

11261  
22  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**LA EOSINOFILIA EN EL ABSCESO  
HEPATICO AMIBIANO EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS,**

**AREA INMUNOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**JUAN RAYMUNDO VELAZQUEZ RODRIGUEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA LOPEZ OSUNA



CIUDAD UNIVERSITARIA. 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN MÉDICA DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DIRECCIÓN Y TUTORÍA DE LA DRA. MARTHA LÓPEZ OSUNA, A QUIEN HAGO PATENTE MI RESPETO Y AGRADECIMIENTO.

DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS EL SUSTENTANTE FUE BECADO DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Y DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

## CONTENIDO

	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS .....	4
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FOTOGRAFIAS.....	5
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
ANTECEDENTES .....	10
<u>ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS</u> .....	10
TROFOZOITO .....	10
QUISTE.....	10
CICLO DE VIDA.....	11
VIRULENCIA DE LA <u>E. HISTOLYTICA</u> .....	12
AMIBIASIS .....	13
TIPOS DE AMIBIASIS.....	14
<i>La amibiasis intestinal</i> .....	14
<i>Absceso hepático amibiano</i> .....	15
LA RESPUESTA INMUNE EN LA AMIBIASIS.....	17
<i>Inmunidad humoral</i> .....	17
<i>Inmunidad celular</i> .....	18
MODELOS EXPERIMENTALES DE AMIBIASIS.....	20
<i>Estudios <u>in vitro</u></i> .....	20
<i>La confrontación amiba-leucocitos <u>in vitro</u></i> .....	20
Los polimorfonucleares.....	20
Los eosinófilos.....	21
Los macrófagos.....	21
Los linfocitos.....	22
<i>Estudios <u>in vivo</u></i> .....	22
Modelos de amibiasis intestinal.....	23
Modelos de amibiasis hepática.....	24
La confrontación amibas-leucocitos <u>in vivo</u> .....	25
LOS EOSINÓFILOS .....	26
<i>Gránulos</i> .....	26
<i>Función de los eosinófilos</i> .....	27

El papel de la IL-5 en la eosinofílopoiesis .....	28
Métodos de determinación de IL-5 .....	29
Modelos de eosinofilia .....	29
El papel del eosinófilo en la amibiasis .....	31
La confrontación del eosinófilo y la amiba <i>in vitro</i> .....	31
La confrontación del eosinófilo y la amiba <i>in vivo</i> .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>TÉCNICAS</b> .....	<b>33</b>
1.- Cuentas totales y diferenciadas de leucocitos y eosinófilos .....	33
a) Cuenta de leucocitos .....	33
b) Determinación del número absoluto de eosinófilos .....	33
2.- Características de los gerbos .....	34
3.- Parásitos y obtención de antígenos .....	34
a) Parásitos: <i>T. canis</i> y <i>Ascaris lumbricoides</i> ( <i>A. lumbricoides</i> ) .....	34
b) Obtención de antígenos .....	35
4.- Adyuvantes usados .....	36
5.- Cultivos de <i>E. histolytica</i> .....	37
6.- Inoculación intraportal de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .....	37
7.- Toma de muestra de tejido de hígado, su procesamiento y tinción .....	38
8.- Determinación cuantitativa de IL-5 .....	39
<b>GRUPOS EXPERIMENTALES Y TESTIGOS</b> .....	<b>40</b>
1.- Inducción de eosinofilia .....	40
a) Grupo con antígeno de <i>T. canis</i> larva-cascarón .....	40
b) Grupo con antígeno de <i>T. canis</i> adulto .....	41
c) Grupo testigo .....	41
d) Grupo con antígeno de <i>A. lumbricoides</i> .....	41
2.- Pruebas de virulencia .....	42
3.- Establecimiento de la dosis mínima de inoculación de los trofozoitos de <i>E. histolytica</i> capaz de producir AHA experimental .....	43
a) Gerbos inoculados con $5 \times 10^4$ trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .....	43
b) Gerbos inoculados con $7.5 \times 10^4$ trofozoitos .....	43
c) Gerbos inoculados con $1 \times 10^5$ trofozoitos .....	44
4.- Inducción de AHA experimental para el estudio de etapas tempranas (6, 24 y 96 hs post-inoculación de la amiba) .....	44
a) Gerbos eosinofílicos .....	44
b) Gerbos no eosinofílicos (normales) .....	45

c) Geros normales (testigos de manipulación quirúrgica).....	46
<b>5.- Inducción del AHA experimental para el estudio en <u>etapa tardía</u> de sobrevida actuarial</b> <b>(hasta 45 días post-inoculación).....</b>	<b>47</b>
a) Geros eosinofílicos .....	47
b) Geros no eosinofílicos (normales).....	47
c) Geros normales (testigos de manipulación quirúrgica) .....	48
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MODELO DE EOSINOFILIA.....</b>	<b>49</b>
<b>ESTABLECIMIENTO DE UNA DOSIS MÍNIMA NECESARIA PARA CAUSAR AHA.....</b>	<b>57</b>
<b>AHA EXPERIMENTAL EN <u>ETAPAS TEMPRANAS</u> (6, 24 Y 96 HS).....</b>	<b>59</b>
<b>AHA EXPERIMENTAL EN <u>ETAPAS TARDÍAS</u> DE SOBREVIDA ACTUARIAL (HASTA 45</b> <b>DÍAS) .....</b>	<b>64</b>
<b>DETERMINACIÓN DE IL-5 .....</b>	<b>67</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>78</b>

## INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIG 1	INDUCCIÓN DE EOSINOFILIA EN GERBOS CON ANTÍGENO LARVARIO DE <i>T. canis</i> .....49
FIG 2	INDUCCIÓN DE EOSINOFILIA EN GERBOS CON ANTÍGENO DE <i>T. canis</i> ADULTO.....50
FIG 3	INDUCCIÓN DE EOSINOFILIA EN GERBOS CON ANTÍGENO DE <i>A. lumbricoides</i> .....51
FIG 3	MODELO DE EOSINOFILIA CON ANTÍGENO DE <i>T. canis</i> ADULTO.....52
FIG 5	EOSINOFILIA INDUCIDA EN GERBOS DE DIFERENTE SEXO.....53
FIG 6	EOSINOFILIA EN GERBOS CON DIFERENTES ADYUVANTES.....54
FIG 7	EOSINOFILIA INDUCIDA POR HIPERINOCULACIÓN CON ANTÍGENO DE <i>T. canis</i> .....56
FIG 8	AHA EN GERBOS EOSINOFÍLICOS ( SACRIFICADOS A LAS 6, 24 Y 96 HS ).....59
FIG 9	TAMAÑO Y NÚMERO DE AHA EN GERBOS EOSINOFÍLICOS ( SACRIFICADOS A LAS 6, 24 Y 96 HS ).....60
FIG 10	CURVAS ACTUARIALES DE SOBREVIDA EN GERBOS EOSINOFÍLICOS CON AHA ( 0-45 DÍAS ).....64

## INDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1	DDIS MÍNIMA NECESARIA PARA CAUSAR AHA.....58
TABLA 2	EOSINÓFILOS E IL-5 EN GERBOS CON AHA.....67

## INDICE DE FOTOGRAFIAS

PÁGINA

FOTO 1	ASPECTOS MICROSCÓPICOS DEL HÍGADO A LAS 6 HS POST-INOCULACIÓN (40X).....	62
FOTO 2	ASPECTOS MICROSCÓPICOS DEL HÍGADO A LAS 24 HS POST-INOCULACIÓN (25X).....	62
FOTO 3	ASPECTOS MICROSCÓPICOS DEL HÍGADO A LAS 6 HS POST-INOCULACIÓN (25X).....	63
FOTO 4	ASPECTOS MICROSCÓPICOS DE HÍGADO DE GERBO MUERTO POR AHA (10X).....	66



## RESUMEN

*In vitro* los eosinófilos humanos normales (i.e. no activados) son destruidos por la Entamoeba histolytica virulenta aún en presencia de anticuerpos y complemento. Por otra parte los eosinófilos activados son capaces de destruir al parásito aunque también sucumban en el proceso. Con el fin de estudiar *in vivo* la posible participación del eosinófilo en el absceso hepático amibiano, empleamos gerbos (Meriones unguiculatus) en los que se indujo eosinofilia mediante la administración de un antígeno parasitario (Toxocara canis).

El absceso hepático amibiano se logró mediante inoculación intraportal de trofozoitos de E. histolytica virulenta (HM1-IMSS). La valoración del daño hepático producido se realizó en dos etapas: una temprana con sacrificios a las 6, 24 y 96 hs y una prolongada (tardía) con curvas actuariales de sobrevivencia hasta los 45 días.

En la primera etapa se encontraron diferencias significativas en el número y tamaño de los microabscesos hepáticos inducidos después de 96 hs del reto amibiano entre los gerbos eosinofílicos y los normales mientras que en la segunda etapa se observó significativamente mayor sobrevivencia y menor presencia de lesiones en los gerbos eosinofílicos.

Los niveles de IL-5 en el suero de los gerbos eosinofílicos y los normales fue similar a lo largo del experimento.

## INTRODUCCIÓN

La amibiasis, enfermedad causada por el protozooario Entamoeba histolytica (E. histolytica), representa un grave problema de salud pública debido a su amplia distribución mundial y al número de defunciones que ocasiona. Su prevalencia se estima en 500 millones de personas infectadas de los cuales sólo el 10% desarrollan la enfermedad, llegando a ser letal en aproximadamente 0.1% de estos últimos. Por diversos motivos el problema de la amibiasis es más severo en países en vías de desarrollo como el nuestro (WALSH, 1986). Con la virtual aceptación de la existencia de dos especies diferentes de entamoebas microscópicamente indistinguibles: una, la Entamoeba dispar (E. dispar), aparentemente inocua, y la otra, nuestra conocida E. histolytica (patógena), esta cifra epidemiológica debe ser reconsiderada ya que la mayoría de los infectados en realidad albergan E. dispar y no enfermaron por ella (Cohen, 1995).

La enfermedad puede variar desde una infección intestinal asintomática hasta el daño severo de algunos órganos como el hígado.

A partir del surgimiento de medios de cultivo sintéticos (DIAMOND, 1961; DIAMOND, 1980) para la E. histolytica, ha sido posible estudiar sus mecanismos de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*; pero aún no se conocen del todo estos fenómenos y/o los procesos de defensa del organismo invadido. Sin embargo,

es evidente que la inmunidad celular del hospedero es un factor de resistencia importante ante el ataque del parásito.

El papel de los leucocitos (células que se consideran como una primera línea de defensa contra las infecciones) en la amibiasis lo estudiaron por vez primera Chévez y Segura en 1974, estos autores realizaron confrontaciones *in vitro* de leucocitos de diversas especies animales y la amiba, y observaron la prevalencia del efecto citotóxico de amibas virulentas; posteriormente se hicieron estudios con neutrófilos polimorfonucleares humanos (JARUMILINTA Y KRADOLFER, 1964; ARTIGAS, OTTO Y KAWADA, 1966; GUERRANT, 1981; LÓPEZ-OSUNA, CONTRERAS Y KRETSCHMER, 1986) y células mononucleares normales (GUERRERO, Ríos Y LANDA, 1976; SALATA, PEARSON Y RAVDIN, 1985) obteniendo resultados semejantes; sin embargo, cuando se utilizaron en las confrontaciones macrófagos "activados", éstos fueron capaces de lisar al parásito (SALATA, COX Y RAVDIN, 1985) aunque eventualmente también sucumben en el proceso. Estudios ulteriores confirmaron un efecto similar de los linfocitos T estimulados (SALATA, COX Y RAVDIN, 1987).

Es bien conocida la importancia del eosinófilo en la helmintiasis (BUTTERWORTH, 1993) por lo que nos avocamos a investigar la posible participación de este leucocito en la defensa del organismo contra la amibiasis invasora aunque es conocida la ausencia de eosinofilia circulante en esta enfermedad (REED Y BRAUDE, 1988). Estudios *in vitro* confrontando eosinófilos normales contra amibas virulentas confirmaron el efecto citotóxico del parásito sobre los primeros

(LÓPEZ-OSUNA Y KRETSCHMER, 1989); posteriormente, y teniendo en cuenta los resultados con macrófagos activados se estudió la interacción utilizando eosinófilos "activados" con fMLP, lo que dió por resultado la lisis de la amiba virulenta y además de que, a semejanza de los macrófagos "activados" los eosinófilos también fueron eliminados al final del proceso (LÓPEZ-OSUNA, ARELLANO Y KRETSCHMER, 1992).

Nuestro objetivo es investigar *in vivo* un posible papel protector del eosinófilo, teniendo en cuenta lo ya observado *in vitro*. Para esto utilizamos gerbos (*Meriones unguiculatus*) (*M. unguiculatus*), animales actualmente empleados como modelo experimental del absceso hepático amibiano (AHA) (CHADEE Y MEEROVITCH, 1984; SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992), y les indujimos eosinofilia en sangre periférica (fijada inicialmente como  $\geq 400$  eosinófilos/mm<sup>3</sup>) por medio de la administración intramuscular de varias dosis de un antígeno parasitario (*Toxocara canis*). Los animales se retaron con trofozoitos de *E. histolytica* virulenta (HM1-IMSS) el día que resultó con mayor eosinofilia (aprox. 21), con el propósito de desarrollar el AHA experimental. También se determinó IL-5 circulante en diferentes etapas de los experimentos con el fin de detectar su posible participación en estos eventos.

## ANTECEDENTES

### Entamoeba histolytica

La E. histolytica es uno de los eucariotes más primitivos, pertenece a la familia Entamoebidae del orden Amoebida, subfilo Sarcodina, superclase Rhizopoda de protozoos formadores de pseudópodos, de la clase Lobosea (RAVDIN, 1986; MARTÍNEZ-PALOMO, 1987).

La E. histolytica puede existir en dos formas: trofozoito y quiste (RAVDIN, 1995).

### **Trofozoito**

Es un anaerobio facultativo de 10-40  $\mu$  de diámetro, muy activo y pleomórfico, su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariotes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios (MARTÍNEZ-PALOMO, 1987), se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes (ORTIZ, 1994).

### **Quiste**

Los quistes son formas redondas, o ligeramente ovaladas, de 8 a 20  $\mu$  de diámetro, los cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente. Su citoplasma es poco denso permitiendo la visualización de los llamados cuerpos cromatóides y nucleólos en número de uno a cuatro (MARTÍNEZ-PALOMO, 1982). Los quistes son una forma de resistencia de la E. histolytica, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la amiba se dá

posiblemente cuando las condiciones ambientales le son desfavorables a los trofozoitos. Aún hoy, dicho evento dista mucho de ser entendido cabalmente por la incapacidad de reproducir el fenómeno para la *E. histolytica in vitro*, sin embargo, se ha podido confirmar un papel importante de la quitina (polímero de N-acetilglucosamina unida por enlaces  $\beta$  (1-4), muy común en hongos, crustáceos e insectos pero ausente en humanos) en la transformación *in vitro* del trofozoito de *Entamoeba invadens* a quiste. Esto pudo comprobarse con inhibidores específicos de quitina los que disminuyeron notablemente el número de quistes formados en cultivo (AVRON ET AL., 1982).

### **Ciclo de vida**

El ciclo de vida es relativamente sencillo. La infección se inicia con la ingesta de quistes (los cuales son capaces de resistir el pH gástrico) provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la llamada exquistación, que consiste en la división del quiste cuatrinucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquistico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoitos. Los trofozoitos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Finalmente, los trofozoitos pueden enquistarse completando el ciclo (RAVDIN, 1986; RAVDIN, 1995).

En la mayoría de los individuos infectados la *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (TRISSEL, 1982).

### Virulencia de la *E. histolytica*

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de la *E. histolytica* a partir de la aparición de los primeros medios sintéticos para su cultivo (DIAMOND, 1961) y su posterior perfeccionamiento (DIAMOND, 1980).

Sin embargo, el papel de la respuesta inmune en el control de la enfermedad no está bien establecido, menos aún el singular comportamiento del parásito observado por décadas, que con frecuencia actúa como comensal y raramente como invasor.

La explicación a esta conducta ha dado origen a una controversia que parece resolverse actualmente, en torno de si existen distintas especies de Entamoeba morfológicamente idénticas pero de diferente patogenicidad y/o virulencia o de si es una sola especie que expresa estas características sólo bajo ciertas circunstancias del medio o del huésped (COHEN, 1995). Actualmente la balanza se inclina por la postura que sostiene que existen distintas especies de Entamoeba que son morfológicamente idénticas. *E. dispar*, la especie más común se asocia principalmente con el estado de portador asintomático. La especie patogénica, referida como *E. histolytica* tiene la capacidad de invadir los tejidos y causar enfermedad sintomática. La existencia de especies distintas fue inicialmente sugerida por Brumpt (BRUMPT, 1925) pero adquirió actualidad por los estudios de zimodemos. Se observó que ciertos zimodemos se asociaban con la enfermedad amibiana invasora (*E. histolytica* patógena y virulenta) en tanto que otros zimodemos lo hacen con el estado de portador asintomático (RAVDIN, 1995). Utilizando sondas de RNA o DNA se identificaron diferencias genéticas entre *E. dispar* y *E. histolytica*. Empleando la técnica de PCR se han encontrado importantes diferencias en fragmentos genómicos de DNA entre ambas especies (TANNICH ET AL., 1989). En muestras clínicas se han podido

distinguir cepas patogénicas de las no patogénicas empleando cDNA (BURCH ET AL., 1991) y lo mismo puede decirse cuando se han empleado sondas de rRNA (CLARK Y DIAMOND, 1991). En lo que se refiere a diferencias antigénicas entre *E. dispar* y *E. histolytica* se han encontrado diferentes epitopos en la subunidad pesada de 170 kDa de la lectina inhibible por galactosa en *E. histolytica* pero no en *E. dispar* (PETRI ET AL., 1990). Otra diferencia es la presencia de eritrocitos ingeridos por la *E. histolytica* lo que no sucede con la *E. dispar* (RAVDIN, 1995). Es predecible que las diferencias se seguirán acumulando.

### **Amibiasis**

La Organización Mundial de la Salud define a la amibiasis: "como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas" (WHO BULLETIN, 1969).

De acuerdo a los síndromes presentados por los individuos infectados, la amibiasis puede ser agrupada como: asintomática, sintomática sin evidencia demostrada de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular (ORTIZ-ORTIZ, 1994). La amibiasis es una enfermedad que como otras se relaciona con la pobreza, la ignorancia, las malas condiciones sanitarias, el hacinamiento y la desnutrición (SEPÚLVEDA, 1982).

La amibiasis está ampliamente distribuida en el mundo, siendo la India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América, las áreas con mayor incidencia (RAVDIN, 1995).



### **Tipos de amibiasis**

La amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal y cuando llega a ser extraintestinal, generalmente involucra al hígado. Aunque existen algunas variantes a este patrón bipolar, no se ve alterado sustancialmente. Así tenemos que, la amibiasis intestinal se asocia con una gama de alteraciones anatómicas, que corresponden a condiciones clínicas bien definidas conocidas como colitis amibiana ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (PÉREZ-TAMAYO, 1986). Desde luego las dos formas más frecuentes de amibiasis son: la rectocolitis amibiana y el absceso hepático amibiano (AHA).

### **La amibiasis intestinal**

Esta es la forma sintomática más frecuente de amibiasis, sin embargo, los síntomas de esta enfermedad son inespecíficos y de poco valor en estudios epidemiológicos. Su incidencia en México es del 9% de los pacientes con diarrea, siendo (en la mayoría de los casos) perfectamente controlables con la aplicación de la quimioterapia adecuada. Algo menos que el 10% de los casos con amibiasis invasora intestinal resulta en infecciones mortales (MARTÍNEZ-PALOMO, 1987).

### Absceso hepático amibiano

El AHA se debe a la presencia de amibas en el hígado, las que llegan ahí por el sistema porta a partir de ulceraciones intestinales, donde aparentemente inducen una pobre respuesta inflamatoria. Se ignora si esto se puede generalizar para todos los casos en humanos, o si simplemente se debe a que una incipiente y temprana respuesta celular ha escapado a su detección en las series de biopsias examinadas (Martínez-Palomo, 1987). Utilizando modelos animales se han podido establecer los eventos celulares que siguen a la infección por *E. histolytica*. Así sabemos que: a las pocas horas de la llegada de la *E. histolytica* a los sinusoides hepáticos, se produce una reacción inflamatoria de tipo agudo (donde predominan los leucocitos polimorfonucleares, entre ellos algunos eosinófilos y escasos mononucleares) alrededor de las amibas, notándose en la periferia de dichos infiltrados núcleos picnóticos y citoplasma eosinofílico. Estas lesiones aumentan paulatinamente de tamaño y se van haciendo más irregulares, los polimorfonucleares sufren de lisis progresiva por acción del parásito y el número de mononucleares se incrementa, los hepatocitos sufren de necrosis y las lesiones tienden a ser confluentes dando origen a granulomas que suelen contener en el centro material necrótico, o eosinofílico. Finalmente, después del quinto día, la coalescencia de los granulomas da origen a zonas necróticas (CHADEE Y MEEROVITCH, 1984; TSUTSUMI ET AL., 1984; SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992), el desenlace de dicho proceso generalmente es la muerte. En opinión de algunos expertos, este aspecto

microscópico no justifica propiamente el término de absceso (PÉREZ-TAMAYO, 1986). El AHA constituye menos del 1% de los individuos con amibiasis invasora aunque esta cifra puede ser mayor en áreas epidémicas (MARTÍNEZ-PALOMO, 1987).

Se sabe que las amibas pueden migrar hacia otros órganos más fácilmente desde el hígado que desde el intestino (SEPÚLVEDA ET AL., 1954). El AHA es 13 veces más frecuente en hombres que en mujeres (TONY Y MARTIN, 1992) y 10 veces más frecuente en adultos que en niños (SEPÚLVEDA Y MARTÍNEZ-PALOMO, 1984); además existen estudios que señalan una posible relación entre el AHA y la frecuencia de ciertos haplotipos en algunos grupos étnicos (ARELLANO ET AL., 1992).

## La respuesta inmune en la amibiasis

La evidencia de que es rara la recurrencia en la amibiasis invasora sugiere que existe alguna forma de inmunidad protectora (DE LEÓN, 1970). Por otro lado se ha hecho énfasis en la relativa importancia de la inmunidad celular sobre la inmunidad humoral en la amibiasis (KRETSCHMER, 1993).

## Inmunidad humoral

Después del séptimo día de desarrollo de un AHA aparecen en el suero títulos elevados de anticuerpos anti-amibas, los cuales persisten hasta por diez años (RAVDIN ET AL., 1990). El papel protector de dichos anticuerpos se antoja dudoso debido a que el AHA sigue su curso, a pesar de que como es sabido los anticuerpos anti-lectina amibiana son capaces de inhibir la adherencia de las amibas *in vitro*. Por otro lado el suero de individuos testigos e infectados (con altos títulos de anticuerpos anti-amiba) es capaz de lisar trofozoitos de cepas no virulentas *in vitro*, por la activación del complemento por sus dos vías, clásica o alterna (REED ET AL., 1983). Las cepas virulentas de *E. histolytica* son resistentes a la lisis mediada por complemento (BRAGA ET AL., 1992).

Existe una respuesta de IgA secretora contra la *E. histolytica* durante la amibiasis invasora como lo prueba la presencia de anticuerpos en el calostro y la saliva. No se sabe si es la infección producida por *E. dispar* o *E. histolytica* lo que induce una respuesta de IgA intestinal que sea efectiva para eliminar al parásito del intestino. No obstante, no existe evidencia de que la amibiasis intestinal ocurra con más frecuencia o sea más severa en individuos con deficiencias de IgA como ocurre en el caso de otro protozoario intestinal (*Giardia lamblia*) (KRETSCHMER, 1993). Lo que sí se sabe, es que los trofozoitos de *E. histolytica* son capaces de degradar a la IgA secretora humana, rasgo que

podría interpretarse como un mecanismo de defensa del parásito a nivel de las mucosas (KELSALL Y RAVDIN, 1993).

### Inmunidad celular

La inmunidad celular parece desempeñar un papel protector importante en la amibiasis como lo sugieren las respuestas celulares obtenidas en modelos animales; la depresión de estas respuestas resultó en un incremento de la invasividad (GHADIRIAN Y MEEROVITCH, 1981A; GHADIRIAN Y MEEROVITCH, 1981B; GHADIRIAN, MEEROVITCH Y KONGSHAVN, 1983) y se comprobó que la protección por vacunación antes de la infección se debía a una respuesta inmune celular (GHADIRIAN, MEEROVITCH Y HARTMAN, 1980; JAIN, SAWHNEY Y VINAYAK, 1980; GHADIRIAN Y MEEROVITCH, 1982c). Además, en estudios de transferencia celular adoptiva ha sido posible proteger del desafío con *E. histolytica* a: perros, cricetos (i.e. "hamsters") y ratones. La célula implicada en la inmunidad a la amiba parece ser el linfocito T, aunque por otro lado no se descarta su participación en algunos fenómenos de supresión (KRETSCHMER, 1994).

Debe notarse que durante la fase aguda del AHA, puede ocurrir una depresión transitoria de: a) la respuesta inmune celular medida por hipersensibilidad de tipo tardío hacia ciertos antígenos amibianos (ORTIZ-ORTIZ ET AL., 1975), b) el número de linfocitos T (HARRIS Y BRAY, 1976; ARCHARYA Y SEN, 1981; GANGULY Y KOSHY, 1981) y c) la producción del factor inhibidor de la migración (MIF) (ORTIZ-ORTIZ ET AL., 1975).

En relación a los linfocitos T, se ha observado que los pacientes con AHA tienen una relación T4/T8 menor a los individuos sanos, pero una vez que se curan, los niveles de linfocitos T4 se restablecen, así como sus respuestas celulares contra la *E. histolytica in vitro* (SALATA ET AL., 1986).

### **Modelos experimentales de amibiasis**

El estudio de la patogenicidad de la amibiasis se ha abordado experimentalmente desde dos puntos de vista: 1) estudios *in vitro* y 2) estudios *in vivo*.

#### **Estudios *in vitro***

Los modelos *in vitro* estudian las confrontaciones de las amibas con células epiteliales del huésped, como reflejo de los procesos relacionados con la invasión de los tejidos humanos. Estas interacciones amiba-células *in vitro* comprenden procesos de: adherencia, lisis dependiente de contacto, fagocitosis y degradación intracelular (MARTÍNEZ-PALOMO, 1985).

#### **La confrontación amiba-leucocitos *in vitro***

En estudios realizados *in vitro*, el evento o confrontación entre trofozoitos de *E. histolytica* y leucocitos (humanos y de otros animales), ha suscitado interés en el proceso como en un posible mecanismo de defensa (CHÉVEZ Y SEGURA, 1974; SALATA ET AL., 1986). Así, se han estudiado diversos tipos de leucocitos como posibles agentes efectores contra la amibiasis.

#### **Los polimorfonucleares**

En estudios de confrontación amiba contra leucocitos polimorfonucleares se ha observado una quimiotaxis positiva alrededor del parásito y un sólido contacto leucocito-amiba (SALATA, COX Y RAVDIN, 1985); en este proceso los leucocitos son lisados y aún fagocitados por amibas virulentas, esta acción destructiva persiste aún con proporciones de 3000 polimorfonucleares por amiba, en

presencia de complemento, o con anticuerpos anti-amiba (mayoritariamente IgG). Por otro lado los polimorfonucleares sólo pueden destruir amibas poco virulentas, empleando para ello mecanismos no oxidativos (JARUMILINTA Y KRADOLFER, 1964; GUERRANT ET AL., 1981; LÓPEZ-OSUNA, CONTRERAS Y KRETSCHMER, 1986).

### **Los eosinófilos**

Estudios realizados con eosinófilos no "activados" y amibas en proporciones de 10:1 y 200:1 mostraron la vulnerabilidad de los primeros ante la *E. histolytica* virulenta. El grado de letalidad mostró ser dependiente de la dosis y del tiempo, sin daño del parásito y el proceso no fue afectado por la presencia de complemento, o anticuerpos anti-amiba (LÓPEZ-OSUNA Y KRETSCHMER, 1989). Sin embargo, cuando se utilizaron en la confrontación eosinófilos "activados" con fMetil-leucil-fenilalanina (fMLP), estos adquirieron propiedades líticas sobre las amibas semejantes a las mostradas por los macrófagos activados (LÓPEZ-OSUNA, ARELLANO Y KRETSCHMER, 1992).

### **Los macrófagos**

La interacción de amibas virulentas con macrófagos normales (i.e. no activados) culmina con la lisis de los últimos sin afectar la viabilidad de las amibas, esta acción es dependiente del contacto e independiente de la presencia de anticuerpos (SALATA Y RAVDIN, 1986). Por el contrario, los macrófagos "activados", con lectinas o linfocinas destruyen a las amibas utilizando para ello mecanismos extracelulares oxidativos y no oxidativos, dependientes del contacto y tiempo e independientes del suero. La acción lítica de los macrófagos sobre las amibas virulentas es efectiva en proporciones que varían de 10:1 a



100:1 encontrándose generalmente una disminución en la viabilidad del macrófago probablemente producida por productos tóxicos liberados por el parásito (SALATA, PEARSON Y RAVDIN, 1985). El IFN- $\gamma$  activa la destrucción de trofozoitos de *E. histolytica* por los macrófagos (SALATA ET AL., 1986; SALATA ET AL., 1987).

### **Los linfocitos**

Los linfocitos T no estimulados sucumben a la actividad citolítica de amibas virulentas *in vitro*, mientras que los linfocitos T8 (citotóxicos) estimulados con lectinas, destruyen a la *E. histolytica* virulenta (SALATA, PEARSON Y RAVDIN, 1985; SALATA, MARTÍNEZ-PALOMO Y MURRAY, 1986).

### **Estudios *in vivo***

Se cree que los huéspedes naturales de la *E. histolytica* son monos del "viejo mundo", en los cuales el parásito puede vivir como comensal sin causar ningún daño (MILLER, 1952). El parasitismo en el hombre y en monos del "nuevo mundo" es un hecho aparentemente reciente que no ha dado origen a un sano equilibrio huésped-parásito, por lo que a menudo resulta en enfermedad (MEEROVITCH Y CHADEE, 1988; TSUTSUMI, 1988).

Se han utilizado una decena de especies animales con el fin de reproducir la enfermedad en condiciones controladas de laboratorio. No obstante, ha sido imposible establecer una infección tal y como ocurre en la naturaleza, esto es: a través de la administración de quistes, producir desenquistamiento y la formación de trofozoitos en el ileon terminal, con el consecuente daño al intestino grueso y otros órganos, principalmente el hígado.

Los primeros modelos animales utilizados para estudiar la amibiasis experimental *in vivo* emplearon perros y gatos, sin embargo, a pesar de que se obtuvieron datos importantes, actualmente su uso tiende a desaparecer debido a la falta de uniformidad, dificultad de manejo y alto costo.

Las ventajas que ofrecen varias especies bien caracterizadas de roedores ha permitido su empleo como buenos modelos de amibiasis experimental, no obstante, debe notarse que siguen existiendo diferencias de respuesta entre ellos, dando origen a que algunos sean mejores para la infección intestinal (cobayos, conejos y ratas) y otros para la hepática (cricetos y gerbos (MEEROVITCH Y CHADEE, 1988; TSUTSUMI, 1988).

#### **Modelos de amibiasis intestinal**

Este tipo de modelo es considerado como el más difícil de lograr. Más inclusive que el modelo de AHA. Para este fin se han utilizado cricetos y cobayos a los que se les producen lesiones amibianas, inoculando directamente al intestino trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en medio axénico (ANAYA-VELÁZQUEZ, 1985). También se han utilizado gerbos (CHADEE Y MEEROVITCH, 1985A; CHADEE Y MEEROVITCH, 1985B; SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992), los cuales son susceptibles de producir lesiones intestinales cuando se les inocula intracecalmente trofozoitos de *E. histolytica*.

## Modelos de amibiasis hepática

El criceto ha sido por mucho el modelo más ampliamente usado para la formación del AHA debido a su elevada susceptibilidad. El modelo fue descrito por Reinertson y Thompson en 1951 y a partir de entonces ha sido muy utilizado (TREVIÑO-GARCÍA MANZO ET AL., 1970; TANIMOTO ET AL., 1971; AGUIRRE-GARCÍA ET AL., 1972). La inducción de AHA experimental en animales, ha dado origen a descripciones minuciosas del parénquima hepático afectado. Útiles en la comprensión del establecimiento del parásito y la formación subsecuente del AHA (TSUTSUMI ET AL., 1984; TSUTSUMI Y MARTÍNEZ-PALOMO, 1988).

El empleo de gerbos (*M. unguiculatus*) fue propuesto por Diamond en 1974 (DIAMOND ET AL., 1974). Este autor fue capaz de producir AHA experimental inoculando intrahepáticamente trofozoitos de *E. histolytica* a un grupo de estos animales. Un hallazgo importante fue la observación de que la *E. histolytica* resultaba menos virulenta en gerbos que en cricetos. Esto sugería que dicho modelo resultaría más parecido al de la amibiasis humana, por lo que desde entonces se ha empleado para estudiar la patología de la amibiasis, produciendo AHA experimental mediante la inoculación de amibas por vía intrahepática o intraportal (CHADEE Y MEEROVITCH, 1984; CHADEE Y MEEROVITCH, 1984B; SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992).

### La confrontación amibas-leucocitos *in vivo*

Una forma apropiada de evaluar el encuentro amiba-leucocitos *in vivo* ha sido el empleo de modelos de AHA en animales (prefiriéndose los gerbos por el parecido de las lesiones inducidas con las de los humanos), donde bajo condiciones controladas, se han observado los eventos celulares que se presentan durante las diferentes etapas de dicha infección. Debido a los resultados obtenidos con los estudios *in vitro* de la interacción eosinófilos "activados"-amibas nos propusimos confirmar estos hallazgos *in vivo*; con este propósito se desarrollaron los estudios que se presentan en esta tesis.

## LOS EOSINÓFILOS

Los eosinófilos son leucocitos polimorfonucleares, producidos en la médula ósea, que migran a través de la sangre hacia los tejidos. En 1879, Paul Ehrlich describió por primera vez sus propiedades de tinción, es decir, la gran afinidad de sus gránulos por los colorantes ácidos como la eosina, de ahí su nombre (SPRY, 1993). Debido a la carencia de proteínas estirpe específicas en su superficie membranal, la coloración de sus gránulos sigue siendo un criterio válido para diferenciarlo de los otros leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y basófilos). Su tamaño es parecido al de los neutrófilos (8 $\mu$  de diámetro), poseen un núcleo bilobulado y gránulos citoplasmáticos distintivos. En seres humanos sanos su número es reducido en la circulación; 0.5-1.5% de los leucocitos circulantes son eosinófilos ( $\leq 400$  /mm<sup>3</sup> en número absoluto), mientras que en la médula ósea representan el 3.0-3.5% de las células (GLEICH, 1988; WELLER, 1991).

### Gránulos

Una de las principales funciones de los eosinófilos es su citotoxicidad, esto se debe en gran parte a la acción de las diferentes proteínas provenientes de sus gránulos citoplasmáticos. Dichos gránulos se pueden dividir en:

Gránulos específicos (responsables de las propiedades tintoriales y generalmete identificados por su abreviación en inglés); son los más grandes y aparentes, contienen hidrolasas lisosomales, así como la mayoría de las proteínas catiónicas únicas de los eosinófilos. Además poseen un núcleo cristalóide compuesto por la proteína básica principal (MBP), una matriz que contiene la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa eosinófilica (EPO).

Gránulos primarios; carecen de un núcleo cristalóide y son de desarrollo temprano en la maduración de la célula.

Gránulos pequeños; contienen arilsulfatasa y otras enzimas.

Los eosinófilos poseen otras estructuras no consideradas como gránulos llamados "cuerpos lípidos", que son inclusiones de lípidos no unidos a la membrana celular (WELLER, 1991).

### **Función de los eosinófilos**

Por mucho tiempo los eosinófilos escaparon a la atención de los investigadores, al contrario de sus parientes cercanos, el polimorfonuclear neutrófilo y el basófilo, quizá por su peculiar comportamiento. Así, a principios de siglo se pensaba en un papel protector de los eosinófilos removiendo detritus y destoxificando tejidos en enfermedades alérgicas y granulomatosas (SCHWARZ, 1914). A mediados de siglo se les atribuyó alguna participación en el efecto de la histamina y en la presentación de antígeno para la síntesis de anticuerpos (SPEIRS, 1958).

Otros posibles papeles incluyeron la reparación de tejidos como el útero en algunos animales (BASSET, 1962), como acelerador de los mecanismos de reparación después de un trauma (BAKER ET AL, 1976) y como estimulador de la producción de moco en el epitelio glandular. A partir de los 70's se han involucrado a los eosinófilos en procesos "pro-inflamatorios" y de defensa contra organismos potencialmente patógenos, como los helmintos (BUTTERWORTH, 1984). En los 80's la atención se centró en la hipótesis de que los eosinófilos podían regular las respuestas mediadas por las células cebadas (AUSTEN, 1987). Por otro lado se sabe de su capacidad para secretar sus compuestos granulares almacenados, mediadores lípidos recién formados y productos del metabolismo

del oxígeno, los cuales pueden afectar a células y tejidos adyacentes en el proceso de la inflamación (GLEICH, 1988; WELLER, 1991). Actualmente los eosinófilos se asocian a distintas enfermedades, entre las que podemos citar: parasitosis por helmintos, enfermedades alérgicas, asma, síndrome hipereosinófilico, y algunas otras de causas menos definidas (HENDERSON ET AL., 1980; O' DONNELL ET AL., 1983; ZHEUTLIN ET AL., 1984; BUTTERWORTH, 1984; HENDERSON, 1987).

### **El papel de la IL-5 en la eosinofilopoyesis**

A partir de los trabajos de Beeson se supo que la eosinofilopoyesis estaba bajo el control de los linfocitos T (BASTEN Y BEESON, 1970). Son tres las citocinas involucradas en la producción y maduración de los eosinófilos: el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), la interleucina 3 (IL-3) que estimula el desarrollo de los eosinófilos y otros leucocitos, y la interleucina 5 (IL-5) que es específica para el desarrollo y diferenciación de los eosinófilos (CLUTTERBUCK ET AL., 1988; SONODA ET AL., 1989).

La IL-5 posee algunas propiedades entre las que destacan: el aumento de la desgranulación de los eosinófilos inducida por el receptor de IgG (FUJISAWA ET AL., 1990), es quimioattractante para los eosinófilos (WANG ET AL., 1989) y aumenta la liberación de histamina y LTC<sub>4</sub> de los basófilos (LÓPEZ ET AL., 1990; BISCHOFF ET AL., 1990).

Su acción *in vitro* sobre la diferenciación y proliferación de precursores de eosinófilos ha sido confirmada al utilizar IL-5 recombinante (YAMAGUCHI ET AL., 1988), así como también su expresión bajo diferentes tipos de estimulación (TOMINAGA ET AL., 1988).

Por todo lo anterior, resulta obvio el relacionar a la IL-5 con el incremento de eosinófilos circulantes. Este indicio se ha podido comprobar *in vivo* al observarse una relación directamente proporcional entre el número de eosinófilos y la cantidad de IL-5 en un ratón, cuya eosinofilia fue causada por infección con *T. canis* (YAMAGUCHI ET AL., 1990).

### **Métodos de determinación de IL-5**

En la determinación de IL-5 se emplean las llamadas pruebas biológicas que utilizan líneas celulares dependientes de IL-5, interpretándose el grado de crecimiento de estas células como una medida de la actividad biológica de la citocina (COLIGAN ET AL., 1995); así como las cuantificaciones directas de la interleucina, utilizando estuches comerciales de pruebas de ELISA que emplean anticuerpos monoclonales, ligados a una enzima.

### **Modelos de eosinofilia**

Se define como eosinofilia al aumento del número de eosinófilos (esencialmente  $\geq 400$  eosinófilos/mm<sup>3</sup>) en la corriente sanguínea. Sabemos que esta condición es una característica de algunas parasitosis, especialmente aquellas que involucran la migración de estados larvarios como en los helmintos (GLEICH, 1988).

Con el fin de estudiar el papel de los eosinófilos en algunos procesos biológicos se han ideado modelos animales de eosinofilia en roedores (ratones, ratas,



cobayos y gerbos (COOK, SMITH Y SPICER, 1993; VELÁZQUEZ, 1994), los cuales han empleado diferentes agentes inductores como son:

- a) la ciclofosfamida (CY) seguida de la inoculación de un antígeno no parasitario como la hemocianina de la lapa de mar (KLH) (VADAS, 1981).
- b) CY más otros antígenos, incluyendo algunos parasitarios (VADAS, 1982; WAKELIN Y DONACHIE, 1983; LAMMAS ET AL., 1988).
- c) inoculación intramuscular con antígeno parasitario de *T. canis* (VELÁZQUEZ ET AL., 1994).
- d) la infección con *Trichinella spiralis* (LAMMAS ET AL., 1989).
- e) la inoculación oral con huevos de *Ascaris suum* (MITCHELL, 1979; SUGANE, 1988).
- f) la infección con *Nippostrongylus brasiliensis* (WATANABE ET AL., 1988).
- g) la inyección intravenosa de partículas como el sephadex (WALLS Y BEESON, 1972) o partículas de latex cubiertas de proteína (SCHRIEBER Y ZUCKER-FRANKLIN, 1974).
- h) aquellos que utilizan los productos de la biología molecular más recientes como son la inyección intraperitoneal a ratones con IL-5 recombinante humana (FATTAH ET AL., 1990), o murina (HITOSHI ET AL., 1991), o la aplicación de la ingeniería genética, creando ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la IL-5 (DENT ET AL., 1990; HITOSHI ET AL., 1991).

### **El papel del eosinófilo en la amibiasis**

La eosinofilia no es una característica de las amibiasis intestinales y extraintestinales, y es bien conocido el aumento de leucocitos circulantes con grandes porcentajes de polimorfonucleares en los casos de AHA (REED Y BRAUDE, 1988). Sin embargo, como ya se mencionó, el eosinófilo es una de las primeras células en acudir al llamado en las reacciones inflamatorias tempranas, por lo no puede descartarse su posible intervención en la lucha contra la E. histolytica.

### **La confrontación del eosinófilo y la amiba in vitro**

Como se señaló en el apartado "La confrontación amibas-leucocitos in vitro" la participación del eosinófilo en la amibiasis ha cobrado vigencia, siendo los llamados eosinófilos "activados" potentes células citolíticas in vitro de la E. histolytica virulenta.

### **La confrontación del eosinófilo y la amiba in vivo**

La idea de confirmar los hallazgos in vitro con experimentos in vivo, se tradujo primero en un modelo de rata con eosinofilia a la que se le produjeron lesiones testiculares amibianas (LÓPEZ-OSUNA ET AL., 1990). Los resultados de dicho experimento no arrojaron evidencia de una posible participación del eosinófilo en el establecimiento de la lesión amibiana ya que las lesiones testiculares en ratas eosinofílicas fueron en todo similares a las observadas en las ratas testigo. Sin embargo, dicho modelo no es muy afortunado si consideramos la resistencia natural de la rata a la amibiasis.

El presente trabajo es un enfoque nuevo para el estudio de la confrontación amiba-eosinófilo *in vivo*, en el cual utilizamos un modelo de AHA experimental en gerbos con eosinofilia producida por la administración de un antígeno parasitario (*T. canis*); con ello se pretende estudiar el probable papel del eosinófilo como célula efectora en el combate contra la amibiasis invasora.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### TÉCNICAS

#### 1.- Cuentas totales y diferenciales de leucocitos y eosinófilos

##### a) Cuenta de leucocitos

Los animales previamente anestesiados (ver sección 6), se sangraron cada tercer día, por la mañana. La cuenta total de leucocitos se realizó utilizando pipetas para cuenta de glóbulos blancos, éstas se llenaron hasta la marca de 0.5 con la sangre y luego se diluyó (1:20) con líquido de Turk [(ácido acético glacial al 3%, agua destilada 97% y azul de metileno 0.001%) (LYNCH ET AL., 1977)] . Las pipetas se colocaron en un agitador Solbat (Aparatos Científicos) por 30 segundos, posteriormente se procedió a descartar las tres primeras gotas de cada pipeta y a llenar las cámaras de Neubauer donde se efectuó el conteo según el método habitual (LYNCH ET AL., 1977).

##### b) Determinación del número absoluto de eosinófilos

Los eosinófilos se calcularon utilizando frotis matinales de sangre periférica, teñidos con la técnica de Wright, calculando el porcentaje (cuenta diferencial en 200 células) y el número absoluto/mm<sup>3</sup> (LAUFER ET AL., 1987).

## 2.- Características de los gerbos

Se utilizaron gerbos (*M. unguiculatus*) machos y hembras de nuestra colonia (establecida a partir de algunos animales gentilmente donados por el Dr. G. Acosta), de dos meses a un año de edad, con un peso entre 65 y 110 g. Dichos animales en número no mayor de seis, se agruparon por sexo en jaulas y se alimentaron con Purina<sup>®</sup> y agua *ad lib*.

## 3.- Parásitos y obtención de antígenos

a) Parásitos: *T. canis* y *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*)

i) Gusanos de *T. canis*

A grupos de 15 a 20 cachorros callejeros menores de 4 meses (facilitados por un asilo de animales) se les desparasitó con piperazina (Piperawitt, Lab. Colliere, SSA, México), 10 mg/Kg. de peso, administrada por vía oral. En el transcurso de las siguientes 18 hs se recolectaron las heces, y se obtuvieron los gusanos que se lavaron con agua corriente y solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.2. Los gusanos de *T. canis* se seleccionaron en base a los siguientes criterios morfológicos: los machos presentan un par de alas cervicales de forma lanceolada, en promedio son más pequeños que las hembras, (10 y 18 cm respectivamente); además, presentan en la punta de la cola un pequeño apéndice que se asemeja a un dedo pequeño (DUNN, 1983). Cada lote consistió de al menos 30 gusanos.

ii) Gusanos de A. lumbricoides

Se obtuvieron 30-40 gusanos adultos de A. lumbricoides entre machos y hembras, de la colección del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

b) Obtención de antígenos

i) Antígeno de T. canis larva-cascarón

Se seleccionaron las hembras a partir de 40 gusanos adultos de T. canis (DUNN, 1983), se les hizo un corte longitudinal con el fin de extraerles el útero y los oviductos, éstos se sometieron a presión de arrastre utilizando varillas de vidrio en forma de L con el fin de expulsar los huevos, los que se lavaron en PBS con formol al 1% y posteriormente se incubaron en la oscuridad a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por no menos de tres semanas. La viabilidad de los huevos se mantuvo en observación (determinada por microscopía de luz), y cuando llegó a ser mayor de 60% se sonicó el material con cinco ciclos de un minuto (min) cada uno, se liofilizó y se separó en alícuotas que se mantuvieron a -70°C hasta su uso (SMITH, 1989). Antes de utilizarlo el antígeno se hidrató con PBS pH 7.4 y se determinó el contenido de proteínas utilizando el método de Lowry con el objeto de ajustarlo a la dosis requerida (METCALF ET AL., 1986).

ii) Antígenos de *T. canis* y *A. lumbricoides* adultos

Se trituraron de 30 a 40 gusanos machos y hembras adultos de cada parásito en un homogenizador, modificado de Dounce, sumergido en baño de hielo. El material se sonicó con cinco ciclos de 1 min cada uno, se filtró en una malla de metal No.20 y se liofilizó siguiendo el mismo procedimiento que se indicó antes (CROWCROFF Y GILLESPIE, 1991; VILLANUEVA Y KOZEK, 1992).

El proceso de obtención de antígenos parasitarios se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología de la E.N.C.B del IPN, contando con donación de especímenes de colección de dicha institución y la asesoría de la Maestra Patricia Llaguno Violante.

#### 4.- Adyuvantes usados

Adyuvante comercial Titer-Max (Vaxcel, Inc. USA) compuesto por una emulsión de agua-aceite y partículas de sílica recubiertas de copolímero que actúan como estabilizante. De acuerdo a las especificaciones del fabricante se mezcló antígeno de *T. canis* adulto y adyuvante en proporción volumétrica de 50:50 antes de ser utilizado.

Adyuvante incompleto de Freund (Sigma Co, St. Louis, Mo., USA). El antígeno de *T. canis* adulto se mezcló en proporción volumétrica de 50:50 en dicho adyuvante antes de ser utilizado.

## 5.- Cultivos de *E. histolytica*

### Amibas

Se utilizó la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* cultivada en medio axénico TYI-S-33 (DIAMOND ET AL., 1978). Para la preparación del inóculo, las amibas se cosecharon durante la fase logarítmica (72 hs); se incubaron en agua de hielo durante 10 min y se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C (centrifuga IEC Centra MP4R). Después de retirar el sobrenadante, los trofozoitos se resuspendieron en solución salina fisiológica estéril fría, y utilizando azul tripano al 0.5% se contaron las amibas viables al microscopio en una cámara de Neubauer (METCALF ET AL., 1986). Las dosis utilizadas siempre se ajustaron en un volumen total de 0.1 ml de solución salina.

## 6.- Inoculación Intraportal de trofozoitos de *E. histolytica*

Los gerbos se anestesiaron con una inyección intramuscular (IM) de 0.2 ml de Dehydrobenzperidol (2.5 mg/ml) (Janssen Farmacéutica de México) (0.5 mg), después de 5 min se aplicó otra inyección por la misma vía de 0.3 ml de Ketamina (50 U/ml) (Ketalar<sup>®</sup>, Parke, Davis y Cia. de México S.A de C.V) (15 U). Posteriormente se rasuraron los animales en la región ventral con navaja de afeitar, se les colocó en una mesa de disección en posición decúbiteo dorsal, sujetando sus extremidades a los lados de la mesa. Previa asepsia (con tintura de mercurio) de la región a operar, se procedió a cubrir ésta con gasas estériles. Trabajando siempre en condiciones quirúrgicas estériles, se



hizo una incisión longitudinal media abdominal de aproximadamente 3 cm con una hoja de bisturí No. 22, en la parte ventral izquierda del animal y paralela a la glándula de secreción. Se abrió la cavidad abdominal en dos planos, piel y pared muscular, se expusieron los intestinos, se localizó la vena porta en el mesenterio. Se inyectaron suave y lentamente las amibas contenidas en solución salina fría, utilizando una jeringa de insulina con aguja No. 27 x 13 mm. Para controlar la hemorragia que sigue a la extracción de la aguja se utilizó Gelfoam<sup>®</sup> (Upjohn, México), colocando en el sitio de la inoculación minitorundas con ligera presión intermitente, la incisión se cerró por planos utilizando sutura de polipropileno (Mercilene<sup>®</sup>) (Ethicon Incorp., N.J., USA) de cuatro ceros, y finalmente se desinfectó la herida con mertiolato o furozona (Topazone<sup>®</sup>) (Lab. Columbia, México). Los animales se dejaron en jaulas aisladas hasta su sacrificio.

#### **7.- Toma de muestra de tejido de hígado, su procesamiento y tinción**

Se obtuvieron las muestras de tejido de los hígados de cortes realizados en los mismos sitios (lóbulos) en todos los animales, el material se colocó en solución de formol al 10% en PBS (MEEROVITCH Y CHADEE, 1988) hasta su procesamiento esto es, su inclusión en en parafina, cortado en un microtomo y teñido con hematoxilina-eosina.

El área de los microabscesos se midió utilizando un micrómetro colocado (American Optical, Co., USA) en un microscopio Reichert, se contaron 10 campos a 20x anotando y cuantificando la presencia de amibas.

#### 8.- Determinación cuantitativa de IL-5

Para la cuantificación de IL-5 en suero además de las muestras de sangre obtenidas de los animales que se mencionan en los grupos experimentales (ver más adelante), se obtuvieron muestras de los siguientes grupos:

- i) Diez gerbos machos de 7 meses de edad y de 75-95 g sin ningún tipo de manipulación previa (testigos basales).
- ii) Cinco gerbos machos de 8 meses y de 80-100 g a los que se les inoculó por vía intramuscular (IM) 0.1 ml de solución salina a los 0, 4, 7 y 14 días después de iniciado el experimento (testigos con solución salina).
- iii) Seis gerbos machos de 6 meses y de 70-75 g a los que se les indujo eosinofilia por inoculación IM de antígeno de *I. canis* sin adyuvante (testigos eosinofílicos sin AHA).

Todos los animales se sangraron por punción intracardiaca utilizando jeringas de 3 ml y agujas de 20 x 32 mm. La sangre de cada animal se dejó coagular en tubos estériles de poliestireno de 13 x 100 mm (Falcon®) que luego se centrifugaron a 3000 rpm, 10 min. Posteriormente, se separaron los sueros así obtenidos utilizando jeringas de tuberculina con aguja de 25 x 32 mm, y se colocaron en criotubos estériles de polipropileno (Bio-Freeze

Vials, Costar<sup>®</sup>) de 1.8 ml guardándolos a -70°C en un congelador (Revco) hasta su uso.

Para determinar la IL-5 se empleó un estuche comercial (Endogen, Inc., USA) cuya técnica es la siguiente: en cada pozo de una microplaca para ELISA recubierta con anticuerpos anti-IL-5 murina, se colocaron 50 µl de solución de placa (proporcionada en el equipo), más 50 µl de cada muestra a determinar (estándares o sueros). Se incubó la microplaca por 2 hs a 37°C, se lavó con solución amortiguadora y se agregó 100 µl del conjugado anticuerpo anti-IL-5 murina-enzima incubándose de nuevo por 1 h a 37°C. Al cabo de este tiempo se lavó nuevamente y se agregó a cada pozo 100 µl del sustrato enzimático, dejándose desarrollar el color en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente se detuvo la reacción adicionando 100 µl de un ácido inorgánico y se leyó en un lector (Microwell System Reader 530, Organon Teknika) a 450 nm.

## GRUPOS EXPERIMENTALES Y TESTIGOS

### 1.- Inducción de eosinofilia

#### a) Grupo con antígeno de *T. canis* larva-cascarón

A un grupo de cuatro animales se les inoculó un volumen equivalente a 1 mg de proteína del antígeno parasitario de *T. canis* larva-cascarón por vía IM, a los 0, 3, 14 y 22 días post-inoculación.

b) Grupo con antígeno de T. canis adulto

A otro grupo compuesto de cinco gerbos, se les inoculó un volumen equivalente a 1 mg de proteína del antígeno parasitario de T. canis adulto a los 0, 3, 8 y 15 días después del inicio del experimento.

c) Grupo testigo

Integrado por cinco animales que se inocularon por vía IM con 0.1 ml de solución salina al 0.85% cada vez, a los 0 (primer día de inoculación), 3, 14 y 22 días post-inoculación.

d) Grupo con antígeno de A. lumbricoides

Se formó con tres animales a los que se les inoculó con un volumen equivalente a 1 mg del antígeno parasitario de A. lumbricoides a los 0, 3, 8 y 15 días posteriores al inicio del experimento.

En todos los casos el volumen total inoculado nunca fue mayor a 0.6 ml. conteniendo 1 mg de proteína del antígeno parasitario.

A todos los grupos se les determinó cada tercer día el número de leucocitos y de eosinófilos en cámara de Neubauer y en frotis de sangre periférica matinales como ya se describió en TÉCNICAS sección 1.

## 2.- Pruebas de virulencia

La virulencia de la *E. histolytica* (definida como la aparición de AHA en el 100% de animales inoculados con amibas) se probó antes de relar a cada grupo de gerbos. Esto se hizo inoculando  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de *E. histolytica* virulenta (cultivos de 72 hs) por vía porta (ver TÉCNICAS sección 6) a gerbos menores de un año de edad y de entre 60 y 110 g (24 pruebas) los que desarrollaron AHA en cuatro días post-inoculación.

3.- Establecimiento de la dosis mínima de inoculación de los trofozoitos de *E. histolytica* capaz de producir AHA experimental.

Intentamos usar una dosis que no fuera tan agresiva para los gerbos como la utilizada comúnmente en la inducción del AHA experimental ( $2.5 \times 10^5$ ), pero que al mismo tiempo nos permitiera la confirmación microscópica del absceso desde una fase temprana; por lo que se probaron dosis de  $5 \times 10^4$ ,  $7.5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ . Esto con el fin de aumentar las probabilidades de demostrar un efecto de los eosinófilos en estos fenómenos.

a) Gerbos inoculados con  $5 \times 10^4$  trofozoitos de *E. histolytica*

- i) Un grupo de tres gerbos de 8 meses de edad y 70-80 g se inoculó con  $5 \times 10^4$  trofozoitos de *E. histolytica* por vía porta y se sacrificó a las 6 hs post-inoculación utilizando una sobredosis de anestesia.
- ii) Otro grupo de tres gerbos machos de 9 meses de edad y 60-70 g se inoculó con  $5 \times 10^4$  trofozoitos por vía porta, se sacrificó a las 24 hs post-inoculación.

b) Gerbos inoculados con  $7.5 \times 10^4$  trofozoitos

- i) Un grupo de tres gerbos machos de 7 meses de edad y 65-75 g se inoculó con  $7.5 \times 10^4$  trofozoitos por vía porta y se sacrificó a las 6 hs post-inoculación.

ii) Otro grupo de tres gerbos machos de 7 meses de edad y 60-70 g se inoculó con  $7.5 \times 10^4$  *E. histolytica* por vía porta y se sacrificó a las 24 hs post-inoculación.

c) Gerbos inoculados con  $1 \times 10^5$  trofozoitos

i) Un grupo de cuatro gerbos machos de 8 meses 70-80 g se inoculó con  $1 \times 10^5$  amibas por vía porta sacrificándose a las 6 hs post-inoculación.

ii) Otro grupo de tres gerbos machos de 7-9 meses 75-80 g se inoculó con  $1 \times 10^5$  trofozoitos por vía porta y se sacrificó después de 24 hs.

A todos los animales se les tomó muestras de hígado, las que se procesaron para su estudio histológico (ver TÉCNICAS sección 7).

#### **4.- Inducción de AHA experimental para el estudio de etapas tempranas (6, 24 y 96 hs post-inoculación de la amiba)**

a) Gerbos eosinofílicos

Se formaron tres grupos de animales con las siguientes características:

i) Doce gerbos machos de 5 a 6 meses de edad y de 60-110 g para ser sacrificados a las 6 hs post-inoculación de las amibas (siete de estos animales se sangraron para la determinación de IL-5).

ii) Ocho gerbos machos de 10 meses de edad y de 80-110 g sacrificados a las 24 hs post-inoculación (tres de estos animales se sangraron para la determinación de IL-5).

iii) Nueve gerbos machos de 6-7 meses de edad y de 70-100 g sacrificados a las 96 hs post-inoculación (siete de estos animales se sangraron para la determinación de IL-5).

A todos los animales se les indujo eosinofilia previamente inyectándoles el equivalente a 1 mg de proteína de antígeno de *T. canis* adulto, sin adyuvante, los días 0, 4, 7 y 14 después del inicio del experimento. En el día 21 (máxima eosinofilia de acuerdo a pruebas previas, ver TÉCNICAS Sección 1 y Resultados) los gerbos se inocularon con  $1 \times 10^5$  trofozoitos por vía portal; transcurrido el tiempo a evaluar (6, 24 y 96 hs como ya se indicó) se procedió a sacrificar a los animales, extrayendo sus hígados y procesándolos para su revisión microscópica.

b) Gerbos no eosinofílicos (normales)

Se formaron tres grupos de animales con las siguientes características:

i) Trece gerbos machos de 7 a 8 meses de edad y de 60-80 g sacrificados a las 6 hs post-inoculación de las amibas (de dos de estos animales se obtuvo sangre para la determinación de IL-5).

ii) Ocho gerbos machos de 8 meses de edad y de 75-95 g sacrificados a las 24 hs post-inoculación (dos de ellos se sangraron para la determinación de IL-5).

iii) Ocho gerbos machos de 6 meses de edad y de 80-100 g sacrificados a las 96 hs post-inoculación de las amibas (siete se sangraron para la determinación de IL-5).



Todos los animales se inocularon con  $1 \times 10^5$  amibas por vía portal, y transcurrido el tiempo a evaluar (6, 24 y 96 hs como se mencionó) se procedió a sacrificarlos, a extraer sus hígados y procesarlos para su exámen.

c) Gerbos normales (testigos de manipulación quirúrgica)

Se formaron tres grupos de animales con las siguientes características:

- i) Cuatro gerbos machos de 7 meses de edad y de 110-115 g sacrificados a las 6 hs post-inoculación.
- ii) Cuatro gerbos machos de 4 meses de edad y de 60-70 g sacrificados a las 24 hs post-inoculación.
- iii) Cuatro gerbos machos de 6-10 meses de edad y de 60-70 g sacrificados a las 96 hs post-inoculación.

Los tres grupos se inocularon con 0.1 ml de solución salina fisiológica por vía porta y con la misma técnica y condiciones estériles que los grupos anteriores, transcurrido el tiempo a evaluar (6, 24 y 96 hs) se sacrificaron y procesaron como los anteriores.

5.- Inducción del AHA experimental para el estudio en etapa tardía de sobrevida actuarial (hasta 45 días post-inoculación)

a) Gerbos eosinofílicos

El grupo se formó con 10 gerbos machos de 4-7 meses de edad y con peso de 65-90 g.

A todos los animales se les indujo eosinofilia de la forma antes descrita, y en el día 21 (máxima eosinofilia) se inocularon con la dosis de los trofozoitos de E. histolytica ya mencionada. Los animales se mantuvieron en observación hasta por 45 días durante los cuales se obtuvieron muestras de los hígados en los animales que iban muriendo, registrándose los días de sobrevivencia. Los animales sobrevivientes a los 45 días post-inoculación se sacrificaron empleando una sobredosis de anestesia y se les extrajeron y procesaron sus hígados de la manera ya mencionada (siete de estos animales fueron sangrados para la determinación de IL-5).

b) Gerbos no eosinofílicos (normales)

Grupo formado con nueve gerbos machos de 5-9 meses de edad y 65-80 g.

Los animales se inocularon con E. histolytica por vía intraportal, se mantuvieron en observación hasta por 45 días, registrándose los días de sobrevivencia de cada animal y se procesaron sus hígados al fallecer (tres de estos animales se sangraron para la determinación de IL-5).

c) Gerbos normales (testigos de manipulación quirúrgica)

Se formaron con tres gerbos machos de 4 meses de edad y 60-70 g de peso.

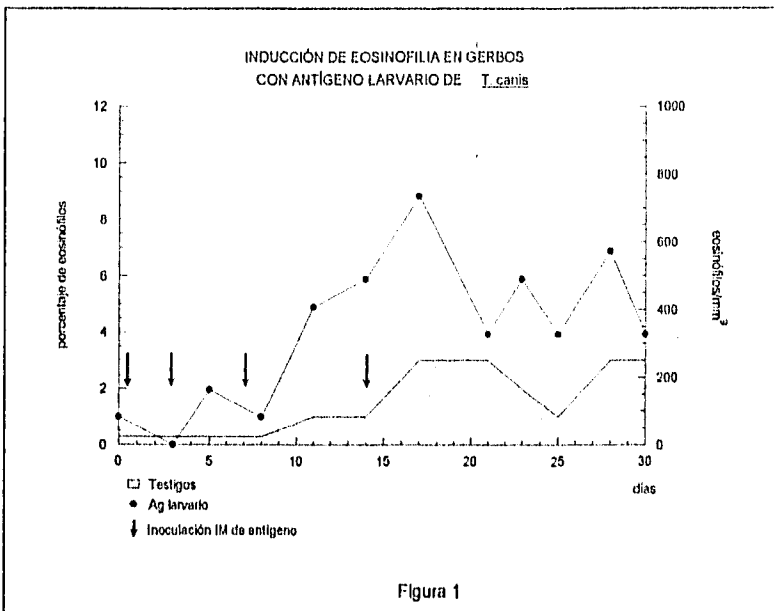
Todos los animales se inocularon con solución salina fisiológica por vía porta y se mantuvieron en observación hasta por 45 días, luego se procedió a sacrificarlos y a procesar sus hígados.

## RESULTADOS

### MODELO DE EOSINOFILIA

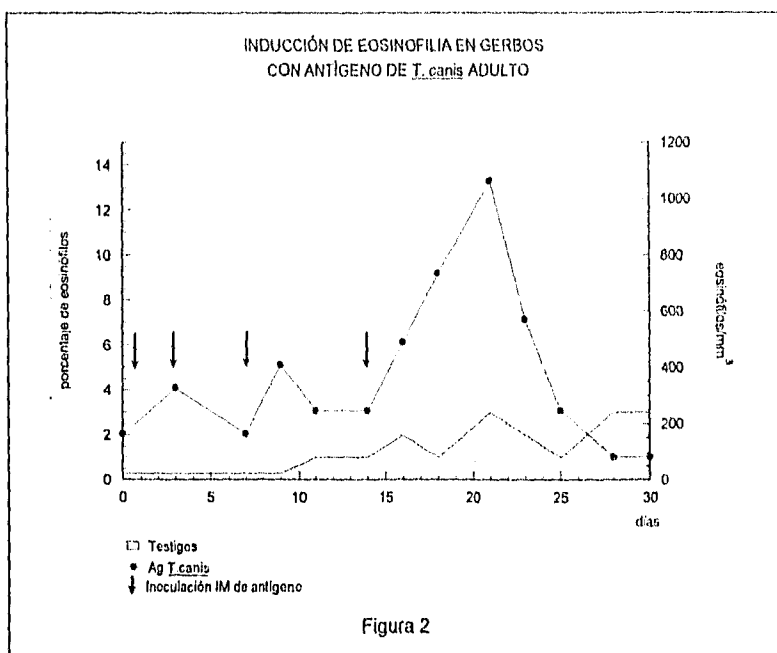
Los antígenos que se utilizaron para lograrlo fueron:

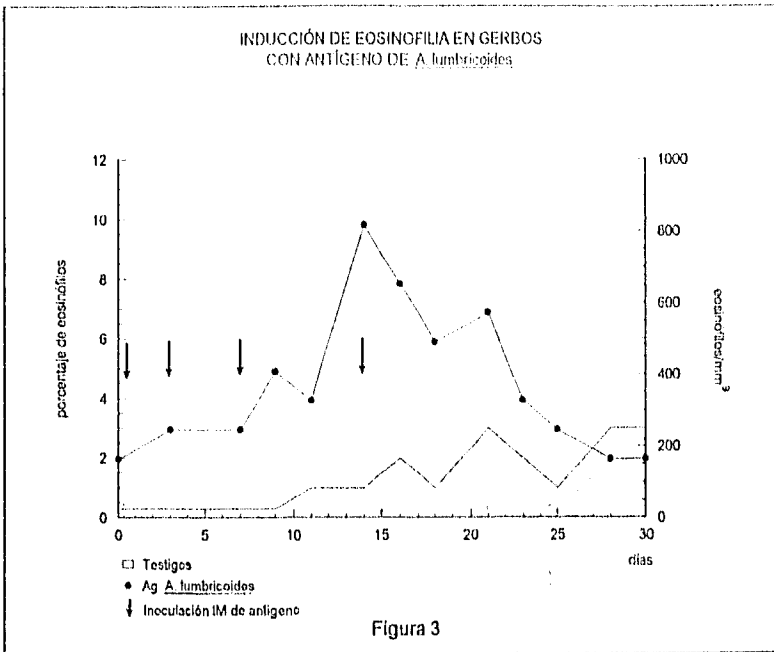
- antígeno de larva y/o cascarón de *T. canis*
- antígeno de *T. canis* adulto
- antígeno de *A. lumbricoides* adulto
- El grupo testigo, se inoculó con solución salina fisiológica (SSF) con la misma frecuencia y bajo las mismas condiciones que los antígenos parasitarios.



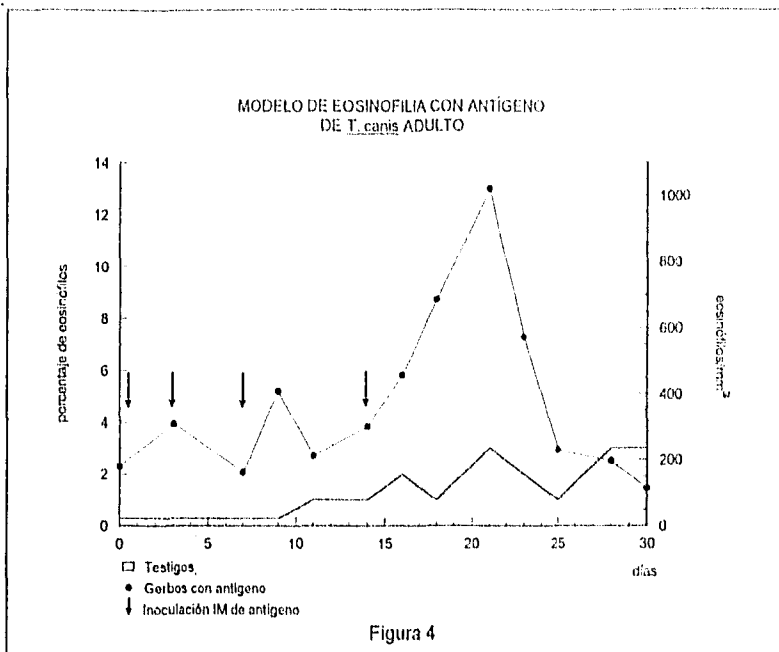
El comportamiento del número de eosinófilos circulantes es el que se muestra en las figuras 1, 2, 3 y 4. Encontramos en los testigos  $3.5 \pm 0.3\%$  ( $\bar{X} \pm EE$ ) de

eosinófilos (porcentaje en sus picos máximos en los días 17-21 y 28-30). En los gerbos inyectados con antígeno de *T. canis*, los eosinófilos llegaron a un máximo de  $9.0 \pm 1\%$  de eosinófilos a los 17 días post-inoculación (antígeno larva-cascarón) y de  $13.0 \pm 0.6\%$  de eosinófilos a los 21 días post-inoculación (antígeno adulto).





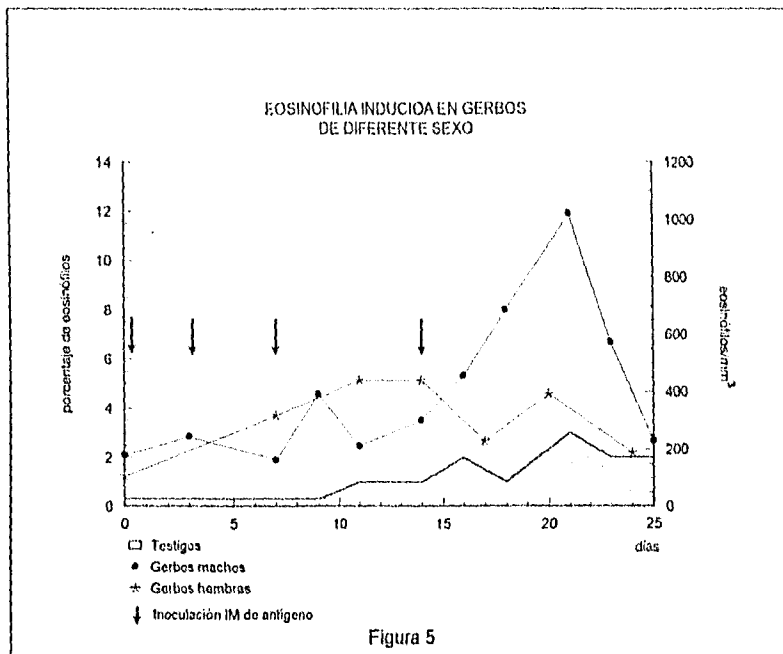
Los animales inyectados con antígeno de *A. lumbricoides* dieron un pico máximo de eosinófilos de  $10.0 \pm 0.8\%$  a los 14 días post-inoculación. La diferencia de eosinofilia con cualquiera de los tres antígenos fue significativamente mayor que la observada en los animales testigos ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.005$  y  $p < 0.001$  respectivamente). Decidimos utilizar el antígeno de *T. canis* adulto debido a que con éste se obtuvo el máximo de eosinofilia.



La figura 4 muestra un comportamiento típico del porcentaje de eosinófilos circulantes después de la inoculación vía IM con antígeno de *T. canis* y establece el modelo de eosinofilia que se utilizó en todos los experimentos.

Es de hacer notar que durante el proceso de estandarización de la eosinofilia se observó un comportamiento diferente entre machos y hembras (fig. 5); es decir, las hembras después de la inoculación con antígeno parasitario, dieron un pico de  $5.4 \pm 0.6\%$  de eosinófilos circulantes en un tiempo más corto (11-14 días) comparado con los machos  $12.5 \pm 8.0\%$  de eosinófilos en 21 días. Aunque estas diferencias no resultaron significativas se decidió trabajar en lo sucesivo con

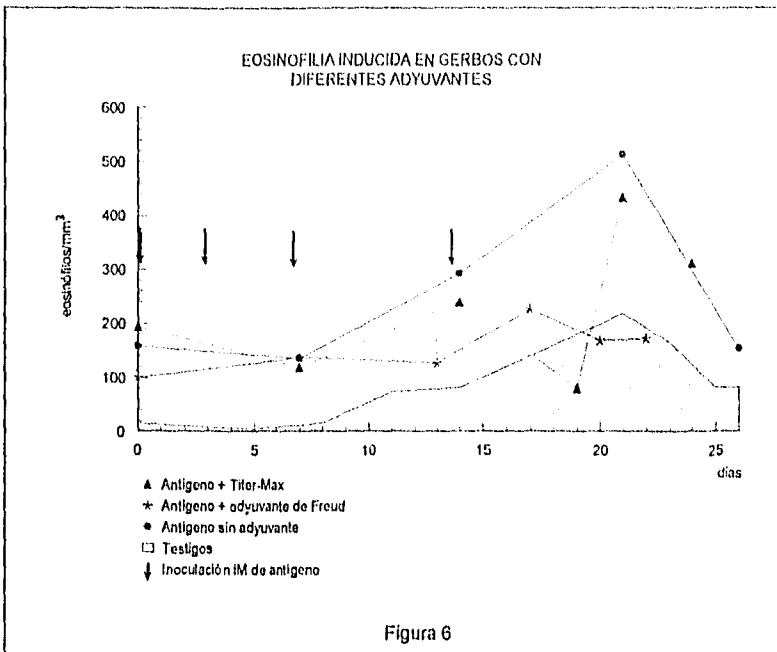
grupos de machos debido a la mayor cantidad de eosinófilos circulantes obtenida.



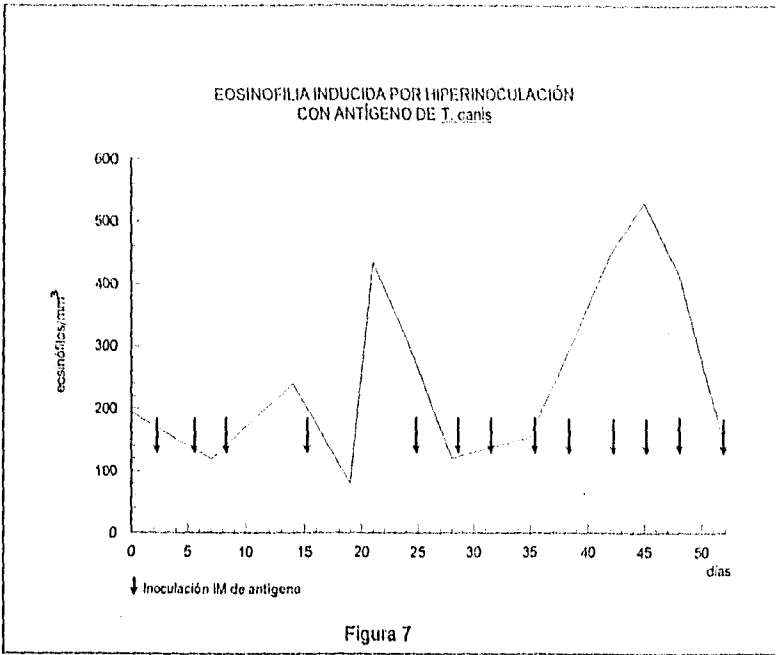
Se probó el posible efecto potenciador de dos diferentes adyuvantes (Titer-Max y Freund) inoculándolos junto con el antígeno parasitario. En la figura 6 se muestra este efecto. El adyuvante incompleto de Freund más antígeno, dió origen a un pobre incremento de eosinófilos circulantes  $226 \pm 65$  ( $\bar{X} \pm EE$ ) eosinófilos/mm<sup>3</sup> en el día 17, aunque todavía mayor que el grupo testigo ( $p < 0.02$ ). El adyuvante Titer-Max más antígeno y el antígeno solo sin adyuvante mostraron resultados similares, alcanzándose en el día 21 niveles máximos de



503 ± 94 y 434 ± 122 eosinófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente, los que difieren significativamente del grupo testigo (p<0.02 y p<0.03 respectivamente). Pero no difieren entre sí por lo que nos abstuvimos de usar adyuvante en lo sucesivo.



Debido a que la máxima eosinofilia se presentaba en forma un tanto súbita alrededor del día 21 y que no se sostenía por mucho tiempo se intentó un esquema de hiper-inoculación usando antígeno cada 3-4 días después de alcanzar el pico máximo de eosinófilos, con la finalidad de obtener una eosinofilia más pronunciada, más sostenida, o eventualmente otro pico en fecha posterior. La figura 7 representa el comportamiento de dicho esquema de inoculación: primero, aparece el pico característico en el día 21,  $434 \pm 122$  eosinófilos/mm<sup>3</sup> después de nuestro tratamiento convencional; segundo, se produce la caída habitual en el número de eosinófilos y la aparición de un segundo pico de eosinofilia  $530 \pm 113$  eosinófilos/mm<sup>3</sup> en el día 45 después de iniciado el experimento; esto es, 21 días después del inicio de la segunda ronda de inoculaciones. Este segundo incremento en la cantidad de eosinófilos fue mayor en número (aunque estadísticamente no significativo) y de mayor duración que el primer pico del día 21. Sin embargo, con este protocolo se comprometió el estado físico de los animales debido a la aparición, en el sitio de inoculación, de lesiones que variaban desde una inflamación localizada hasta necrosis hemorrágica con ulceración, por esta razón decidimos no trabajar con este esquema.



## ESTABLECIMIENTO DE UNA DOSIS MÍNIMA NECESARIA PARA CAUSAR AHA

Para desarrollar el AHA experimental en fase temprana procedimos a inocular intraportalmente a un grupo de cinco gerbos eosinófilicos [ $647 \pm 56$  eos/mm<sup>3</sup> ( $\bar{X} \pm EE$ )] con la dosis de referencia ( $2.5 \times 10^5$  trofozoitos) y sacrificar a los animales a las 6 hs post-inoculación.

El examen histológico de los hígados de estos gerbos reveló la presencia de múltiples microabscesos con amibas en todos los casos. Esta imagen resultó similar a la reportada en la literatura (SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992). Con el propósito de establecer una dosis mínima suficiente para producir lesiones y lo menos ventajosa en número con el objeto de favorecer al eosinófilo, se probaron en los gerbos inóculos intraportales de  $5 \times 10^4$ ,  $7.5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  amibas, los animales fueron sacrificados a las 6 y 24 hs post-inoculación, se les estudió el hígado histológicamente y se anotó la presencia de AHA.

TABLA I  
DOSIS MÍNIMA NECESARIA PARA CAUSAR AHA

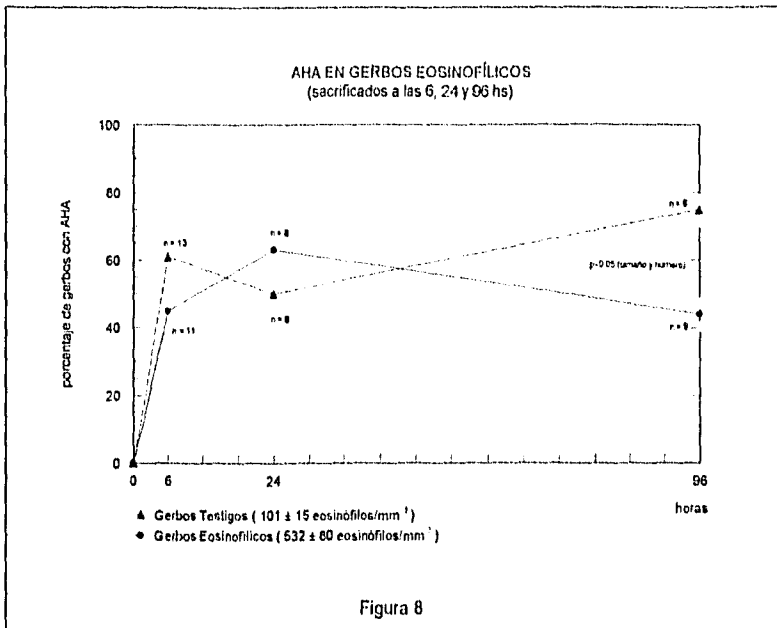
<i>Número de Trofozoitos</i>	<i>Porcentaje de AHA después de 6 hs</i>	<i>Porcentaje de AHA después de 24 hs</i>
1 x 10 <sup>5</sup> n = 4	75%	66%
7.5 x 10 <sup>4</sup> n = 3	33%	0%
5 x 10 <sup>4</sup> n = 3	0%	33%

Como puede observarse en la Tabla I las dosis de 5 x 10<sup>4</sup> y 7.5 x 10<sup>4</sup> resultaron poco eficientes (porcentajes de 0-33%) para producir AHA en etapas tempranas. El empleo de cualquiera de ellas hubiera implicado la utilización de grandes cantidades de animales con poca esperanza de éxito.

Por otro lado la dosis de 1 x 10<sup>5</sup> amibas en ambos períodos (6 y 24 hs) mostró un alto porcentaje de efectividad además de que el tipo y número de lesiones producidas eran perfectamente cuantificables y manipulables estadísticamente.

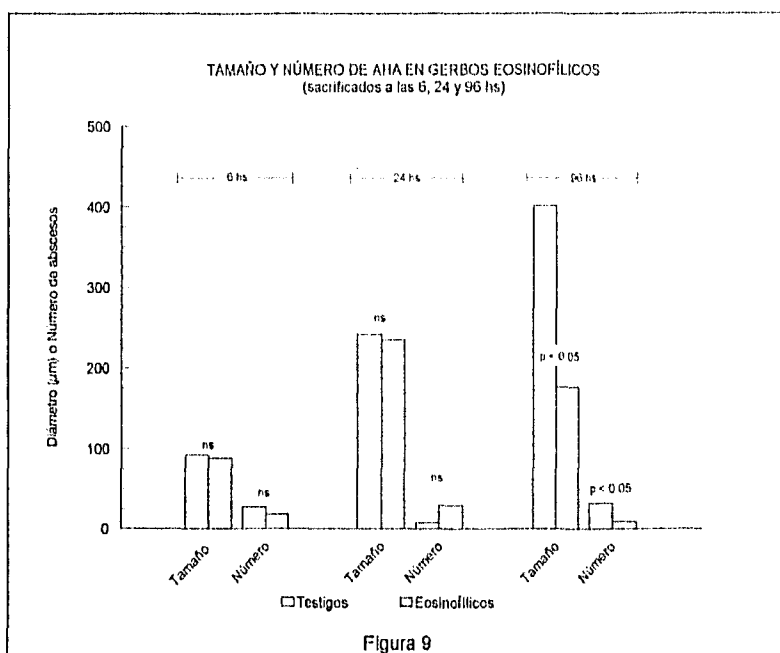
### AHA EXPERIMENTAL EN ETAPAS TEMPRANAS (6, 24 Y 96 hs)

Habiendo establecido la dosis mínima de trofozoitos que fue capaz de producir abscesos amibianos bien identificables, procedimos a inocular amibas intraportalmente a tres grupos de gerbos eosinófilos [11 (6 hs), 8 (24 hs) y 9 (96 hs) con  $600 \pm 97$ ;  $497 \pm 47$  y  $425 \pm 63$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$ , respectivamente] con un promedio total de  $532 \pm 80$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$  (Tabla II y fig 8) y tres grupos de gerbos testigos [13 (6 hs), 8 (24 hs) y 9 (96 hs) animales con  $90 \pm 12$ ,  $62 \pm 23$  y  $74 \pm 16$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$  respectivamente], con un promedio total de  $101 \pm 15$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$  (Tabla II y fig. 8). Ambos grupos diferían significativamente en sus cuentas de eosinófilos con una  $p < 0.001$  en cada caso.



Se inoculó a otros grupos de animales normales (4, 4 y 4) intraportalmente con SSF, con el fin de valorar el efecto de la manipulación quirúrgica.

Después de 6, 24 y 96 hs se procedió a sacrificar cada grupo de animales y obtener biopsias de hígado, las que se examinaron al microscopio por dos diferentes observadores y se determinó el número y diámetro de los microabscesos.



Sólo se consideraron aquellos microabscesos que midieron  $\geq 30 \mu$  de diámetro debido a que en los animales inoculados con SSF, se observaron ocasionalmente escasos cúmulos inespecíficos de polimorfonucleares con un diámetro promedio de  $25 \mu$ . A las 6 y 24 hs los gerbos eosinofílicos y los

testigos no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de AHA desarrollado (fig. 8), ni en el número y tamaño de los microabscesos contabilizados (fig. 8 y 9). Sin embargo, a las 96 hs, si bien el porcentaje de AHA de los animales eosinofílicos y los testigos (44% vs 78% respectivamente) muestran una tendencia divergente ésta no fue significativa; pero el número y tamaño de los microabscesos en los animales eosinofílicos sí resultó significativamente menor ( $p < 0.05$ ) al compararse con sus testigos (fig. 8 y 9).

Macroscópicamente, las lesiones en el hígado se hacen aparentes a partir de las 24 hs, siendo muy pequeñas, localizadas y generalmente unilobuladas. A las 96 hs estas lesiones eran grandes, multilobuladas, con una cápsula membranosa, blanco opalescente, firmes al corte y con material blanco amarillento de consistencia pastosa en su interior.

Microscópicamente, a las 6 hs los microabscesos estaban constituidos, generalmente, de una o dos amibas rodeadas por varias capas de polimorfonucleares con escasos eosinófilos, sin grado importante de destrucción tisular (foto 1). A las 24 hs la cantidad de polimorfonucleares aumentó y se hizo aparente la destrucción de tejido hepático (foto 2). Finalmente a las 96 hs los focos inflamatorios comenzaron a coalescer, se observaron polimorfonucleares y hepatocitos lisados, se hizo aparente el infiltrado mononuclear y aumentó el grado de necrosis (foto 3).



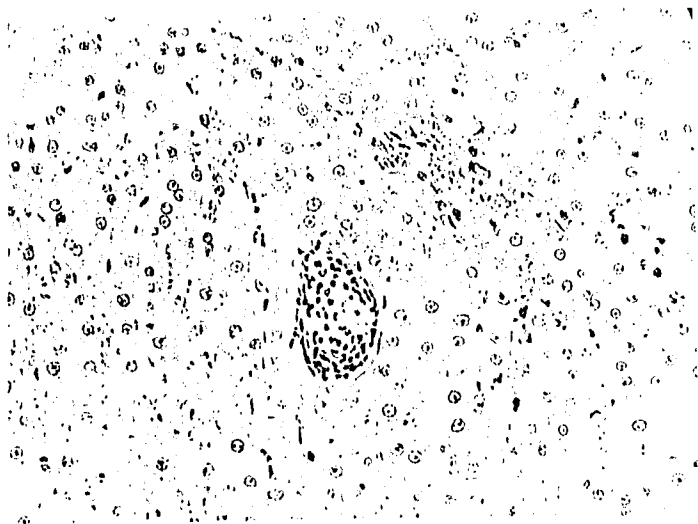


Foto 1 (40X)

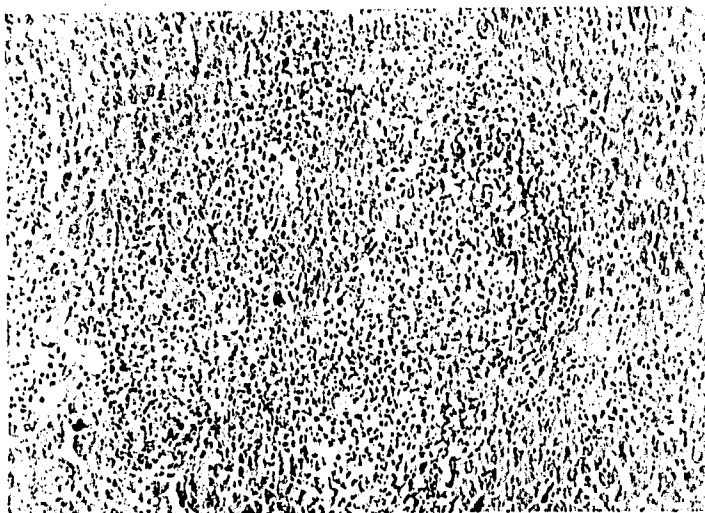


Foto 2 (25X)

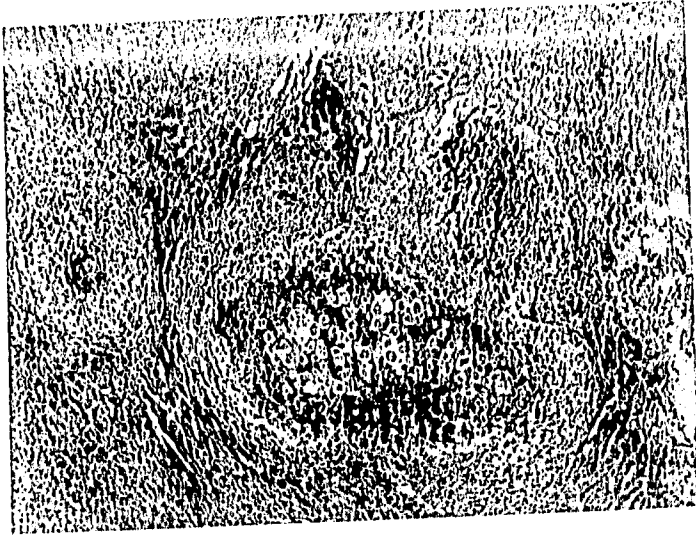
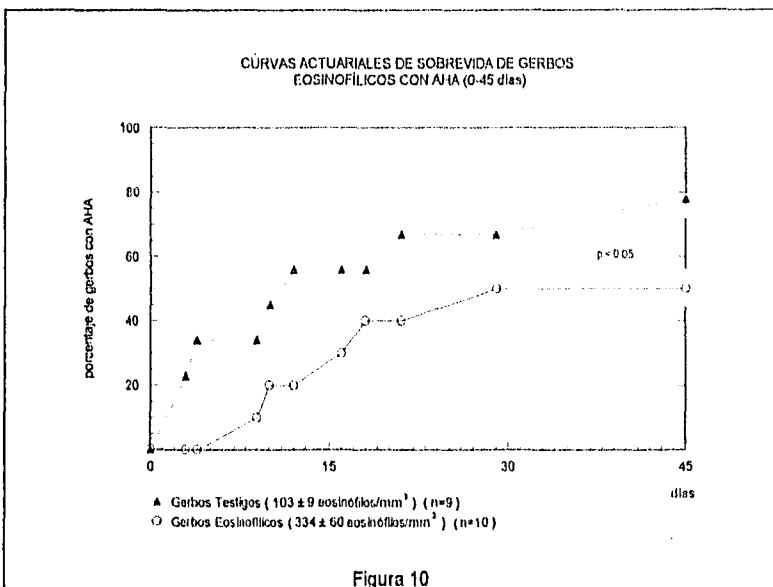


Foto 3 (25X)

**AHA EXPERIMENTAL EN ETAPAS TARDÍAS DE SOBREVIDA ACTUARIAL  
(HASTA 45 DÍAS)**

A un grupo de 10 gerbos eosinofílicos [ $334 \pm 60$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$ ] y otro de nueve gerbos testigos [ $103 \pm 9$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$ ,  $p < 0.001$ ] se les inoculó intraportalmente la dosis seleccionada de amibas. Ambos grupos se mantuvieron en observación, registrándose el número de días que sobrevivieron y obteniendo los hígados en el momento de la muerte de cada animal, así como de aquellos que vivieron 45 días post-inoculación.

Otro grupo de 4 animales (testigos sin AHA) se inoculó intraportalmente con SSF y se sacrificó en el día 45 post-inoculación.



En la figura 10 se observa la curva de supervivencia actuarial de los gerbos eosinofílicos y testigos, en donde se nota que el porcentaje acumulativo de gerbos eosinofílicos que murieron y/o desarrollaron AHA en los primeros 45 días post-inoculación fue de 50% contra un 78% de los gerbos testigos. Los animales eosinofílicos por lo tanto lograron vivir significativamente más ( $p < 0.05$ ) y desarrollaron menos AHA que sus contrapartes testigos. Las primeras muertes por AHA ocurrieron en el día 3 post-inoculación para los testigos y en el día 9 para los eosinofílicos. Tres de los gerbos eosinofílicos murieron antes de los 45 días resultando con AHA (macro y microscópico). Los otros siete sobrevivieron hasta el día 45, presentándose solo en dos de ellos 2 a 4 microabscesos (con diámetros de 51 a 243  $\mu$ ) en 10 campos.

Seis de los testigos murieron de AHA antes de los 45 días; sobrevivieron tres de nueve testigos, de los cuales uno no presentó ningún tipo de daño hepático, otro de ellos solo tuvo un microabsceso (51  $\mu$ ) sin amibas en 10 campos y el último desarrolló lesiones hepáticas macroscópicas purulentas de color blanquecino, que al microscopio se valoraron como granulomas de probable origen amibiano, con extensas zonas necróticas.

Macroscópicamente, en los gerbos que murieron antes de 45 días, el hígado perdió su forma y mostró múltiples lesiones confluentes y multilobuladas, con cápsula membranosa blanco opalescente, firmes al corte y con material blanquecino de consistencia pastosa en su interior.

Microscópicamente en estos mismos animales se observaron grandes áreas de material necrótico con amibas, fibroblastos y células epiteliales además de granulomas con depósitos de material amorfo en su centro (foto 4).

Los animales inoculados con SSF en ningún caso desarrollaron lesiones hepáticas macro o microscópicas.

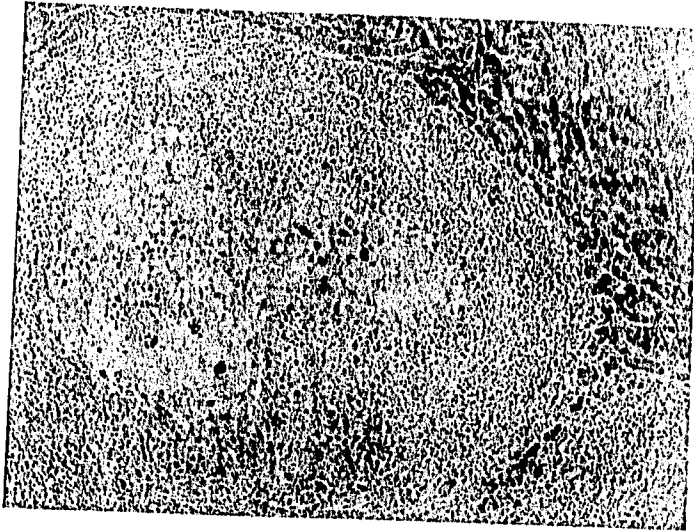


Foto 4 (10X)

## DETERMINACIÓN DE IL-5

La cantidad de IL-5 se midió en gerbos no manipulados y en animales inoculados con antígeno parasitario, o SSF en el día 21 (mayor eosinofilia) y a diferentes intervalos post-inoculación de amibas (6, 24, 96 hs y 45 días).

Tabla II  
EOSINÓFILOS E IL-5 EN GERBOS CON AHA

			Valor basal ( 0 hs )	6 hs	24 hs	96 hs	45 días
Testigos	Eos <sup>a</sup>	101 ± 15	-	-	59 ± 21	103 ± 42	
	IL-5 <sup>b</sup>	22 ± 1	46 ± 13	25 ± 0	35 ± 14	65 ± 6	
	n	38 (5) <sup>c</sup>	13	8	8	9(2) <sup>d</sup>	
Eosinófilicos	Eos	532 ± 60	-	-	64 ± 19	63 ± 32	
	IL-5 <sup>b</sup>	29 ± 4	51 ± 18	63 ± 30	35 ± 10	78 ± 19	
	n	39 (5) <sup>c</sup>	11	8	9	10(5) <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Eosinófilos/mm<sup>3</sup> (  $\bar{x}$  ± EE )

<sup>b</sup> IL-5, pg/ml (  $\bar{x}$  ± EE ) ( valor normal en gerbos no manipulados experimentalmente: 39 ± 7 pg/ml, n=10 )

<sup>c</sup> Valor entre paréntesis = determinación de IL-5

<sup>d</sup> Valor entre paréntesis = gerbos sacrificados a los 45 días

No se pudo demostrar una relación directa entre el número de eosinófilos y la cantidad de IL-5 medida, observándose niveles muy semejantes de IL-5 en el día de mayor eosinofilia entre los animales eosinófilicos y testigos [29 ± 4 vs 22 ± 1 pg/ml (  $\bar{X}$  ± EE ), Tabla II]. Este mismo comportamiento se mantuvo a las 6, 24, 96 hs y 45 días post-inoculación [46 ± 13, 25 ± 0, 35 ± 14 y 65 ± 6 vs 51 ±

18,  $63 \pm 30$ ,  $35 \pm 10$  y  $78 \pm 19$  pg/ml, respectivamente, (Tabla II)). Cabe mencionar que en los animales testigos los niveles de IL-5 resultaron significativamente mayores 45 días después de la inoculación intraportal de amibas que los registrados en el día 21 post-inoculación de antígeno parasitario (línea basal de la tabla II) [ $65 \pm 6$  vs  $22 \pm 1$  pg/ml, respectivamente,  $p < 0.03$ ].

La cantidad promedio de IL-5 obtenida en los gerbos no manipulados fue de  $39 \pm 7$  pg/ml, la cual no difiere significativamente de los animales inoculados con antígeno o SSF antes del reto amibiano. Este dato es de utilidad como valor de referencia en esta especie de roedores.

## DISCUSIÓN

Los estudios de confrontación *in vitro* de eosinófilos activados con amibas virulentas, demostraron la capacidad amebolítica de dichos eosinófilos (López-Osuna et al., 1992), ejercida de forma muy parecida a la de los monocitos activados (Salata et al., 1984; Salata et al., 1985). Anteriormente, se había intentado el estudio de dicho fenómeno *in vivo*, empleando (por motivos logísticos, i.e. disponibilidad económica) un modelo de ratas eosinofílicas a las que por inoculación con *E. histolytica* se les indujo lesiones testiculares (López-Osuna et al., 1990). Con dicha estrategia no se pudo demostrar un papel protector *in vivo* del eosinófilo quizás porque la rata es un animal resistente por naturaleza a la amibiasis, o porque los aspectos cuantitativos del experimento (i.e. eosinofilia discreta, lesiones testiculares muy vigorosas) no permitieron que se expresara un posible papel del eosinófilo.

Así, con el fin de estudiar el papel protector del eosinófilo en el AHA experimental establecimos un modelo de eosinofilia moderada en gerbos, animales actualmente utilizados en el estudio de la amibiasis cecal y/o hepática (CHADEE Y MEEROVITCH, 1985; CHADEE Y MEEROVITCH, 1985B; SHIBAYAMA-SALAS ET AL., 1992).

Para lograrlo, usamos antígenos derivados de *T. canis* (larva-cascarón y adulto), así como el de *A. lumbricoides* (gusano adulto), que produjeron eosinofilia en la sangre de los gerbos cuando se administraron por vía IM. El



máximo de eosinófilos circulantes se logró en diferentes tiempos, esto es; en el día 17 (post-inoculación) para el de *T. canis* larva-cascarón, 21 para el de *T. canis* adulto y 14 para el de *A. lumbricoides*. Evidentemente todos estos antígenos poseen agentes inductores de eosinofilia que actúan de forma similar, pero se manifiestan con mayor o menor grado de intensidad a diferentes tiempos. Sería interesante y motivo de otros estudios, el identificar y caracterizar a estos agentes inductores de la eosinofilia y dilucidar su mecanismo de acción. Una vez elegido el antígeno que produjo la mayor eosinofilia (*T. canis* adulto) observamos que el sexo de los animales jugaba un papel importante en la intensidad de la respuesta. Resultando los machos más susceptibles que las hembras para desarrollar una eosinofilia más intensa. Esto podría sugerir alguna participación de las hormonas sexuales en dicho proceso, que bien puede relacionarse con las observaciones de diferentes tipos y grados de activación de los linfocitos y/o macrófagos en presencia de cantidades variables de estrógenos o andrógenos (Ahmed, Penhale y Talal, 1985).

La administración del antígeno de los parásitos mezclado con adyuvantes no aumenta mayormente el número de eosinófilos circulantes que con el antígeno solo. La respuesta a la combinación antígeno parasitario y Titer-Max fue similar a la obtenida con el antígeno sin adyuvante (434 y 513 eosinófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente), mientras que la combinación antígeno con adyuvante incompleto de Freund causó un pequeño incremento de eosinófilos circulantes (226 eosinófilos/mm<sup>3</sup>) en el día 17, ligeramente superior al que presentó el

grupo testigo en ese momento ( $150$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$ ). Sin embargo, ninguno de estos resultados fue significativo, por lo que decidimos prescindir de adyuvante.

En nuestro esquema de hiperinoculación probamos el efecto de una exposición prolongada al antígeno del parásito aumentando la frecuencia de su administración. Observamos que, a pesar de la acumulación antigénica, la eosinofilia se presentó en ciclos de 21 días posteriores al reto antigénico inicial. Es probable que el antígeno posea elementos eosinopoyéticos que no actúan de igual forma (debido a su naturaleza y disponibilidad) que los antígenos producidos en una infección activa por *T. canis*, donde los gusanos viables excretan y/o secretan agentes inductores de eosinofilia que actúan continuamente sobre las células precursoras de la médula ósea durante el curso de la infección (YAMAGUCHI, 1990).

Debe notarse, que en todos los casos anteriormente mencionados, los animales testigos presentaron un ligero incremento de eosinófilos circulantes en el día 21. Esto coincide con el pico de máxima eosinofilia reportado para el antígeno de *T. canis* adulto, que podría representar una respuesta a la inyección IM, anestesia y sangrado de los animales en los días estipulados en el protocolo de inoculación.

En la literatura se reporta que la dosis de  $2.5 \times 10^5$  trofozoitos de *E. histolytica* es una medida estándar para producir AHA en cricetos y gerbos (Tsutsumi,

1988). Pero, esta cantidad no servía para nuestros fines, debido a que entre los animales eosinofílicos y testigos se produjeron lesiones en la misma proporción e intensidad. Pensamos que esto se debió a que el reto con una cantidad tan grande de amibas, le confiere demasiada ventaja al protozooario en su enfrentamiento "cuerpo a cuerpo" con el eosinófilo, entre otras células, además podemos especular que el número de trofozoitos que invaden experimentalmente al hígado en una infección natural (empleando la ruta intestino-sistema portal-hígado) es probablemente mucho menor.

Así, con el fin de propiciar *in vivo* una confrontación amiba-eosinófilo más equilibrada, decidimos probar el efecto de tres diferentes dosis de *E. histolytica* ( $1 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  trofozoitos) en los gerbos. Obtuvimos un buen porcentaje de animales con AHA inoculando  $1 \times 10^5$  amibas (75 y 66%) en etapas tempranas de la infección (6 y 24 hs). Si bien el empleo de esta dosis disminuía la certeza y severidad del AHA experimental, nos daba un margen aceptable para calificar y cuantificar las lesiones producidas por la amiba. Por otro lado, las inoculaciones con  $7.5 \times 10^4$  amibas sólo produjeron un 33% de AHA a las 6 hs mientras que  $5 \times 10^4$  amibas produjeron también un 33% de AHA, pero hasta las 24 hs. Este curioso hallazgo puede explicarse por la diferente susceptibilidad de cada animal, la cual se hace más evidente en grupos con pocos animales, como fue el caso. No hay que perder de vista que los resultados obtenidos empleando la misma dosis a diferentes tiempos, se observaron en diferentes grupos. De cualquier forma el establecimiento preciso

de la dosis de E. histolytica virulenta capaz de producir AHA en el 50% de animales genéticamente heterogéneos, a tiempos determinados, representaría todo un reto en sí mismo.

Los eosinófilos forman parte de los leucocitos polimorfonucleares, células que acuden tempranamente a los tejidos invadidos por la amiba en el establecimiento del AHA (CHADEE Y MEEROVITCH, 1984; TSUTSUMI, 1984), de ahí que no podemos descartar un posible papel protector de estas células en las primeras etapas del absceso.

Nuestros datos sugieren que la intervención del eosinófilo en el AHA experimental en el gerbo y en las condiciones empleadas, comienza a manifestarse entre las 24 y 96 hs del reto amibiano, resultando el tamaño y el número de microabscesos significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los animales eosinofílicos que en los testigos. En el modelo de seguimiento que va hasta los 45 días post-inoculación (curva actuarial de sobrevivencia) esta diferencia se manifiesta por una aparición más temprana del AHA (día 3 post-inoculación vs día 9 post-inoculación), un mayor desarrollo (72% vs 50%) y mayor letalidad del mismo en los animales testigos al compararlos con los animales eosinofílicos ( $p < 0.05$ ). Lo anterior parecería contradecir la idea de una acción del eosinófilo en etapas muy tempranas de la infección por E. histolytica, sin embargo, no se descarta que el efecto sea protagónico en las etapas tempranas pero el resultado neto de dicha participación siga siendo evidente en las etapas tardías.

Tanto en los animales testigos como en los eosinofílicos se encontraron pocos eosinófilos en el infiltrado inflamatorio alrededor de la *E. histolytica* en las etapas tempranas de la invasión al hígado, este sólo hecho no descarta del todo una posible participación de este leucocito, ya que como sabemos por los estudios *in vitro* éste también sucumbe en su confrontación con la amiba. Para eliminar cualquier duda de la participación del eosinófilo en el proceso sería relevante la determinación de las proteínas específicas del mismo (ECP, MBP, EPO, EDN/EPX) en los sitios de la aparición de los abscesos.

La inducción de eosinofilia empleando un antígeno de parásito, no descarta la participación de otro(s) elemento(s) (además del eosinófilo mismo) en la resistencia a la amiba, debido a que, algunas parasitosis activan preferentemente ciertas subpoblaciones de linfocitos T (Th1 vs Th2) con patrones de citocinas bien determinados y con efectos frecuentemente antagónicos (SCOTT ET AL., 1988; PEARCE ET AL., 1991; YAMAMURA ET AL., 1991). Un discernimiento más preciso del posible papel del eosinófilo en la amibiasis implicaría necesariamente el empleo de métodos más específicos en la inducción de eosinofilia. De igual forma la instigación del AHA experimental empleando un modelo eosinopénico proporcionaría importante evidencia adicional del posible efecto protector del eosinófilo en el AHA.

Es bien conocido el control que ejerce la IL-5 en el desarrollo de los progenitores de eosinófilos (LU ET AL., 1990; YAMAGUCHI ET AL., 1992), de ahí

nuestro interés en la determinación de dicha citocina en nuestros grupos experimentales y testigos. Basándonos en el hecho que la IL-5 está bastante conservada entre algunas especies (SANDERSON, 1993), logramos la detección de IL-5 del gerbo utilizando un equipo de ELISA que emplea anticuerpos monoclonales de rata anti-ratón. Esto nos habla de un cruce antigénico entre la IL-5 murina y la de gerbo, situación que aprovechamos para establecer un valor de referencia para la IL-5 de gerbo ( $39 \pm 7$  pg/ml) dato previamente inexistente en la literatura.

El pobre incremento de la IL-5 en las etapas de mayor eosinofilia (21 días post-inoculación del antígeno parasitario) podría implicar una discreta participación de dicha citocina en la eosinofilia, o una acción retardada de la misma, haciendo surgir el interés por su determinación en etapas anteriores a este evento. Por otro lado, el aumento moderado de la IL-5 en el día 45 post-inoculación con amiba en los gerbos normales, pero con AHA, y en los eosinofílicos con AHA, no es significativamente diferente de los valores normales basales del animal no manipulado ( $39 \pm 7$  pg/ml), ni lo es entre sí, de modo que habría que buscar otros parámetros que nos permitieran presumir su verdadero significado.

A más de 100 años de los experimentos de Fedor Alexandrovich Lösch (San Petersburgo, 1875) que establecieron que la *E. histolytica* era el agente etiológico de la amibiasis, todavía quedan por aclarar algunas cuestiones fundamentales de dicha enfermedad, como lo es el hecho de que sólo una

mínima fracción (aproximadamente 1 por cada 1000) de los sujetos infectados con *E. histolytica* desarrollan AHA. Así, preguntas fundamentales como: ¿dónde y qué o quiénes detienen la invasión tisular? continúan vigentes. A lo largo de este tiempo hemos aprendido que la manifestación del AHA, al igual que en muchas infecciones, es el resultado de una compleja red de interacciones entre los mecanismos de patogenicidad del parásito y los factores de resistencia del huésped, siendo quizá la respuesta inmune celular la principal responsable de la resistencia. Sabemos que *in vitro* los leucocitos polimorfonucleares, y los eosinófilos y macrófagos **no activados** sucumben en su enfrentamiento con la *E. histolytica*, mientras que los eosinófilos y macrófagos **activados** sí son capaces de destruir al parásito aunque también sucumban en el proceso. Si suponemos un comportamiento similar *in vivo*, resulta obvio que el arribo de los polimorfonucleares neutrófilos en la incipiente respuesta inflamatoria temprana, no sería efectiva para la erradicación de la amiba, como tampoco lo sería la participación de los macrófagos activados, dado su número relativamente escaso en esta fase de la infección. Así, se puede especular que el eosinófilo pudiera ser la célula abocada a jugar un papel protagónico en la defensa del huésped ante un ataque amibiano en esta crítica etapa del proceso, gracias a un arribo temprano y oportuno y a una indiscutible capacidad amebolítica en su condición de leucocito activado. Si la invasión portal por *E. histolytica* en humanos es un fenómeno frecuente, sería el eosinófilo activado el que haría abortar calladamente muchos abscesos hepáticos amibianos.

Si bien contamos con observaciones valiosas y datos muy precisos de la cinética del AHA, carecemos de un modelo ideal que permita estudiar con mayor detalle los procesos implicados en el establecimiento de la amiba en dicha enfermedad.

Nuestro trabajo proporciona un enfoque adicional en la mejor comprensión del AHA, proponiendo que el eosinófilo activado al igual que el macrófago activado, contribuyen a preservar la integridad del huésped en la invasión hepática amibiana.

Seguramente, las aportaciones de esta tesis generan más preguntas que respuestas; no obstante, creemos que sienta bases para posteriores estudios sobre el tema.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-García, J., Calderón, P. y Tanimoto, M. 1971. Examen histopatológico de las lesiones hepáticas en hámsters inoculados con cultivo axénico de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 3(S1), 341-346.
- Ahmed, S. A., Penhale, W. J. and Talal, N. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Am. J. Pathol. 121, 531
- Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V. and González-Robles, A. 1985. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34(4), 723-730.
- Archarya, D. P. and Sen, P. C. 1981. E rosetting cells in amoebic liver abscess. Indian J. Med. Res. 74, 348-351.
- Arellano, J., Granados, J., Frenk, P., López-Osuna, M., Santos, I. and Kretschmer, R. R. 1992. Increased frequency of HLA-DR3 in Mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). Arch. Med. Res. (Méx.) 23(2), 269-270.
- Artigas, J., Olto, I. y Kawada, M. E. 1966. Acción de Entamoeba histolytica sobre leucocitos polimorfonucleares humanos vivos. Bol. Chil. Parasitol. 21, 114-118.
- Austen, K. F. 1987. Homeostasis of effector systems which can also be recruited for immunologic reactions. J. Immunol. 12, 793-805.
- Avron, B., Duestsch, R. M. and Mirelman, D. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by Entamoeba trophozoites. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 815-821.
- Baker, J. R., Bassett, E. G., and de Souza, P. 1976. Eosinophils in healing dermal wounds. J. Anat. 121, 401a.
- Basset, E. G. 1962. Infiltration of eosinophils into the modified connective tissue of oestrous and pregnant animals. Nature 194, 1259-1261.
- Basten, A. and Beeson, P. B. 1970. Mechanism of eosinophilia. II Role of the lymphocyte. J. Exp. Med. 131, 1288-1305.

Bischoff, S. C., Brunner, T., De Weck, A. L. and Dahinden, C. A. 1990. Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonist. *J. Exp. Med.* 172, 1577-1582.

Braga, L. L., Ninomiya, H., McCoy, J. J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P. J. and Petri, W. A. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of Entamoeba histolytica. *J. Clin. Invest.* 90, 1131-1137.

Brumpt, E. 1925. Étude sommaire de l' "Entamoeba dispar" n.sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l' homme. *Bull. Acad. Med. (Paris)* 94, 943-952.

Burch, D. J., Li, E., Reed, S., Jackson, T. F. H. G. and Stanley Jr, S. L. 1991. Isolation of a strain-specific Entamoeba histolytica cDNA clone. *J. Clin. Microbiol.* 29, 696-701.

Butterworth, A. E. 1984. Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol.* 23, 143-235.

Butterworth, A. E. and Thorne, K. J. I. 1993. Eosinophils and Parasitic Diseases. En: *Immunopharmacology of Eosinophils*. Smith H. and Cook R.M, eds. Academic Press, San Diego, CA, pp. 120-150.

Clark, C. G. and Diamond, L. S. 1991. Ribosomal RNA genes of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 297-302.

Clutterbuck, E. J., Hirst, E. M. and Sanderson, C. J. 1989. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73, 1504-1512.

Cohen, J. 1995. A stubborn amoeba takes center stage. *Science* 267, 822-824.

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. T. and Strober, W. 1995. *Current Protocols in Immunology*. John Willey and Sons. pp 6.5.1.

Crowcroft, N. S. and Gillespie, S. H. 1991. Hatching of second-stage larvae of *Toxocara canis*: a rapid method for processing large numbers of worms. *J. Helminthol.* 65, 311-312.

Chadee, K. and Meerovitch, E. 1984a. The mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) as an experimental host for Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 47-54.

Chadee, K. and Meerovitch, E. 1984b. The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Am. J. Pathol. 117:71-80.

Chadee, K. and Meerovitch, E. 1985a. *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 34(2), 283-291.

Chadee, K. and Meerovitch, E. 1985b. The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Liver changes and amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 119(3), 485-494.

Chávez, A. y Segura, M. 1974. Interacción entre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 5 (S2), 373-392.

De León, A. 1970. Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 1 (S1), S205-S206.

Denat, L. A., Stath, M., Mellor, A. L., and Sanderson, C. J. 1990. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin-5. J. Exp. Med. 172, 1425-1431.

Diamond, L. S. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science. 134, 336-337.

Diamond, L. S. 1980. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: progress and problems. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (S1), 47-54.

Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 431-432.

Diamond, L. S., Phillips, B. P. and Bartgis, I. L. 1974. The clawed jird (*Meriones unguiculatus*) as an experimental animal for the study of hepatic amebiasis. Arch. Invest. Med. (Méx.) 5(S2), 465-470.

Dunn, A. M. 1983. Superfamilia Ascaridoidea. En: Helminthologia Veterinaria. Dunn.A.M. ed. El Manual Moderno, México. pp. 67-72

Fattah, D. I., Quint, D. J., Proudfoot, A., O'Malley, R., Zanders, E. D. and Champion, B. R. 1990. *In vitro* and *in vivo* studies with purified recombinant human interleukin 5. Cytokine 2, 112-121.

Fujisawa, T., Abu, G. R., Rita, H., Sanderson, C. J. and Gleich, G. J. 1990. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degradation. J. Immunol. 144, 642-646.

- Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., Gill, N. J. and Koshy, A. 1981. Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amoebic liver abscess. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 807-810.
- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. 1981a. Effect of splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metastatic foci in hamsters. *Infect. Immun.* 31, 571-573.
- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. 1981b. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasite Immunol.* 3, 329-338.
- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. 1982. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 4, 219-225.
- Ghadirian, E., Meerovitch, E. and Hartman, D. F. 1980. Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 777-784.
- Ghadirian, E., Meerovitch, E. and Kongshavn, P. A. L. 1983. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect. Immun.* 42, 1017-1019.
- Gleich, G. 1988. Current understanding of eosinophil function. *Hospital Practice.* pp, 137-160.
- Guerrant, R. L., Brush, J., Ravdin, J. I., Sullivan, J. A. and Mandell, G. L. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* 143, 83-93.
- Guerrero, M., Ríos, D. and Landa, L. 1976. Interaction between trophozoites of *E. histolytica* and lymphocytes of patients with invasive disease. In: *Proceedings of the International Conference on Amebiasis.* Sepúlveda, B. y Diamond, L. S. eds. IMSS, México, D. F., México. pp. 529-539.
- Harris, W. G. and Bray, R. S. 1976. Cellular sensitivity in amoebiasis: Preliminary results of lymphocyte transformation in response to specific antigen and to mitogen in carrier and disease states. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 340-343.
- Henderson, W. J. Jr., Chi, E. Y. and Klebanoff, S. J. 1980. Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J. Exp. Med.* 152, 265-279.
- Henderson, W. R. Jr. 1987. Lipid-derived and other chemical mediators of inflammation in the lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79, 543-553.

- Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Korenaga, M., Mita, S., Tominaga, A. and Takatsu, K. 1991. *In vivo* administration of antibody to murine IL-5 receptor inhibits eosinophilia of IL-5 transgenic mice. *Int. Immunol.* 3, 135-139.
- Jain, P., Sawhney, S. and Vinayak, V. K. 1980. Experimental amoebic infection in guinea pigs immunized with low grade amoebic infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 347-350.
- Jarumilinta, R. and Kradolfer, F. 1964. The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leukocytes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58, 375-381.
- Kelsall, B. L. and Ravdin, J. I. 1993. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 168, 1319-1322.
- Kretschmer, R. R. 1993. Immunology of amoebiasis and giardiasis. En: *Clinical aspects of Immunology*. Lachmann, P. F., Peters, K., Rosen, F. S. and Walport, W. J., eds. Blackwell Scient. Publ, Oxford. pp 1613-1625.
- Kretschmer, R. R. y López-Osuna, M. 1994. Mecanismos efectores e inmunidad antiamebiana. En: *Amibiasis. Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica**. Kretschmer, R. R. ed., Trillas, México, pp. 135-154.
- Lammas, D. A., Mitchell, L. A. and Wakelin, D. 1988. Genetic control of eosinophilia in parasitic infections: responses of mouse strains to treatment with cyclophosphamide and parasite antigen. *Int. J. Parasitol.* 18, 1077-1085.
- Lammas, D. A., Mitchell, L. A. and Wakelin, D. 1989. Genetic control of eosinophilia. Analysis of production and response to eosinophil differentiating factor in strains of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 137-143.
- Laufer, P., Chryssanthopoulos, C., Laufer, R. and Hausse, L. L. 1987. The determination of the eosinophil count: comparison of two techniques. *J. Allergy Clin. Immunol.* 79, 438-441.
- López, A. F., Eglinton, J. M., Lyons, A. B., Tapley, P. M., To, L. B., Park, L. S., Clark, S. C. and Vadas, M. A. 1990. Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J. Cell. Physiol.* 145, 69-77.
- López-Osuna, M. and Kretschmer, R. R. 1989. Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. *Parasite. Immunol.* 11, 403-411.
- López-Osuna, M., Arellano, J. and Kretschmer, R. 1992. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Parasite Immunol.* 14, 579-586.

- López-Osuna, M., Contreras, B. A. and Krestschmer, R. 1986. *In vitro* interaction of polymorphonuclear leucocytes and Entamoeba histolytica. Arch. Inves. Méd. (Méx.) 17(S1), 247-249.
- López-Osuna, M., Pérez-Tamayo, R., Frenk, P. y Krestschmer, R. 1990. El eosinófilo y la Entamoeba histolytica. II Lesiones testiculares amebianas producidas en ratas eosinofílicas. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 21(1), 263-265.
- Lu, L. Lin, Z., Sher, R., Warren, D. J., Leemhuis, T. and Broxmeyer, H. E. 1990. Influence of interleukin 3, 5, and 6 on the growth of eosinophil progenitors in highly enriched human bone marrow in the absence of serum. Exp. Hematol. 18, 1180-1186.
- Lynch, M.,J., Raphael, S.,S., Mellor, L. S., Spare, P. D. and Inwood, M. J. H. 1977. Obtención de muestras de sangre y citometría hemática. En: Métodos de Laboratorio. Nueva Editorial Interamericana, México. pp 712-713.
- Martínez, M. P., Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V and Martínez-Palomo, A. 1992. Histological changes during healing of experimental amebic liver abscess treated with metronidazole. Arch. Med. Res. (Méx.) 23(2), 209-212.
- Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitology Today 3(4), 111-118.
- Meerovitch, E. and Chadee, K. 1988. *In vivo* models for pathogenicity in amebiasis. En: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J. I, ed. John Willey & Sons, New York. pp. 177-190.
- Metcalf, J. A., Gallin, J. I., Naussef, W. N. and Root, R. K. 1986. Laboratory manual of neutrophil function. Raven Press. New York. pp 178-179.
- Miller, M. J. 1952. The experimental infection of Macaca mulata with human strains of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1, 417
- Mitchell, G. F. 1979. Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. Adv. Immunol. 28, 451-511.
- O'Donnell, M. C., Ackerman, S. J., Gleich, G. J. and Thomas, L. L. 1983. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. J. Exp. Med. 157, 1981-1991.
- Ortiz, L. 1994. Parasitic infections and the immune system. En: Amebiasis. Kierszenbaum, F. ed. Ac. Press, San Diego, CA. pp. 145-162

- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., and Capin, N. R. 1975. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 127-134.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J., Lewis, F. A. and Sher, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.
- Pérez-Tamayo, R. 1986. Pathology of amebiasis. En: *Amebiasis*. Martínez-Palomo, ed. Elsevier, Amsterdam. pp 45-94.
- Petri, W. A., Jackson, T. F. H. G., Gathiram, V., Kress, K., Saffer, L. D., Snodgrass, T. L., Chapman, M. D., Keren, Z. and Mirelman, D. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose specific adherence lectin. *Infect. Immun.* 58, 1802-1806.
- Ravdin, J. I. 1995. State of the art clinical article. *Clin. Infect. Dis.* 20,1453-1466.
- Ravdin, J. I., Jackson, T. F. H. G., Petri, W. A Jr., Murphy, C. F. M., Unger, B. L. P., Gathiram, V., Skilogiannis, J. and Simjee, A. E. 1990. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 162, 768-772.
- Reed, S. L., Sargeant, P. G. and Braude, A. I. 1983. Resistance to lysis by immune serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 248-253.
- Reinertson, J. W. and Thompson, P. E. 1951. Experimental amebic hepatitis in hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 518.
- Salata, R. A., Cox, J. and Ravdin, J. I. 1985. Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J. Clin. Invest.* 76, 491-499.
- Salata, R. A., Cox, J. and Ravdin, J. I. 1987. The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: Killing of virulent amebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunol.* 9, 249-261.
- Salata, R. A., Martínez-Palomo, A., Murray, H. W., Conales, L., Treviño, N., Segovia, E., Murphy, C. F. and Ravdin, J. I. 1986. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 136(7), 2633-2639.

Salata, R. A., Murray, H. W., Rubin, B. Y., Ravdin, J. I. 1987. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages and T lymphocytes cytotoxic for *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37, 72-78.

Salata, R. A. and Ravdin, J. I. 1986. Reviews of the human immune mechanism directed against *Entamoeba histolytica*. Reviews of Infectious Diseases. 8(2), 261-272.

Sanderson, C. J. 1993. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. En: Immunopharmacology of eosinophils. Smith H. and Cook R.M, eds. Academic Press, San Diego, CA pp. 11-24.

Sanderson, C. J., Campbell, H. D. and Young, I. G. 1988. Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin-5) and its effects on human and mouse B cells. Immunological Reviews. 102, 29-50.

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E. and Sher, A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belongs to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J. Exp. Med. 168, 1675-1684.

Schriber, R. A. and Zucker-Franklin, D. 1974. A method for the induction of blood eosinophilia with simple protein antigens. Cell. Immunol. 14, 470-474.

Schwarz, E. 1914. Die Lehre von der allgemeinen und ortlichen "Eosinophile". Ergeb. Allge. Pathol. Anat. 17, 137-789.

Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis host-pathogen biology. Rev. Infect. Dis. 4, 836-842.

Sepúlveda, B. and Martínez-Palomo, A. 1984. Amebiasis. En: Tropical and geographical medicine. Warren, K. S. and Mahmoud, A. A. S., eds. McGraw-Hill, New York. pp 305-318.

Sepúlveda, B., Jinich, H., Bassols, F. y Muñoz, R. K. 1954. La amibiasis del hígado. Su diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Rev. Invest. Clin. 6, 165-187.

Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V. and Martínez-Palomo, A. 1992. Early invasive intestinal amebiasis in Mongolian gerbils. Arch. Med. Res. (Méx.) 23(2), 187-190.

Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V., Campos-Rodríguez, R. and Martínez-Palomo, A. 1992. Morphologic characterization of experimental amebic liver lesions in gerbils. Arch. Med. Res. (Méx.) 23, 203-207.



Smith, H. V. 1989. A rapid method for hatching infective eggs of Toxocara canis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 215.

Sonoda, Y., Arai, N. and Ogawa, M. 1989. Humoral regulation of eosinopoiesis in vitro: Analysis of the targets of interleukin-3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and interleukin-5. Leukemia 3, 14-18.

Speirs, R. S. 1958. Advances in the knowledge of the eosinophil in relation to antibody formation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 73, 283-292.

Spry, C. J. F. 1993. The natural history of eosinophils. En: Immunopharmacology of eosinophils. Smith, H. and Cook, R. M, eds. Academic Press. San Diego, CA. pp 1-7.

Sugame, K. and Oshima, T. 1985. Induction of a marked eosinophilia by cyclophosphamide in Toxocara canis infected SJL mice. Parasite Immunol. 7, 255-263.

Sugame, K. 1988. Eosinophilia in Ascaris suum-reinfected mice. J. Helminthol. 62: 51-57.

Tanimoto, M., Sepúlveda, B., Vázquez-Saavedra, J. A. y Landa, L. 1971. Lesiones producidas en el hígado del hámster por inoculación de Entamoeba histolytica cultivada en medio axénico. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2(S1), 275-284.

Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J. and Arnold, H. H. 1989. Genomic DNA difference between pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. Prod. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 5118-5122.

Tominaga, A., Matsumoto, M., Harada, N., Takahashi, Y., Kikuchi, Y. and Takatsu, K. 1980. Molecular properties and regulation of mRNA expression for murine T cell-replacing factor / IL-5. J. Immunol. 140, 1175.

Tony, J. C. and Martin, T. K. 1992. Profile of amebic liver abscess. Arch. Med. Res. 23(2), 249-250.

Treviño-García Manzo, N., De la Torre, M., Ruiz de Chávez, I., Hernández-López, H. y Escobedo, A. 1970. Morfología de Entamoeba histolytica en el absceso hepático del hamster. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1(S1), 61-80.

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

Tsutsumi, V. 1988. Pathology of experimental amebiasis. En: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J. I, ed. John Willey & Sons. New York. pp. 147-165.

- Tsutsumi, V. and Martínez-Palomo, A. 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 130, 112.
- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F. and Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117(1), 81-91.
- Vadas, M. A. 1981. Cyclophosphamide pretreatment induces eosinophilia to non parasite antigen. *J. Immunol.* 127, 2083-2086.
- Vadas, M. A. 1982. Genetic control of eosinophilia in mice: gene(s) expressed in bone marrow-derived cells control high responsiveness. *J. Immunol.* 128, 691-695.
- Velázquez, J. R., Llaguno, P., Fernández-Díez, J., Rosas, S., Arellano, J., López-Osuna, M. and Kretschmer, R. 1994. An experimental model of eosinophilia. *Arch. Med. Res. (Méx.)* 25(1), 54.
- Villanueva, E. J. and Kozek, W. W. 1992. A method for the recovery of infective larvae from *Toxocara canis* eggs for collection of larval secretory/excretory products. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 653, 211-216.
- Wakelin, D. and Donachie, A. M. 1983. Genetic control of eosinophilia. Mouse strain variation in response to antigens of parasite origin. *Clin. Exp. Immunol.* 51, 239-246.
- Walsh, J. A. 1986. Amebiasis in the world. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 17(S1), 385-389.
- Walls, R. S. and Beeson, P. B. 1972. Mechanism of eosinophilia. IX. Induction of eosinophilia in rats by certain forms of dextran (36532). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 689-693.
- Wang, J. M., Rambaldi, A., Biondi, A., Chen, Z. G., Sanderson, C. J. and Mantovani, A. 1989. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur. J. Immunol.* 19, 701-705.
- Watanabe, N., Katakura, K., Kobayashi, A., Okumura, K. and Ovary, Z. 1988. Protective immunity and eosinophilia in IgE-deficient SJA/9 mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis* and *Trichinella spiralis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 4460-4462.
- Weller, P. F. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N. Eng. J. Med.* 324(16), 1110-1117.

World Health Organization. 1969. Amoebiasis. Geneva report of a W.H.O. Expert Committee. W.H.O. Tech. Rep. Ser., No. 421

Yamaguchi, Y., Matsui, T., Kasahara, T., Etoh, S., Tominaga, A., Takatsu, K., Miura, Y. and Suda, T. 1990. *In vivo* changes of hemopoietic progenitors and the expression of the interleukin 5 gene in eosinophilic mice infected with *Toxocara canis*. Exp. Hematol. 18, 1152-1157.

Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A. and Takatsu, K. 1988. Purified interleukin 5 support the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. J. Exp. Med. 167, 43-56.

Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R. and Modlin, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profile in leprosy lesions. 1991. Science. 254, 277-281.

Zheuthin, I. M., Ackerman, S. J., Gleich, G. J. and Thomas, L. L. 1984. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. J. Immunol. 133, 2180-2185.