).
- 75.- SALATA, R.A., Ravdin, J.I. : The interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. J. Inf. Dis. 154:19-26 (1986).
- 76.- SALATA, R.A., Martínez, P.A., Canales, L., Murray, H.W., Treviño, N., Ravdin, J.I. : Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. Inf. Immun. 58:3941-3946 (1990).
- 77.- SAVANAT, T., Viriyanond, P., Nimitmongkol, N. : Blast transformation of lymphocytes in amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22:705-709 (1973).
- 78.- SCOTT, P. and Kaufmann, H.E.S.: The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. Immunol. Today. 12 No.10:346-348 (1991).
- 79.- SEPULVEDA, B., Tanimoto, W. : Inducción de inmunidad pasiva antiamebiana en el hámster por la inyección de suero inmune. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 5 (Supl. 2):451 (1974).
- 80.- SEPULVEDA, B., Tanimoto, W. : Neutralización de la virulencia de cultivos de *Entamoeba histolytica* con suero inmune. Arch. Invest. méd. (Méx.),5 (Supl.2):447 (1974).
- 81.- SEPULVEDA, B. : Amebiasis : Host- Pathogen Biology. Rev. Inf. Dis. 4:1247-1253



- 82.- SHETTY, N., Nagpal, S., Rao, P.V.S., Schroder, H. : Detection of IgG, IgA, IgM and IgE antibodies in invasive amoebiasis in endemic areas. *Scand. J. Infect. Dis.* 22:485-491 (1990).
- 83.- SHIBAYAMA, S.M., Tsutsumi, V., Campos, R.R., Martinez, P.A. : Morphological characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. *Arch. Med. Resch.* 23:203-207 (1992).
- 84.- SHIBAYAMA, S.M., Tsutsumi, V., Martinez, P.A. : Early invasive intestinal amebiasis in mongolian gerbils. *Arch. Med. Resch.* 23:187-190 (1992).
- 85.- SMITH, J.M., Chadee, K., Meerovitch, E. : Failure to establish experimental *Entamoeba histolytica* infection in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) naturally infected with *Entamoeba muris*. *Trans. Royal Trop. Med. Hyg.* 79:875-876 (1985).
- 86.- STAMM, W.P., Ashley, M.J., Bell, K. : The value of amoebic serology in an area of low endemicity. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 70:49-53 (1976).
- 87.- SWARTZWELDER, J.C., Avant, W.H. : Immunity to amebic infection in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1:567 (1952).
- 88.- TANIMOTO, W.M., Calderón, P., De la Hoz, R., Aguirre, G.J.: Inoculación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en hámsters bajo la acción de drogas inmunosupresoras. *Arch. Invest. Méd.* 5:441-446 (1974).
- 89.- TIJSEN, P. *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and theory of enzyme immunoassays.* Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam New York. Oxford. 1985.

- 90.- TOMANA, M., Niedermieier, W. : The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins. *Immunochem.* 13:325 (1976).
- 91.- TORAÑO, A., Tsuzukida : Location and estructural significance of the oligosaccharides in human IgA1 and IgA2 immunoglobulins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:2301 (1977).
- 92.- TSUTSUMI, V., Mena, L. R., Anaya, V.F. and Martínez, P.A. : Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117:81-91 (1984).
- 93.- TSUTSUMI, V., Shibayama, S.M., Campos, R.R., Pacheco, Y.J., Martínez, P.A. : Active immunization in hamster with live *Entamoeba histolytica* trophozoites of low virulence. *Arcii. Med. Resch.* 23:161-163 (1992).
- 94.- VALADEZ, S.A. and López, R.R. : Stimulation of DNA synthesis on animal cell microcultures by a heat-stable cytoplasmic factor of *Entamoeba histolytica*. *Z. Parasitenkd.* 72:133-136 (1986).
- 95.- VINAYAK, V. K., Sawhney, S., Jain, P., Chugh, S., Naik, S.R., Chakravarti, R.N. : Virulence of *Entamoeba histolytica* in rat an its comparision with the serological responses of the amoebic patients. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. Hyg.* 75:32-37 (1981).
- 96.- WAYNE, W.D. *Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud.* Méx. D.F. 1989. Ed. Limusa.
- 97.- WESTPHAL, A. : Die intrazakale der mausmit *Entamoeba histolytica*. *Zfschr. F. Tropenmed Parasitol.* 21:220 (1970).
- 98.- WHITBREAD, T.J. Simple technique for examining lymphocyte blastogenesis in whole blood cultures for neonatal calves. *Res. Vet. Sci.* 40:161-165 (1986).

99.- YOLKEN, R. : Enzyme immunoassay for the detection of infectious antigens in body fluid current limitations and future prospects. Rev. Inf. Dis. 4:1 (1982).

---