



ESTUDIO DE INMUNIDAD INDUCIDA POR VIA ORAL CONTRA
EXTRACTOS DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA CEPA HK-9
EN RATONES BALB/C

POR
EVA TAMEZ TREVIÑO

TESIS PRESENTADA A LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

MONTERREY, N. L. 1995

TM
Z6658
FM
1995
T3



1020091280

**ESTUDIO DE INMUNIDAD INDUCIDA POR VIA ORAL CONTRA EXTRACTOS
DE *Entamoeba histolytica* CEPA HK-9 EN RATONES BALB/c.**

**Aceptada por la Subdirección de Investigación y Estudios de
Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma
de Nuevo León el _____**

Aprobación del Comité de Tesis



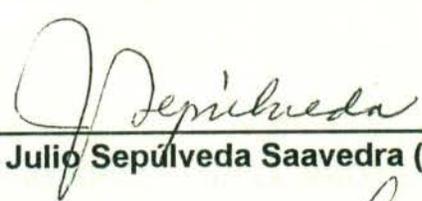
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



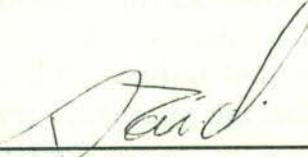
Dra. Ma. del Socorro Flores de C. (Asesor)



Dr. Mario César Salinas Carmona



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra (Co-Asesor)



Dr. Salvador Saíd Fernández

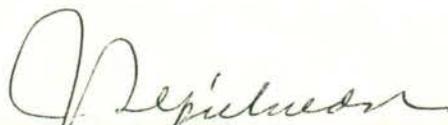
Esta tesis se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

ASESOR



Dra. María del Socorro Flores de Castañeda
Depto. de Inmunología. Facultad de Medicina .
Universidad Autónoma de Nuevo León.

CO-ASESOR



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Departamento de Histología Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León.

INSTITUCIONES QUE AUSPICIARON EL PROYECTO:

Centro Internacional de Biología Molecular y Celular (CIBMYC),
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y
Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste del Instituto
Mexicano Seguro Social (IMSS).

Dedico esta tesis:

A Dios, por mi ser.

A mis padres, Félix y Caty , personas que admiro enormemente y a quienes debo en gran parte lo que soy. Por su apoyo, ejemplo y cariño. Los Amo.

A mis hermanos Francisco, Héctor, Félix y Víctor y a mi primo José Félix por su cariño, apoyo y confianza y quienes han compartido mis sueños desde siempre.

A mis abuelas Bertha y Eva, mujeres admirables.

A mi pequeño Unay.

A mi "pequeña familia ". Con Cariño.

A todos mis amigos, que de una manera u otra siempre estuvieron presentes.

AGRADECIMIENTOS:

Doy las gracias a todos mis familiares y a mis amigos de quienes recibí apoyo en forma afectiva, moral, intelectual y económica y que de alguna manera contribuyeron a la realización de mi tesis pues todos con su granito de arena lo hicieron posible.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda , Asesor de esta tesis, ya que gracias a su guía, sus consejos y su apoyo logré finalizar esta etapa tan importante en mi vida.

Con todo respeto agradezco al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, Co-Asesor de mi tesis , por lo que aprendí a su lado, por su colaboración y por el apoyo que me brindó para realizar este trabajo.

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Salvador Saíd Fernández quien con su colaboración y sus sugerencias participó en la realización de esta tesis.

Con todo mi cariño y respeto agradezco a la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, al Dr. Mario César Salinas Carmona y al Dr. Carlos E. Medina de la Garza, maestros del departamento de Inmunología por sus enseñanzas , su apoyo y colaboración durante todo este tiempo y a quienes debo gran parte de mi formación profesional.

Muchas gracias a mis compañeros del Departamento de Inmunología que me brindaron siempre su apoyo y amistad en todo momento y que compartieron conmigo circunstancias importantes de mi vida.

Agradezco al personal del Departamento de Histología en especial a la Q.C.B. Raquel Ballesteros, al Dr. Juan Manuel Solís y a la Dra. Guadalupe Moreno por su valiosa ayuda .

Muchas gracias al personal de la Sub-dirección de Post-grado por su amable disposición

Quiero agradecer al Dr. Juan Antonio Luna por la elaboración del trabajo fotográfico que se incluye en esta tesis.

Agradezco al Dr. Francisco Bosques por su asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

Así también doy las gracias al personal y compañeros del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología especialmente al Dr. Rolando Tijerina Menchaca por el apoyo recibido.

Agradezco a las siguientes instituciones por las becas que me otorgaron: CONACYT, Centro Internacional de Biología Molecular y Celular (CIBMYC) y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Agradezco con todo cariño a mi amiga Socorro de quien aprendí tantas cosas no solo en el aspecto intelectual sino de mi desarrollo como ser humano. Gracias.

Le doy las gracias a mi amigo Carlos simplemente por ser él.

INDICE

| | | |
|------|---|----|
| I. | RESUMEN..... | 1 |
| II | INTRODUCCION. | |
| | Antecedentes..... | 7 |
| | Hipótesis..... | 17 |
| | Objetivos..... | 18 |
| III. | MATERIAL Y METODOS. | |
| | 1.Animales..... | 20 |
| | 2.Determinación de la velocidad de tránsito intestinal..... | 20 |
| | 3. Trofozoítos de <u>Entamoeba histolytica</u> cepa HK-9..... | 21 |
| | 4. Preparación del antígeno para inmunizar..... | 21 |
| | 5. Extracto total amibiano..... | 22 |
| | 6. Determinación de células formadoras de anticuerpos (CFA) por la técnica de Jerne modificada por Cunningham..... | 23 |
| | 6.1 Inmunizaciones para los ensayos de células formadoras de anticuerpos..... | 24 |
| | 6.2 Obtención de las células de placas de Peyer y técnica de Jerne modificada por Cunningham..... | 24 |
| | 6.3 Obtención de las células de bazo..... | 28 |
| | 6.4 Sensibilización de eritrocitos de carnero con antígeno amibiano..... | 30 |
| | 6.5 Ensayos de hemaglutinación para demostrar la unión del antígeno amibiano a la membrana del eritrocito..... | 31 |
| | 6.6 Ensayos de hemólisis para determinar la | |

| | |
|---|----|
| estabilidad de la membrana del eritrocito posterior a la sensibilización con antígeno de <u>E. histolytica</u> | 32 |
| 6.7 Determinación de viabilidad celular..... | 32 |
| 6.8 Obtención del complemento..... | 33 |
| 7. Inducción de la respuesta inmune con antígenos de <u>Entamoeba histolytica</u> administrados por vía oral a ratones BALB/c..... | 34 |
| 7.1 Determinación de la presencia de anticuerpos dirigidos contra <u>Entamoeba histolytica</u> por medio de la técnica de Inmuno-dot, en sueros de ratones inmunizados con antígenos amibianos..... | 34 |
| 7.1.1 Inmunizaciones..... | 34 |
| 7.1.2 Técnica de Inmuno-dot..... | 34 |
| 7.2 Detección de la presencia de anticuerpos contra <u>E. histolytica</u> mediante la técnica de ELISA, en sueros de ratones inmunizados con antígenos amibianos..... | 37 |
| 7.2.1 Inmunizaciones y sangrados..... | 37 |
| 7.2.2 Técnica de ELISA..... | 37 |
| 7.2.3 Análisis estadístico de los resultados..... | 40 |
| 7.2.4 Determinación de células formadoras de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero en ratones BALB/c..... | 41 |
| 7.2.4.1 Inmunizaciones..... | 41 |

IV. RESULTADOS.

| | |
|---|----|
| 1. Determinación de la velocidad intestinal en ratones BALB/c utilizando un colorante comestible vegetal..... | 42 |
| 2. Búsqueda de células formadoras de anticuerpos en placas | |

| | |
|--|----|
| de Peyer de ratones inmunizados por vía oral con antígenos de <u>Entamoeba histolytica</u> cepa HK-9..... | 44 |
| 2.1 Ensayos de hemaglutinación para demostrar la unión del antígeno al eritrocito posterior a su sensibilización con antígeno de amiba..... | 45 |
| 2.2 Ensayos de hemólisis para determinar la estabilidad de la membrana de los eritrocitos posterior a la sensibilización con antígeno de amiba..... | 45 |
| 2.3 Determinación de la viabilidad celular en diferentes soluciones..... | 47 |
| 2.4 Detección de células formadoras de anticuerpos en placas de Peyer y en bazo de ratones inmunizados por vía oral con extracto crudo de <u>E. histolytica</u> | 50 |
| 2.5 Detección de células formadoras de anticuerpos en bazo de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con antígenos de <u>E. histolytica</u> | 51 |
| 3. Determinación de anticuerpos totales y de isotipos en sueros de ratones inmunizados con antígenos amibianos, utilizando la técnica de Inmuno-dot..... | 52 |
| 3.1 Determinación de anticuerpos totales y de isotipos en sueros de ratones inmunizados con antígenos amibianos por vía oral, utilizando la técnica de Inmuno-dot..... | 52 |
| 3.2 Determinación de la respuesta de isotipos de los anticuerpos producidos en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con antígenos amibianos, utilizando la técnica del Inmuno-dot..... | 53 |
| 3.3 Detección de anticuerpos anti-amiba en ratones | |

| | |
|--|----|
| inmunizados por vía oral con extractos de <i>Entamoeba histolytica</i> , utilizando un ELISA..... | 54 |
| 3.4 Búsqueda de células formadoras de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero inmunizados previamente, por vía oral con <i>E. histolytica</i> | 63 |
| V. DISCUSION. | |
| Discusión..... | 65 |
| Conclusiones..... | 73 |
| VI. BIBLIOGRAFIA..... | 76 |

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de células formadoras de anticuerpos..... | 29 |
| 2. Velocidad de tránsito gastrointestinal en ratones BALB/c..... | 44 |
| 3. Ensayos de hemaglutinación para confirmar la unión del extracto de <i>E. histolytica</i> a los glóbulos rojos..... | 45 |
| 4. Ensayos de hemólisis para probar la estabilidad de la membrana de los eritrocitos sensibilizados con <i>E. histolytica</i> | 49 |
| 5. Determinación de viabilidad celular..... | 50 |
| 6. Búsqueda de CFA en bazo y placas de Peyer en ratones inmunizados por vía oral con <i>E. histolytica</i> | 51 |
| 7. Búsqueda de CFA en bazo de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con <i>Entamoeba histolytica</i> | 52 |
| 8. Búsqueda de CFA contra glóbulos rojos de carnero en bazo de ratones previamente inmunizados con <i>E. histolytica</i> por vía oral..... | 53 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Tránsito intestinal del colorante administrado por vía oral a diferentes tiempos..... | 43 |
| 2. Resultados de ensayos de hemaglutinación..... | 47 |
| 3. Resultados de Inmuno-dot en ratones inmunizados por vía oral con antígenos de <u>E. histolytica</u> | 53 |
| 4. Resultados de Inmuno-dot en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con antígenos de <u>E. histolytica</u> | 54 |
| 5. Isotipos de anticuerpos dirigidos contra <u>E. histolytica</u> en ratones inmunizados por vía oral detectados por ELISA..... | 56 |
| 6. Isotipos de anticuerpos dirigidos contra <u>E. histolytica</u> en ratones inmunizados por vía intraperitoneal detectados por ELISA..... | 58 |
| 7. Comparación de respuesta de isotipos de anticuerpos dirigidos contra <u>E. histolytica</u> en ratones inmunizados por vía oral e intraperitoneal detectados por ELISA..... | 60 |
| 8. Comparación de respuesta de isotipos de anticuerpos dirigidos contra <u>E. histolytica</u> en ratones inmunizados por vía oral e intraperitoneal detectados por ELISA..... | 62 |

I. RESUMEN

En este trabajo se logró inducir la producción sistémica de anticuerpos dirigidos contra extractos de trofozoítos de Entamoeba histolytica inmunizando ratones por vía oral.

En estudios realizados con animales inmunizados por la vía oral se ha demostrado que los antígenos pueden inducir una respuesta de tolerancia o supresión o bien pueden estimular la respuesta inmune tanto a nivel celular como de producción de anticuerpos. Los seres humanos asintomáticos que residen en zonas endémicas de la amibiasis presentan anticuerpos en circulación dirigidos contra E. histolytica. Estos anticuerpos aparentemente no son protectores, pues algunos individuos de zonas endémicas pueden presentar amibiasis invasiva.

El propósito de este trabajo fue despertar una respuesta inmune contra antígenos de E. histolytica en animales inmunizados por vía oral, también se quería saber si era posible encontrar estos anticuerpos en circulación y conocer que isotipos de inmunoglobulinas a nivel sistémico se producían en respuesta a este antígeno presentado en el tracto gastrointestinal. Para ello se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c, en repetidas ocasiones con antígenos de E. histolytica por vía oral y por vía intraperitoneal como control.

Primero se buscó la presencia de células formadoras de anticuerpos (CFA) por la técnica de Jerne modificada por Cunningham, en placas de Peyer y bazo de los ratones inmunizados por vía oral y en el bazo de los ratones inmunizados por vía intraperitoneal. En los animales inmunizados por vía intraperitoneal se detectaron células formadoras de anticuerpos IgM, IgG e IgA en bazo. En los animales que fueron inmunizados por vía oral no se detectaron CFA anti-amiba en placas de Peyer ni en bazo.

Un dato relevante encontrado en el presente trabajo fue que, en ratones inmunizados en múltiples ocasiones por vía oral con antígenos amibianos y a los que posteriormente se les inmunizó con una sola dosis por vía intraperitoneal con glóbulos rojos de carnero, se determinó la presencia de CFA contra glóbulos rojos de carnero en el bazo, sin embargo es importante destacar que la respuesta fue en ascenso conforme era mayor el número de inmunizaciones por vía oral con los antígenos amibianos. Ya que existen antígenos que son capaces de inducir una activación policlonal, estos resultados sugieren que se trata de una activación policlonal inducida con los antígenos amibianos administrados por vía oral, incluyendo células productoras de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en los glóbulos rojos de carnero o también que se estén generando anticuerpos contra polisacáridos que dan reacción cruzada con glóbulos rojos de carnero.

Al no encontrar CFA anti-amiba en las placas de Peyer ni en el bazo de los ratones inmunizados se determinó la respuesta sistémica de anticuerpos dirigidos contra *E. histolytica* de manera cualitativa utilizando la técnica de Inmuno-dot y de manera cuantitativa por ELISA. En los animales inmunizados por vía intraperitoneal la respuesta obtenida es principalmente del isotipo IgM, aumentando después de la primera inmunización, seguida en intensidad por IgG la que también presenta una tendencia a aumentar conforme se aumenta el número de inmunizaciones, siendo estadísticamente significativo al analizarlo mediante una prueba de comparación múltiple con prueba de t con corrección de Bonferroni. No se encontró un aumento en la respuesta de IgA.

En aquellos ratones que fueron inmunizados por vía oral, se encontró que la respuesta es predominantemente del isotipo IgM seguida en intensidad por una respuesta de IgG, siendo el incremento de estos dos isotipos significativamente distinto con respecto a los valores basales encontrados. Aunque la respuesta de IgA fue menor y sin significancia estadística, se observó que en las curvas de concentración de anticuerpos de todos los isotipos, existe una tendencia a aumentar sobre todo después de ocho inmunizaciones, siendo esto más evidente para el isotipo IgM. Probablemente no se obtuvieron niveles altos de IgA dirigidos contra las amibas, por que estaban siendo desviadas hacia secreciones y hacia la luz intestinal, donde se encontraba el antígeno amibiano que era administrado a los ratones cada cuatro días por vía oral.

En base a los resultados que se obtuvieron en este trabajo se demostró que se logró inducir una respuesta sistémica al inmunizar ratones por vía oral con extractos de *E. histolytica* manifestada por la presencia de anticuerpos anti-amiba en circulación comparable a lo observado en el suero de las personas sin amibiasis invasiva y que habitan en zonas endémicas de esta parasitosis.

II. INTRODUCCION

La amibiasis se define como la infección con o sin síntomas clínicos, ocasionada por el protozooario parásito Entamoeba histolytica (1 - 2).

Esta enfermedad se presenta principalmente en poblaciones cuyas condiciones higienico-dietéticas son deficientes. La amibiasis es una enfermedad que se presenta con mayor frecuencia en países tropicales y subtropicales, sin embargo, también se encuentra en regiones de clima frío (3 - 7).

El ciclo de vida del parásito se inicia con la ingesta de agua y alimentos contaminados con quistes, que son las formas infectantes. Posteriormente , se inicia el proceso de desenquistamiento en el colon, liberándose una amiba tetranucleada, la cual forma entonces cuatro amébulas que dan lugar a ocho amébulas. Estas crecen, se dividen por fisión binaria y continúan multiplicándose. Se ha propuesto que cuando las condiciones del medio no son propicias se inicia el proceso de enquistamiento. Entonces el trofozoíto se convierte en prequiste, el que al madurar dar lugar al quiste. Los quistes son eliminados con las heces fecales, completándose de esta manera el ciclo de vida de E. histolytica (8 - 11).

Observaciones clínicas y estudios histopatológicos indican que la patogenicidad depende de factores tanto del hospedero como del parásito. La edad y el sexo son factores del hospedero que influyen fuertemente en la patogénesis de la amibiasis, ya que se ha observado que las formas fulminantes

de la enfermedad son más frecuentes en niños que en adultos y el absceso hepático amibiano es más frecuente en hombres que en mujeres , en una proporción 3:1. Las condiciones de higiene y el estado nutricional del hospedero son otros de los factores que influyen en la susceptibilidad , ya que se ha asociado un alto índice de desnutrición con amibiasis intestinal y con absceso hepático (12 - 14). Otro factor son los cambios hormonales, como los que ocurren en el embarazo (4 , 15). También el estrés y el estado inmunológico del sujeto. El pH , el potencial de óxido-reducción y la flora bacteriana presente en colon se han propuesto como factores que favorecen la expresión de la patogenicidad amibiana (8, 15 - 19). Algunos autores sugieren la asociación de marcadores del sistema HLA con la susceptibilidad de desarrollar absceso hepático amibiano (20 -21).

Dentro de los factores que confieren patogenicidad al parásito se encuentran: a) enterotoxinas, b) enzimas proteolíticas, c) proteínas formadoras de canales y sustancias semejantes a ciertos neurotransmisores (10, 22, 23). La capacidad de adherencia a las células blanco y los mecanismos para evadir los mecanismos de defensa del hospedero son factores primordiales que influyen en la patogenicidad de las amibas (10 , 11, 24 - 28).

Los medios para el cultivo axénico de E. histolytica , han permitido ampliar el estudio de la relación hospedero-parásito , así como los conocimientos de la biología celular y molecular del parásito (29). Sin embargo, el cultivo axénico de

las amibas también presenta ciertas desventajas, como la disminución en la virulencia de los organismos (30 - 32).

En 1968 Diamond describió el medio de cultivo TPS-1 para el cultivo axénico de *E. histolytica* (33). Posteriormente en 1978 el mismo Diamond desarrolló el medio TYI-S-33 para evitar la variaciones en el número de organismos producidos en el TPS-1 (34).

En el año de 1988 Said-Fernández y col. desarrollaron un medio de cultivo al que denominaron PEHPS por las iniciales de sus principales componentes . Este medio posee las mismas ventajas que el TYI-S-33 y además es más estable que otros medios de uso corriente por lo que se puede almacenar durante más tiempo y permite obtener mayor cantidad de microorganismos (35).

Muchas de las dudas que surgen de los estudios clínicos se han resuelto utilizando modelos animales. La amibiasis no ha sido la excepción. Dentro de las especies utilizadas para desarrollar modelos de infección amibiana se encuentra el conejo (36 - 38), el mono (39), el perro (40), la rata (41 - 44), el cobayo y el hámster. El cobayo se ha utilizado mucho en estudios de amibiasis en colon (45 - 48). El hámster se usa con frecuencia en los modelos de amibiasis hepática (49 - 57). Recientemente se ha utilizado el gerbil debido a la susceptibilidad que presenta para desarrollar tanto la amibiasis intestinal como la hepática (58 - 59). En años recientes se ha utilizado al ratón como modelo experimental. En estos animales, al igual que en los otros modelos, no ha sido posible producir infección

por la vía oral que es la ruta natural. Sin embargo, el ratón presenta ciertas características que le confieren ventajas sobre los otros modelos para el estudio de la respuesta inmune contra la amibiasis. La más importante es que el sistema inmune del ratón ha sido ampliamente estudiado, además existe la disponibilidad de una gran variedad de cepas genéticamente puras, dando por resultado una gran estabilidad y reproducibilidad en los resultados. Además, comercialmente se cuenta con cepas que presentan deficiencias inmunológicas específicas. También se encuentran disponibles marcadores celulares y herramientas inmunológicas tales como los anticuerpos monoclonales, (42 , 60 - 69).

La respuesta contra *E. histolytica* se inicia principalmente en mucosas. El tejido linfoide de tubo digestivo forma parte del llamado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT por sus iniciales en inglés) , y en este caso concreto se le denomina tejido linfoide asociado a intestino (GALT por sus iniciales en inglés). El GALT se encuentra integrado por los siguientes compartimentos: amígdalas, placas de Peyer, células linfoides distribuídas en forma difusa en lámina propia, el compartimento intraepitelial, apéndice cecal, nódulos linfáticos solitarios del intestino grueso y el tejido linfoide asociado a glándulas anexas (lagrimales, sistema hepato-biliar) (71 - 73).

Esta compleja organización permite establecer la respuesta humoral o celular adecuada al tipo de antígeno que se presenta.

El GALT posee zonas aferentes y eferentes de respuesta. Las placas de

Peyer, el apéndice cecal y las amígdalas palatinas son zonas aferentes donde se captan antígenos capaces de iniciar respuestas inmunitarias; mientras que los linfocitos de la lámina propia y los intraepiteliales son células primordialmente eferentes, capaces de producir inmunoglobulinas e inmunidad mediada por células (72 - 75).

Las placas de Peyer son un conjunto de nódulos linfáticos localizados en la mucosa de intestino delgado. Se distribuyen a lo largo del intestino, desde el duodeno hasta el íleon. Cada nódulo presenta un centro germinativo cercano a la *muscularis mucosae* , y un "casquete" o polo en contacto con el epitelio. El epitelio que las recubre es de tipo columnar bajo formado por células denominadas M debido a que presentan micropliegues. A través de ellas , mediante endocitosis, pasan las sustancias provenientes de la luz intestinal hacia los folículos linfoides (72). En la región subepitelial y en las áreas interfoliculares existen abundantes células dendríticas presentadoras de antígeno. En la zona internodular subyacente se localizan linfocitos T principalmente, de tipo cooperador. Finalmente, en la parte más interna se encuentra un centro germinativo , en donde están localizados los linfocitos B que poseen IgM e IgA de membrana (73 - 75).

En la lámina propia y en el compartimento intraepitelial la distribución celular se inicia con los linfocitos intraepiteliales, que son principalmente de tipo citotóxico/supresor. En la lámina propia se encuentran linfocitos T cooperadores y T supresores (72, 73, 76 - 78). Es conocido que estas dos subpoblaciones de

linfocitos regulan la respuesta de tipo IgG e IgA (72 - 74, 77 - 80). También se encuentran macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas productoras de anticuerpos (72, 73, 81 - 83).

Al pasar el antígeno de la luz intestinal al tejido a través de las células M , éste es captado por las células presentadoras de antígeno (CPA), las cuales lo procesan y lo presentan a los linfocitos T y B. En placas de Peyer se encuentran linfocitos T que actúan sobre los linfocitos B para que se lleve a cabo el cambio de isotipo de IgM a IgA de membrana. Los linfocitos ya sensibilizados migran a través de los linfáticos interfoliculares, llegando por los linfáticos aferentes a los ganglios mesentéricos. Posteriormente llegan al conducto torácico y de allí pasan a la circulación general llegando de esta manera a la lámina propia donde una subpoblación de linfocitos T, diferente a la encontrada en placas de Peyer, induce la diferenciación terminal de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos (73 , 84, 85).

Los anticuerpos liberados en la lámina propia pueden seguir dos rutas. Una es pasar a circulación general y la otra es la producción de IgA secretoria , la cual será exocitada a la luz intestinal, donde inhibe la unión del antígeno a la mucosa intestinal o se combina con los antígenos para neutralizarlos y que entonces sean eliminados por el peristaltismo (84, 86, 87).

Existen diversos factores que influyen en la respuesta del GALT hacia los antígenos: uno es la edad del individuo, ya que se ha visto que en los recién

nacidos los antígenos alimentarios penetran la mucosa en forma masiva induciendo una respuesta de anticuerpos (80, 88). Otros factores son : a) el estado inmunológico, esto es si ya ha sido expuesto antes el organismo al antígeno, b) el estado de salud del individuo, el cual comprende el funcionamiento del intestino, la flora del tracto gastrointestinal (89), el tránsito intestinal y la permeabilidad e integridad de las mucosas (90 - 94), c) el estado nutricional; se ha observado que en sujetos con desnutrición aumenta la susceptibilidad a las infecciones debido, en parte, al deterioro de la respuesta inmune (95 - 97). Otros factores son: a) la naturaleza del antígeno, donde se incluyen las características físico-químicas del mismo (98 - 101), si es administrado en forma soluble o particulada (102 - 111) o utilizando adyuvantes (112 - 116), b) la toma, c) el procesamiento, d) la presentación del antígeno, e) la dosis y f) la frecuencia en la administración del mismo. Un antígeno puede inducir tolerancia o generar una estimulación obteniéndose una respuesta inmune dependiendo de la dosis en que se administre (117, 118).

Una idea comunmente aceptada es que los antígenos que entran por la vía oral inducen tolerancia o supresión del sistema inmune. En los casos en que esta condición se rompe, se genera una respuesta y se produce por ejemplo, un estado de alergia a los alimentos, lo cual es nocivo para la salud del individuo y amenaza la sobrevivencia de la especie (119 - 121).

Con respecto a la respuesta inmune del intestino en contra de E. histolytica , un hecho epidemiológico digno de mayor atención es que los

individuos que residen en zonas endémicas de amibiasis presentan anticuerpos circulantes dirigidos contra las amibas, aún cuando estos individuos tengan exámenes coproparasitológicos negativos y no presenten sintomatología de amibiasis (4 , 5 , 9 , 10). Esta situación nos hace inferir que , al menos en la respuesta inmune contra *E. histolytica* en humanos, la presentación de antígenos amibianos al sistema inmune por vía oral no conduce necesariamente a la inducción de tolerancia o supresión .

Basándonos en esta inferencia y sabiendo que los antígenos amibianos que estimulan al sistema inmune del tracto gastrointestinal provienen de trofozoítos originados de la forma infectiva (quiste) ingerida en bebidas y alimentos contaminados , surgió entonces la siguiente pregunta:

a) ¿ Es posible implementar un modelo experimental en ratones, en el cual se estimule la respuesta de anticuerpos anti-amibas administrando directamente los antígenos de trofozoítos por vía oral ?.

Se conoce que los antígenos administrados por vía intraperitoneal, por lo general se comportan como buenos inmunógenos, pues inducen una intensa respuesta de anticuerpos a nivel sistémico. De acuerdo con esto se hizo el siguiente planteamiento:

a) ¿ Las moléculas amibianas se comportan como buenos inmunógenos si son administradas tanto por vía oral como por vía intraperitoneal ?.

Se decidió inmunizar ratones por vía oral para estudiar la posibilidad de despertar una respuesta inmune en este modelo.

De acuerdo a lo anterior se planteó la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Los ratones inmunizados por la vía oral con antígenos totales de trofozoítos de Entamoeba histolytica, son capaces de responder inmunológicamente produciendo anticuerpos anti-amibas en vez de inducirse tolerancia.

OBJETIVOS

- 1) Determinar la velocidad del tránsito intestinal en el ratón BALB/c para saber si el tiempo de estancia del antígeno en la luz intestinal es suficiente para establecer el contacto adecuado con el sistema inmune del tracto gastrointestinal de los animales.
- 2) Determinar la presencia de células formadoras de anticuerpos IgM, IgG e IgA anti-amiba en placas de Peyer y en bazo de ratones inmunizados por vía oral con antígenos de *E. histolytica* ; y de esta manera determinar si existe una estimulación del sistema inmune gastrointestinal por el antígeno amibiano.
- 3) Determinar la presencia de células formadoras de anticuerpos anti-amiba en bazo de ratones inmunizados por vía intraperitoneal y comparar esta respuesta con la respuesta obtenida en ratones inmunizados por vía oral.
- 4) Determinar cualitativamente la presencia de anticuerpos anti-amiba en suero mediante la técnica de Inmuno-dot , para detectar anticuerpos anti-amibas a nivel sistémico en ratones inmunizados por vía oral e intraperitoneal.

5) Cuantificar el título de anticuerpos anti-amiba por la técnica inmunoenzimática de ELISA en el suero de ratones inmunizados por vía oral y vía intraperitoneal.

II. ANEXOS

1. Descripción de los procedimientos de laboratorio para la realización de los experimentos de inmunización y de la técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-amiba en el suero de ratones.

III. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL SUERO

La concentración de anticuerpos en el suero se determinó por el método de ELISA indirecto. Se utilizó un suero de ratón anti-amiba como anticuerpo primario y un suero de ratón anti-ratón como anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de avellana (APC).

III. MATERIAL Y METODOS

1) ANIMALES

Se utilizaron ratones BALB/c adultos , de ambos sexos (8-12 semanas de edad) .Los animales se mantuvieron en el bioterio a una temperatura de 18 a 20°C, en jaulas de acrílico con cubierta de rejilla metálica y se alimentaron con nutricubos para roedores (Purina U.S.A.) y agua estéril *ad libitum*. Los animales procedían de nuestro bioterio a excepción de 40 animales que fueron adquiridos con un proveedor local. Antes de proceder a inmunizar todos los animales fueron tratados previamente con Metronidazol durante 10 días y se dejaron pasar siete días antes de proceder a utilizarlos.

2) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSITO INTESTINAL

Se les administró a los ratones 0.4 ml de colorante vegetal comestible de color verde (Mc Cormick, México, D.F., Méx.) , por medio de una sonda orogástrica, para lo que se utilizó un catéter de linfangiografía. Los ratones fueron previamente anestesiados con éter.

Los ratones se sacrificaron a diferentes tiempos (10, 25, 45, 60, 90 min. y 2, 3, 10, y 24 horas) , por dislocación cervical. Enseguida se extrajeron estómago, intestino delgado y colon para determinar la localización del colorante administrado y hacer el registro fotográfico.

Para determinar la trayectoria del colorante a lo largo del tracto gastrointestinal , éste se dividió de manera arbitraria en estómago, primero, segundo y tercer tercio de intestino delgado y primera y segunda mitad de intestino grueso.

3) TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica cepa HK-9

Los trofozoítos fueron cultivados axénicamente en el medio de cultivo PEHPS a 37°C (35). Las amibas se obtuvieron al final de la fase logarítmica de crecimiento por enfriamiento de los tubos en agua a 4°C por 15 minutos, centrifugándose a 1500 rpm durante 15 minutos y realizándose dos lavados con solución PBS de Diamond. La cantidad de trofozoítos se determinó contando con un hematocitómetro. Los trofozoítos fueron donados por el Dr. Salvador Saíd Fernández del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social. Posteriormente se procedió a liofilizar y se realizó la determinación de la concentración de proteínas directamente de los trofozoítos mediante el método de Bradford (122).

4) PREPARACION DEL ANTIGENO PARA INMUNIZACIONES.

Para las inmunizaciones por vía oral se pesaron diferentes cantidades de trofozoítos de E. histolytica liofilizados : 0.1, 1.0 y 3.0 mg de peso seco del antígeno total por dosis, equivalente a 0.048 , 0.48 y 1.45 mg de proteína por Bradford, respectivamente. Después de pesar, el antígeno se resuspendió en solución salina 0.85 % pH 7.2 - 7.4 o en aceite de hígado de bacalao (0.2 ml por dosis). Para las inmunizaciones por vía intraperitoneal el antígeno se pesó a razón de 3 mg de antígeno total por dosis y se resuspendió en adyuvante

incompleto de Freund para hacer la primera inmunización. Para las subsiguientes inmunizaciones, el antígeno se resuspendió en solución salina (NaCl 0.85 %). Las suspensiones se sonicaron tres veces, por 20 seg. cada una, con ciclos ajustados a 50 % (Sonicador Branson 450, Sonic Power Co., Danbury, Conn. USA).

5) EXTRACTO TOTAL AMIBIANO

El extracto total se utilizó para los ensayos de Inmuno-dot y de ELISA y para la sensibilización de glóbulos rojos de carnero para aplicar la técnica de Células Formadoras de Anticuerpos. El extracto se obtuvo sometiendo a los trofozoítos a una extracción con cloroformo:metanol. La fracción insoluble (fracción IC:M), se resuspendió en amortiguador salina fosfatos (PBS) 0.15 M , pH 7.4 , se sonicó tres veces durante 20 segundos cada vez con ciclos ajustados a 50 % (Branson 450, Sonic Power Co., Danbury, Conn. USA.). Enseguida se centrifugó a 1100 g/min , durante 5 minutos. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford y el resto se guardó en congelación a -70°C en alícuotas de 1 ml.

6) DETERMINACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS (CFA) POR LA TECNICA DE JERNE MODIFICADA POR CUNNINGHAM. (123)

El método de placas hemolíticas permite visualizar pequeñas cantidades de anticuerpos líticos (10^3 - 10^6 moléculas), liberados por una sola célula plasmática.

El fundamento de la técnica es el siguiente:

Una suspensión de linfocitos sensibilizados más una densa suspensión de eritrocitos indicadores (eritrocitos que contienen en la superficie el antígeno con el que fue inoculado el ratón donador de la suspensión de linfocitos), y suero como fuente de complemento, son colocados en una cámara de Cunningham donde después de incubarse durante una hora a 37°C aparecen placas líticas que revelan la presencia de células formadoras de anticuerpos anti-antígeno administrado. Esta técnica permite contar células individuales productoras de anticuerpos, aún cuando constituyan una minoría en la población de linfocitos. El método permite determinar el número de células productoras de IgM , ya que esta inmunoglobulina es muy eficiente para disparar la vía clásica del complemento.

Para medir células productoras de IgG o IgA se utilizó el método indirecto con anticuerpos anti-IgG o anticuerpos anti-IgA.

A continuación se especifican las condiciones experimentales de cada una de las variables.

6.1 INMUNIZACIONES PARA LOS ENSAYOS DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS (CFA)

Se inmunizaron 105 ratones (machos y hembras) de la cepa BALB/c , por vía oral con antígeno de E. histolytica. Se hicieron grupos que se inmunizaron de 1 a 5 veces, con una inmunización diaria. Se sacrificaron de 1 a 7 días después de la última inmunización.

Se inmunizaron cinco ratones por vía intraperitoneal con antígeno de E. histolytica , tres dosis, una por semana. Se realizó la búsqueda de CFA una semana después de la última inmunización.

Como control se inmunizó un ratón en cada experimento, con 0.2 ml de glóbulos rojos de carnero al 10 % por vía intraperitoneal y se sacrificó una semana después de la inmunización.

6.2 TECNICA DE JERNE MODIFICADA POR CUNNINGHAM PARA DETECCION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS EN PLACAS DE PEYER.

- A) Se sacrificó el ratón previamente inmunizado con antígeno amibiano por vía oral, por dislocación cervical y se procedió a realizar una incisión en la línea media del abdomen.
- B) Posteriormente se extrajo el intestino delgado y se localizaron las placas de Peyer. Las pinzas se colocaron por debajo de la placa de Peyer y se obtuvieron cortando al ras de la pinza.
- C) Las placas de Peyer se colocaron en una caja de Petri mantenida sobre hielo y que contenía de 5 a 7 ml de solución amortiguadora (Ver tabla 1).

D) Se disgregó el tejido por presión con ayuda de unas pinzas de disección sin dientes y la suspensión celular se pasó con una pipeta Pasteur a un tubo de ensayo de 15 ml de capacidad que se encontraba en un recipiente con hielo.

E) La caja de Petri se lavó con 5 ml de solución amortiguadora (ver tabla 1) para recuperar las células que pudieran haber quedado adheridas en el fondo de la caja y se agregaron al tubo que contenía las primeras células recuperadas.

F) El tubo con la suspensión celular se dejó reposar 1 min. para que sedimentaran los detritus celulares. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 15 ml de capacidad y se centrifugó a 1100 x/g por 5 min. en una centrífuga refrigerada (Beckman TJ-6 , USA.).

G) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular golpeando suavemente la parte inferior del tubo. Después se agregaron 10 ml de solución amortiguadora (ver tabla 1) y se tomaron dos alícuotas de 50 μ l cada una, la primera de éstas se colocó en un tubo que contenía 0.45 ml de azul tripano al 0.1 % , para determinar la viabilidad celular. La segunda alícuota se colocó en un tubo con 0.45 ml de ácido acético al 2% (dilución de las células 1:10), se mezcló con vibrador eléctrico y se contaron las células en una cámara de Neubauer (American Optical, Scientific Instruments Div., N.Y. , USA). Se permitió que sedimentaran las células durante un minuto y se contaron con un

microscopio de campo claro (Carl Zeiss , West Germany.) con el objetivo seco débil (10 X).

H) La suspensión de células se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Después del segundo lavado se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en solución de trabajo (D-PBS, solución de Hank o solución salina modificada).

I) Las células se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células por ml en medio RPMI (Sigma R 4130) con 5% de suero de ternera fetal (STF).

J) Se tomaron 0.2 y 0.4 ml de la suspensión celular y se colocaron en otro tubo, a este se le añadieron 0.2 ml del sistema indicador que consta de:

- Eritrocitos de carnero cubiertos con antígeno (al 10% ó 20 %).
- Solución salina modificada (NaCl 0.85 % , glucosa 20 % , CaCl_2 0.3M y MgCl_2 0.3M).
- Suero de cobayo como fuente de complemento a diferentes diluciones (1:1 , 1:2 y 1:4).
- Para determinar el número de células productoras de IgG e IgA, se agregó el sistema indicador, además anticuerpo de cabra dirigido contra IgG o IgA de ratón a diferentes diluciones (1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128).

K) Se mezclaron bien los componentes arriba mencionados, agitando suavemente y se llenaron las cámaras de Cunningham con 150 μ l , sellándose finalmente con una mezcla de vaselina-parafina 1:1.

L) Se incubaron a 37°C durante una hora y se contaron las placas hemolíticas formadas , con un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss , West Germany.)

M) Enseguida se realizaron los cálculos para obtener el número de células formadoras de placas hemolíticas por millón de células, sabiendo que se tenían 0.375×10^6 células por cámara.

6.3 OBTENCION DE LAS CELULAS DE BAZO

A) Se sacrificó el ratón previamente inmunizado con antígeno amibiano o con globulos rojos de carnero por vía intraperitoneal, por dislocación cervical y se le realizó una incisión sobre el borde inferior de la última costilla para descubrir el bazo.

B) Se procedió a extraer el bazo y se colocó en una caja de Petri que contenía de 5 a 7 ml de solución salina modificada con glucosa 20%, cloruro de calcio 0.3M y cloruro de magnesio 0.3M , mantenida sobre hielo.

C) Se disgregó el tejido con la ayuda de unas pinzas de disección sin dientes y se transfirió la suspensión celular a un tubo de ensayo de 15 ml, con ayuda de una pipeta Pasteur y se dejó sedimentar durante 1 a 2 min.

D) Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 15 ml. Todo se mantuvo en hielo, durante los pasos A a D.

E) El resto del procedimiento fue el mismo que el utilizado para la búsqueda de células formadoras de anticuerpos en placas de Peyer.

En la tabla 1 se muestran las diferentes condiciones experimentales.

| ENSAYOS DE HEMOLISIS PARA PROBAR LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON <i>E. histolytica</i> . | | | | | | |
|--|--|-----------------------|-------|--------------|-------|-------|
| CARBODI-MIDA (mg/ml) | ANTIGENO (<i>E. histolytica</i>) (mg/ml) | SOL. SALINA MODIF. | | SOL. ALSEVER | | AGUA |
| | | C O M P L E M E N T O | | | | |
| | | 1:1 | 1:2 | 1:1 | 1:2 | 1:1 |
| 3.5 | 0.075 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| 7.5 | 0.075 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| 20.0 | 0.075 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |

GLOBULOS ROJOS DE CARNERO AL 20 %. CONTROL POSITIVO : HEMOLISINA 1:1000.
CONTROL DE 100 % DE LISIS : AGUA.

6.4 SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO CON ANTIGENO AMIBIANO.

- A) Se sangró un carnero, macho, de tres años de edad, por punción de la vena yugular, para la obtención de los eritrocitos, utilizando como anticoagulante citrato de sodio y dejando pasar una semana antes de empezar a utilizarlos.
- B) Se hicieron tres lavados de los eritrocitos con solución salina de NaCl al 0.85 %, pH 7.2. Se tomó paquete globular y se prepararon dos concentraciones, una al 10 % y otra al 20%.
- C) Posteriormente los eritrocitos se mezclaron con diferentes concentraciones de antígeno amibiano.
- D) Después se agregaron diferentes concentraciones de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (ver tabla 1).
- E) Los eritrocitos se incubaron a temperatura ambiente, por 40 min. con agitación ocasional en agitador mecánico (Micro-Shaker II , Dynatech Lab. Inc., USA.).
- F) Se realizaron tres lavados con solución de NaCl al 0.85 % , eliminando el sobrenadante.

G) Los glóbulos rojos de carnero con el antígeno unido, se resuspendieron, a la concentración original (10 ó 20 %) en una solución de albúmina sérica bovina al 0.1 %. Se almacenaron a 4°C hasta su utilización en los ensayos de hemaglutinación, hemólisis o CFA.

6.5 ENSAYOS DE HEMAGLUTINACION PARA DEMOSTRAR LA UNION DEL ANTIGENO AMIBIANO A LA MEMBRANA DEL ERITROCITO

A) En una placa de microtitulacion se colocaron 100 µl de eritrocitos de carnero al 0.5 % , sensibilizados con antígeno de amibas a una concentración de 0.5 y 1.5 mg de proteína/ml.

B) Posteriormente se agregaron 100 µl de suero de pacientes con títulos de anticuerpos por IHA de 1:2048 y 1:16,384 y de ratones inmunizados por vía intraperitoneal 4, 5 y 6 veces con extracto crudo de amiba. Como controles negativos se utilizaron sueros humanos con la prueba de IHA negativa y suero de ratón sin inmunizar. Todos los sueros fueron adsortos previamente con glóbulos rojos de carnero (GRC).

C) Enseguida se incubaron durante 2 horas a 37°C y finalmente se procedió a realizar la lectura.

6.6 ENSAYOS DE HEMOLISIS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO POSTERIOR A LA SENSIBILIZACION CON ANTIGENO DE E. histolytica.

- A) Se tomaron eritrocitos de carnero al 10 % y al 20 % sensibilizados y se resuspendieron en diferentes soluciones (solución Alsever y solución de NaCl al 0.85 %).
- B) Se mezclaron en diferentes tubos, previamente etiquetados, con sueros de pacientes con títulos de anticuerpos anti-amiba por IHA de 1:2048 y 1:16,384.
- C) Se agregó anti-gammaglobulina humana producida en conejo y suero de cobayo como fuente de complemento a diferentes diluciones (1:1 y 1:2).
- D) Se mezcló por agitación suave y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se centrifugaron los tubos a 1100 g/min. (Serofuge, Clay Adams, USA.) y se determinó la presencia o ausencia de lisis. Como control del 100 % de lisis se utilizó un tubo tratado con cada una de las condiciones mencionadas, al que se le agregó agua.

6.7 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para estos experimentos se obtuvieron células de bazo y de placas de Peyer de ratón , se colocaron en diferentes soluciones amortiguadoras y se determinó el porcentaje de células capaces de excluir el azul de tripano.

6.8 OBTENCION DEL COMPLEMENTO.

Se utilizó suero de cobayo como fuente de complemento.

A) Se sangró un cobayo macho , de 600 gr de peso , por punción cardiaca. La sangre así obtenida se colocó en un tubo de vidrio que se mantuvo a 4°C para evitar la inactivación del complemento.

B) Se esperó a que se retrajera el coágulo y se centrifugó a 1100 g/min , en centrífuga refrigerada (Beckman TJ-6 , USA.) durante 5 min. El suero se recuperó con pipeta Pasteur y se mantuvo a 4°C.

Con el objeto de eliminar cualquier anticuerpo natural que pudiera encontrarse en el suero de cobayo, se adsorbió con los eritrocitos de carnero sin sensibilizar , antes de ser utilizados. Para ello se puso un volúmen de paquete de GRC con un volúmen igual de suero de cobayo, se mezcló y se incubó durante 20 min. a 4°C . Posteriormente se centrifugó, se recolectó el suero y se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

7) INDUCCION DE LA RESPUESTA INMUNE CON ANTIGENOS DE Entamoeba histolytica ADMINISTRADOS POR VIA ORAL EN RATONES BALB/c.

7.1 DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA Entamoeba histolytica POR MEDIO DE LA TECNICA DE INMUNO-DOT, EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS AMIBIANOS.

7.1.1 INMUNIZACIONES Y SANGRADOS:

Se inmunizaron 42 ratones (machos y hembras) de la cepa BALB/c con antígeno de Entamoeba histolytica . Los ratones se inmunizaron cada cuatro días durante 24 días, sangrándose antes de cada inmunización.

14 animales fueron inmunizados por vía intraperitoneal (I.P).

28 ratones se inmunizaron por vía oral (V.O). A un grupo de 14 animales se les administró el antígeno resuspendido en aceite de hígado de bacalao y a otro grupo de 14 ratones se les administró el antígeno resuspendido en solución de NaCl al 0.85 % .

7.1.2 TECNICA DE INMUNO-DOT.

A) Se cortó el papel de nitrocelulosa (12 X 8 cm) y se humedeció en amortiguador salina-Tris-HCl (TBS) pH 7.5.

B) Se colocó el papel en la placa de microfiltración (Bio-Rad , USA.) y se agregaron 100 μ l de amortiguador TBS en cada pozo, eliminándose el líquido mediante un sistema de vacío. Se repitió la operación.

C) Se agregaron a cada pozo 25 μ l del antígeno resuspendido en TBS, a razón de 50 μ g de proteína / ml (1.25 μ g/pozo). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

D) Se aplicaron 200 μ l de solución bloqueadora con albúmina sérica bovina (ASB) 1% en amortiguador TBS- tween 1:2000 (TTBS). Se incubó una hora a temperatura ambiente.

E) Se lavó con 200 μ l de solución de lavado TTBS, drenando, posteriormente, con vacío. La operación se repitió dos veces más.

F) Se agregó el suero de ratón diluído 1:50 (para determinar anticuerpos totales) y 1:25 (para isotipos) en solución bloqueadora a razón de 50 μ l por pozo.

G) Se incubó una hora a temperatura ambiente.

H) Se realizaron tres lavados con solución de lavado TTBS utilizando el sistema de vacío para drenar el líquido.

I) Se agregaron 50 μ l de:

- Inmunoglobulina de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugada a peroxidasa (Sigma , St. Louis Mo. USA.) dilución 1:500 .
- Inmunoglobulina de cabra anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma , St Louis, Mo. USA.) dilución 1:1000.
- Inmunoglobulina de cabra anti-IgM de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma , St. Louis, Mo. USA.) dilución 1:5000.
- Inmunoglobulina de conejo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma , St. Louis, Mo. USA.) dilución 1:1000.

J) Se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

K) Se hicieron dos lavados con solución de lavado TTBS (200 μ l por pozo).

L) Se extrajo el papel de la placa de microfiltración y se procedió a revelar con 16 μ l de peróxido de hidrógeno 30 % , 20 mg de 3'3'-diaminobencidina (Sigma, St. Louis Mo. USA.) como cromógeno en 40 ml de PBS 0.15M pH 7.4.

M) La reacción se detuvo con ácido clorhídrico 5 N y el papel se lavó con agua bidestilada.

7.2 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA Entamoeba histolytica MEDIANTE LA TECNICA DE ELISA, EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS AMIBIANOS.

7.2.1 INMUNIZACIONES Y SANGRADOS:

Se inmunizaron 60 ratones por vía oral con antígenos amibianos. Se hicieron grupos de 1 a 10 inmunizaciones , inmunizándose cada cuatro días.

Se sangraron antes de cada inmunización.

Se inmunizaron 15 ratones por vía intraperitoneal, con antígenos amibianos cada 2 semanas haciéndose grupos de 1 a 4 inmunizaciones. Los animales se sangraron antes de cada inmunización.

Como control negativo se utilizaron los sueros de los ratones antes de iniciar las inmunizaciones.

7.2.2. TECNICA DE ELISA. (*enzyme linked immnosorbent assay*).

A) Se utilizaron placas de fondo plano Costar (Bio-Rad , USA).

B) Se diluyó el extracto amibiano en amortiguador de acetatos pH 5.0, a razón de 100 µg de proteína / ml (10 µg/pozo).

C) Se agregaron 100 ul del antígeno por pozo y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se eliminó el contenido por decantación.

D) Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno, en agitación, con solución de lavado (PBS 0.15 M , pH 7.4 con tween 20 1:1000).

E) Se agregaron 200 µl de ASB al 1 % en solución de lavado por pozo y se incubó a 37°C durante dos horas.

F) Se efectuaron tres lavados de cinco minutos cada uno con solución de lavado.

G) Se agregaron 100 µl de suero de ratón, a diferentes diluciones (1:50 para determinar anticuerpos totales y 1:25 para determinar isotipos). Se incubó durante 1 h a 37°C.

H) Se realizaron tres lavados de 5 min. cada uno , con solución de lavado.

I) Se agregaron 100 µl por pozo de los conjugados a peroxidasa y se incubó 1 h a 37°C.

J) Se hicieron tres lavados, de 5 min cada uno, con solución de lavado.

K) Se agregaron 160 μ l de solución de revelado con 8 μ l de peróxido de hidrógeno, 10 mg de O-fenilendiamina dihidroclorada (OPD) (Sigma , St. Louis, Mo. USA.) como cromógeno, en 25 ml de solución amortiguadora de citratos pH 5.0. Se incubó a temperatura ambiente, a resguardo de la luz durante 30 min. y en agitación en un agitador mecánico (Micro-Shaker II , Dynatech Lab. Inc. USA.)

L) Se detuvo la reacción agregando 40 μ l de ácido sulfúrico 1 N, por pozo.

M) Posteriormente, se realizó la lectura con un lector de microELISA (Dia-Medix, USA.) BP-96 a una longitud de onda de 492 nm.

Nota: Como blanco se colocaron todos los reactivos en un pozo a excepción del suero.

Los resultados de estos experimentos se reportaron en Unidades de ELISA (U. E.). Para ello se utilizó un suero como calibrador en todos los ensayos para poder comparar los resultados entre un ensayo y otro.

Las U.E. se obtuvieron de la siguiente manera:

$$A) \frac{100}{D.O. Cal} = F$$

D.O. Cal

$$B) F \times D.O. Pb = U.E.$$

Donde:

D.O. Cal. = Densidad óptica del calibrador.

D.O. Pb. = Densidad óptica del problema

F = Factor

U.E. = Unidades de ELISA.

7.2.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Para determinar si existe significancia estadística entre el valor basal del título de anticuerpos de los ratones sin inmunizar y los títulos de anticuerpos totales y de cada uno de los isotipos IgM, IgG e IgA, después de inmunizar con antígeno de *E. histolytica* por vía oral y por vía intraperitoneal, se obtuvo la media y la desviación estándar de cada uno de los grupos, y se hizo un análisis de comparación múltiple con prueba de t con corrección de Bonferroni con una $p < 0.05$. Además, a los resultados obtenidos de las inmunizaciones por vía oral se les realizó una prueba de intervalos de confianza del 95 %.

Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre la respuesta de los ratones inmunizados por vía oral en comparación con los resultados de los ratones inmunizados por vía intraperitoneal se realizó un análisis de varianza.

7.2.4 DETERMINACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS anti-GLOBULOS ROJOS DE CARNERO EN BAZO DE RATONES BALB/c.

7.2.4.1 INMUNIZACIONES

Ratones BALB/c, previamente inmunizados por vía oral con antígeno de *E. histolytica* para la determinación de la presencia de anticuerpos mediante la técnica de ELISA, se inmunizaron con 0.2 ml de glóbulos rojos de carnero al 10 %, dosis única, por vía intraperitoneal. Estos ratones se sacrificaron 4 días después de la inmunización intraperitoneal y se determinó la presencia de células formadoras de anticuerpo contra glóbulos rojos de carnero en bazo.

IV. RESULTADOS

1) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD INTESTINAL EN RATONES BALB/c UTILIZANDO UN COLORANTE COMESTIBLE VEGETAL.

Se determinó la velocidad del tránsito intestinal en el ratón para confirmar que el antígeno permanecería el tiempo suficiente en contacto con el sistema inmune del tracto gastrointestinal de los animales.

En la figura 1A se observa que 25 min después de administrado el colorante , éste se encuentra localizado a nivel del primer tercio y parte del segundo de intestino delgado. A los 45 min (Fig. 1B) el colorante se puede observar a nivel del tercer tercio de intestino delgado , la figura 1C muestra , a los 90 min , que el colorante alcanzó la primera mitad de intestino grueso y a las 2 h , el colorante empieza a ser eliminado en las heces ocupando todo el colon (Fig. 1D). Tres h después de la administración se encontró el colorante en el estómago. Este fué liberado intermitentemente hacia el intestino delgado. Esto puede apreciarse claramente en las figuras 1B y 1D.

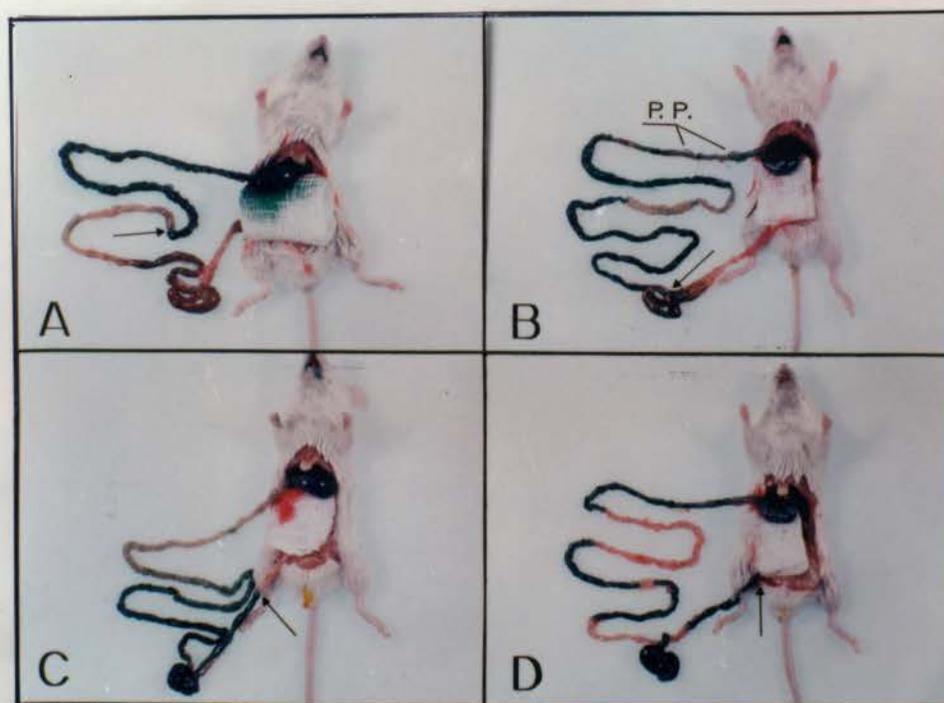


Figura 1: Tránsito intestinal del colorante administrado por vía oral a diferentes tiempos (25, 45, 90 minutos y 2 horas).

En la tabla 2 se describen los resultados obtenidos a diferentes tiempos , encontrándose que a las 3 h el colorante se sigue eliminando en heces y sigue siendo liberado de estómago hacia intestino. A las 10 h se encuentra solamente en intestino grueso y es eliminado en heces y a las 24 h ya no se encontró colorante en todo el tracto gastrointestinal.

Tabla 2

| VELOCIDAD DE TRANSITO GASTROINTESTINAL EN RATONES BALB/ c. | | | | | | |
|--|-------------------|----------|-----------|------------------|-----------|-------|
| | INTESTINO DELGADO | | | INTESTINO GRUESO | | TOTAL |
| | 1er. ter. | 2o. ter. | 3er. ter. | 1a. mitad | 2a. mitad | |
| MIN. | | | | | | |
| 10 | 5 | 1 | -- | -- | -- | 6 |
| 25 | 2 | 2 | -- | -- | -- | 4 |
| 45 | -- | 1 | 5 | -- | -- | 6 |
| 60 | -- | -- | 4 | 1 | -- | 5 |
| 90 | -- | -- | 1 | 4 | -- | 5 |
| HS. | | | | | | |
| 2 | -- | -- | -- | 1 | 4 | 5 |
| 3 | -- | -- | -- | -- | 5 | 5 |
| 10 | -- | -- | -- | -- | 5 | 5 |
| 24 | -- | -- | -- | -- | 5 | 5 |

MIN. = MINUTOS

HS. = HORAS

NOTA : En todos los animales se encontró colorante en estómago hasta tres horas después de administrado.

2) BUSQUEDA DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS EN PLACAS DE PEYER DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS POR VIA ORAL CON ANTIGENOS DE Entamoeba histolytica CEPA HK-9.

En estos experimentos se utilizó la técnica de Jerne , modificada por Cunningham (122) , para medir la producción de células formadoras de anticuerpos IgM , IgG e IgA en células obtenidas de placas de Peyser de ratones

inmunizados con antígeno de amiba y de esta manera determinar si existe una estimulación del sistema inmune gastrointestinal por el antígeno amibiano.

2.1 ENSAYOS DE HEMAGLUTINACION PARA DEMOSTRAR LA UNION DEL ANTIGENO AL ERITROCITO, POSTERIOR A SU SENSIBILIZACION CON EXTRACTO AMIBIANO.

Los ensayos de hemaglutinación para determinar que el antígeno de *E. histolytica* estuviera unido a la membrana de los eritrocitos que iban a ser utilizados en los experimentos de CFA. Los resultados se pueden observar en la tabla 3. Los sueros que contenían anticuerpos contra *E. histolytica* dan la prueba de hemaglutinación positiva. Los sueros que carecían de anticuerpos anti-amiba dan la prueba negativa. Lo que demuestra que los glóbulos rojos de carnero estaban efectivamente, sensibilizados con el antígeno amibiano.

Tabla 3

| ENSAYOS DE HEMAGLUTINACION PARA CONFIRMAR LA UNION DEL EXTRACTO DE <i>E. histolytica</i> A LOS GLOBULOS ROJOS | | |
|---|---|-----------|
| SUEROS | CONCENTRACION DE <i>E. histolytica</i> HK-9 (mg / ml) | |
| | 0.5 | 1.5 |
| SUERO HUMANO | 1 : 320 | 1 : 1000 |
| CONTROL (-) | (-) | (-) |
| RATON 1 | 1 : 10240 | 1 : 20480 |
| SUERO NORMAL DE RATON | (-) | (-) |

GLOBULOS ROJOS DE CARNERO AL 0.5 %. DIMETILETILCARBODIIMIDA 10 mg/ml.
CONTROL NEGATIVO DE SUEROS HUMANOS VER MATERIAL Y METODOS.

En la figura 2 se observa que los dos controles positivos presentan títulos de hemaglutinación de 1:500 (línea A) y 1:1000 (línea B) partiendo de una dilución de 1:250. Los sueros de las líneas C a G son sueros de ratones inmunizados con antígeno de *E. histolytica* y se puede observar que son positivos. El suero correspondiente a la línea H es un suero negativo y se puede ver que no existe aglutinación.

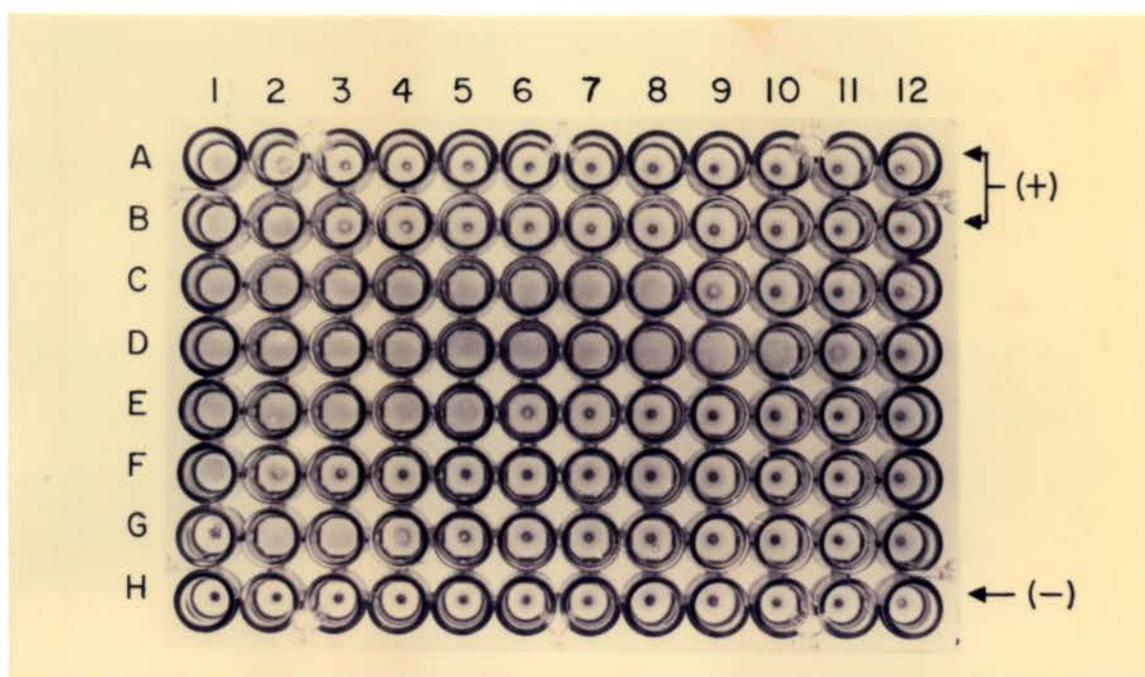


Figura 2: Resultados de ensayos de hemaglutinación

2.2 ENSAYOS DE HEMOLISIS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA DE LOS ERITROCITOS POSTERIOR A LA

SENSIBILIZACION CON ANTIGENO DE AMIBA.

Estos ensayos se realizaron para determinar la estabilidad de la membrana de los eritrocitos después de unir el antígeno y descartar de esta manera, que la ausencia de placas hemolíticas pudiera deberse a que las proteínas presentes en la membrana de los eritrocitos hubieran reaccionado con la carbodimida formando polímeros de manera que no permitieran la movilidad de las proteínas de membrana y por lo tanto se llevara a cabo la lisis en el sistema indicador.

En la tabla 4 se muestran los resultados de los ensayos de hemólisis donde se encontró que las condiciones óptimas para obtener lisis de los eritrocitos sensibilizados con *E. histolytica* son utilizando solución salina modificada con glucosa al 20%, cloruro de calcio 0.3M y cloruro de magnesio 0.3M, complemento sin diluir independientemente de la concentración de antígeno y la concentración de carbodimida utilizada para unir el antígeno a la membrana. Aunque se observó que durante el proceso de sensibilización de los eritrocitos estos se lisaban espontáneamente al utilizar la concentración de 20 mg de carbodimida / ml. Por ello se decidió utilizar una concentración intermedia de 10 mg de carbodimida / ml.

El control de 100 % de lisis tenía los mismos elementos que el problema pero en lugar de complemento se le adicionó agua.

Tabla 4

| ENSAYOS DE HEMOLISIS PARA PROBAR LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON <i>E. histolytica</i> . | | | | | | |
|--|--|-----------------------|--------------|-------|-------|-------|
| CARBODI-MIDA (mg/ml) | ANTIGENO (<i>E. histolytica</i>) (mg/ml) | SOL. SALINA MODIF. | SOL. ALSEVER | | AGUA | |
| | | C O M P L E M E N T O | | | | |
| | | 1:1 | 1:2 | 1:1 | 1:2 | 1:1 |
| 3.5 | 0.075 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| 7.5 | 0.075 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| 20.0 | 0.075 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | 0.1 | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |

GLOBULOS ROJOS DE CARNERO AL 20 %. CONTROL POSITIVO : HEMOLISINA 1:1000.
CONTROL DE 100 % DE LISIS : AGUA.

2.4 DETECCIÓN DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS EN PLACAS DE PEYER Y EN GATOS DE RATTUS INMUNIZADOS POR VIA

2.3 DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR EN DIFERENTES SOLUCIONES.

Se realizaron pruebas de viabilidad celular en diferentes soluciones para decidir cual de ellas sería utilizada en los ensayos de búsqueda de células formadoras de anticuerpos. Como se muestra en la tabla 5 la viabilidad celular fue mayor en todos los tiempos cuando se utilizó solución salina modificada con glucosa al 20% , cloruro de sodio 0.3M y cloruro de magnesio 0.3M siendo del 80 % a los 60 min y del 51 % a las 2 h.

Tabla 5

DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR

| TIEMPO (HS) | SSM | GVB | HANKS |
|------------------|------|------|-------|
| 1 | 80 % | 58 % | 30 % |
| 1 1/2 | 66 % | 48 % | 28 % |
| 2 | 51 % | 43 % | N.D. |

SSM. = SOLUCION SALINA AL 0.85 % MODIFICADA CON GLUCOSA , CALCIO Y MAGNESIO. GVB. = AMORTIGUADOR VERONAL.

2.4 DETECCION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS EN PLACAS DE PEYER Y EN BAZO DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA ORAL CON EXTRACTO CRUDO DE E. histolytica.

Estos experimentos se llevaron a cabo para medir la producción de células formadoras de anticuerpos IgG, IgM e IgA en las placas de Peyer y bazo de los ratones inmunizados con antígeno de E. histolytica y de esta manera determinar si existe una estimulación del sistema inmune intestinal inducida por el antígeno amibiano.

ANTICUERPOS DE *E. histolytica*

En la tabla 6 se muestran los diferentes esquemas de inmunización y de obtención de células que se probaron.

Los resultados son negativos bajo todas las condiciones utilizadas. No se lograron detectar células formadoras de anticuerpos en los animales inmunizados por vía oral.

Tabla 6

| BUSQUEDA DE CFP EN BAZO Y PLACAS DE PEYER EN RATONES INMUNIZADOS POR VIA ORAL CON <i>E. histolytica</i> | | | | | | |
|---|--------------------------|--|-----------------|---------------------------|-----------|-----------|
| No. DE INMUNIZACIONES | BUSQUEDA DE CFP (DIAS) | TROFOZOITOS LIOFILIZADOS mg/polvo (mg prot.) | CELULAS | CFP (X 10 ⁶) | | |
| | | | | IgM | IgG | IgA |
| 1. 2. 3, 4, 5 | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 | 0.1 (0.048) | P. DE P BAZO | 0 N.D. | 0 N.D. | 0 N.D. |
| | | 1.0 (0.483) | P. DE P BAZO | 0 N.D. | 0 N.D. | 0 N.D. |
| | | 3.0 (1.45) | P. DE P BAZO | 0 0 | 0 0 | 0 0 |

EL ANTIGENO SE RESUSPENDIO EN ACEITE DE HIGADO DE BACALAO . LAS INMUNIZACIONES SE HICIERON DIARIAMENTE BUSCANDOSE CFP DE 1 A 7 DIAS DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION .

2.5 DETECCION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS EN BAZO DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL CON

ANTIGENOS DE *E. histolytica*.

Estos experimentos se hicieron para comprobar que los ratones respondían contra los antígenos de *E. histolytica* y que si se obtenía una respuesta negativa, no se debía a que los ratones no fueran respondedores para el antígeno de nuestro interés.

En la tabla 7 se muestra que se lograron obtener CFA de IgM, IgG e IgA, en el bazo de los ratones inmunizados por vía intraperitoneal.

Los resultados mostrados con anterioridad en este trabajo demuestran que se tomaron todas las precauciones y se verificó cada uno de los parámetros que podían influir en los ensayos de CFA.

Tabla 7

| BUSQUEDA DE CFP EN BAZO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL CON <i>Entamoeba histolytica</i> | | | | | | |
|--|--------------------|-----------------------|-----------|---------------------------|----------|--|
| ANTIGENO | DOSIS DEL ANTIGENO | No. DE INMUNIZACIONES | IgM | CFP (X 10 ⁶) | | |
| | | | | IgG | IgA | |
| <i>E. histolytica</i> | 3mg/ dosis | 3 * | 25 +/- 11 | 26 +/- 16 | 22 +/-11 | |
| GLOBULOS ROJOS DE CARNERO (CONTROL +) | 0.2 ml (10 %) | 1 | 26 +/-12 | 224 +/- 50 | N.D. | |

*NMUNIIZACIONES CADA 8 DIAS. PRIMERA INMUNIZACION CON ANTIGENO MEZCLADO CON ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND, EN LAS 2 SUBSIGUIENTES EL ANTIGENO SE RESUSPENDIO EN SOLUCION SALINA. LA BUSQUEDA DE CFP SE REALIZO UNA SEMANA DESPUES DE LA ULTIMA INMUNIZACION
N.D.= NO HAY DATOS

3) DETERMINACION DE ANTICUERPOS TOTALES Y DE ISOTIPOS EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS AMIBIANOS UTILIZANDO LA TECNICA DE INMUNO-DOT.

Debido a que no se detectó la presencia de células formadoras de anticuerpos en las placas de Peyer, se procedió a determinar si existía una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico haciendo la búsqueda de los mismos en el suero de ratones inmunizados con el antígeno de *E. histolytica* empleando para ello la técnica de Inmuno-dot.

3.1 DETERMINACION DE ANTICUERPOS TOTALES Y DE ISOTIPOS EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTIGENOS AMIBIANOS POR VIA ORAL UTILIZANDO LA TECNICA DE INMUNO-DOT.

En la fig. 3 se muestran los resultados del Inmuno-dot. Del pozo A1 al A8 corresponde a los sueros del ratón 1 obtenidos después de cada inmunización (ver apartado 7.1 de material y métodos), del pozo A9 al B2 corresponde a los sueros del ratón 2 obtenidos después de cada inmunización y así sucesivamente. El orden de los sueros fue el mismo para determinar los diferentes isotipos. Se observa la presencia de anticuerpos anti-amiba. Analizando la respuesta de isotipos observamos que se presenta principalmente una respuesta de tipo IgM .

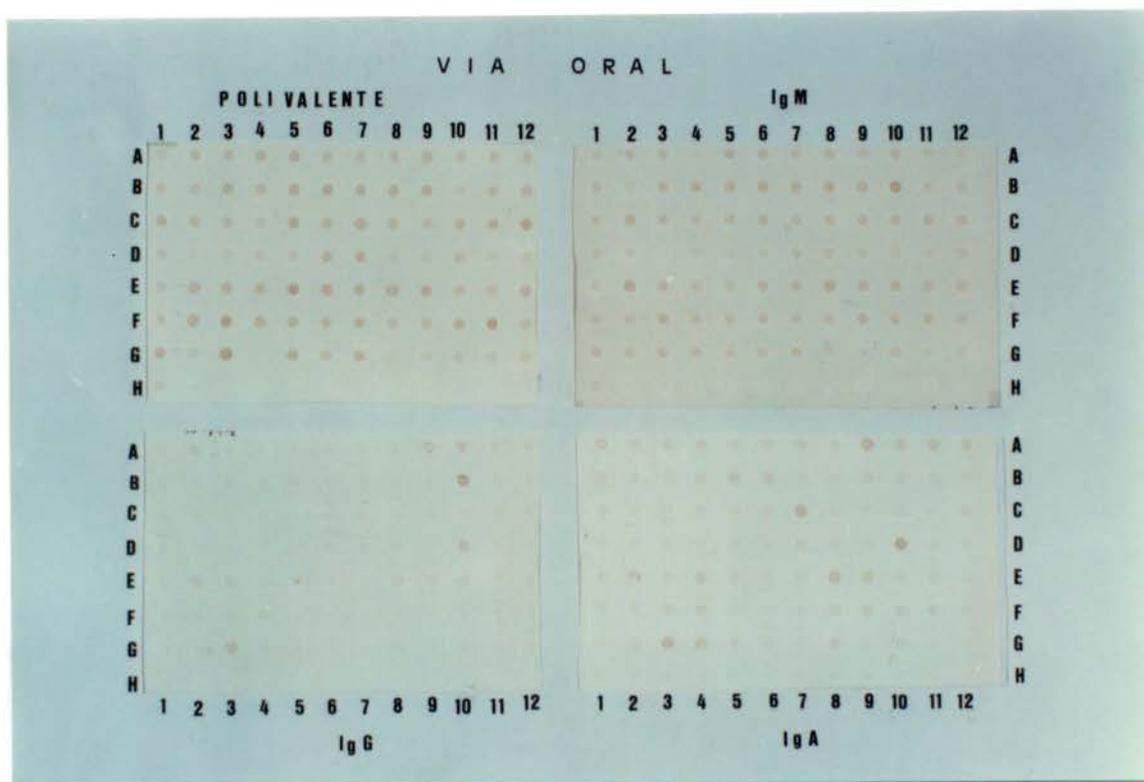


Figura 3: Resultados de Inmuno-dot en ratones inmunizados por vía oral con antígenos de *E. histolytica*

3.2 DETERMINACION DE LA RESPUESTA DE ISOTIPOS DE LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS EN RATONES INMUNIZADOS POR VIA INTRAPERITONEAL CON ANTIGENOS AMBIANOS POR LA TECNICA DE INMUNO-DOT.

3.3 DETECCION DE ANTICUERPOS anti-AMIBA EN RATONES INMUNIZADOS POR VIA ORAL CON EXTRACTOS DE E. histolytica UTILIZANDO UNA TECNICA INMUNOENZIMATICA (ELISA).

En la figura 5 se puede observar un aumento en la producción de anticuerpos totales dirigidos contra E. histolytica en ratones inmunizados por la vía oral. Esta respuesta es principalmente de tipo IgM encontrándose que hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los valores basales y los obtenidos después de las inmunizaciones, también se observa un aumento con diferencia significativa ($p < 0.05$) para IgG y aunque para IgA no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$), los títulos de anticuerpos presentan una tendencia a aumentar conforme se incrementa el número de inmunizaciones.

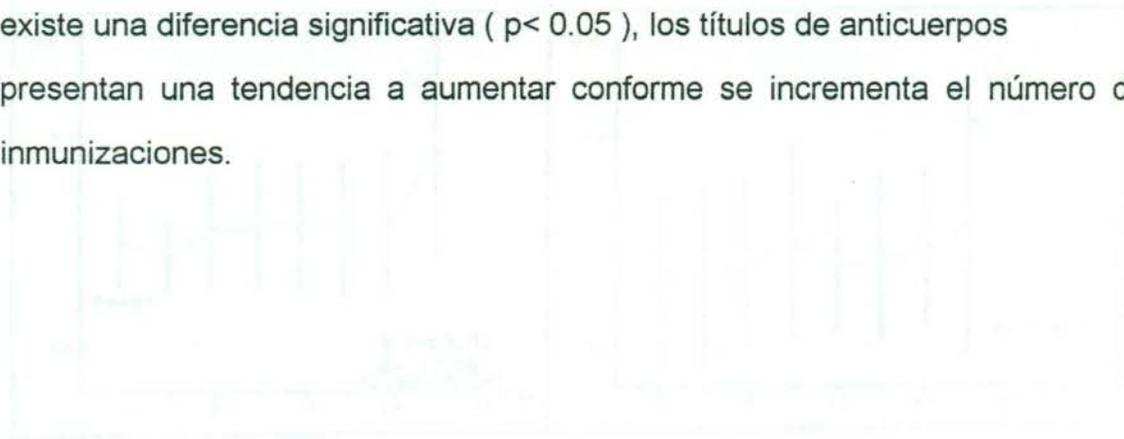


Figura 5: Niveles de anticuerpos dirigidos contra E. histolytica en ratones inmunizados por vía oral. Los niveles se midieron por ELISA. Como prueba de significancia se utilizó una prueba de t con corrección de Bonferroni y se muestran los intervalos de confianza del 95%.

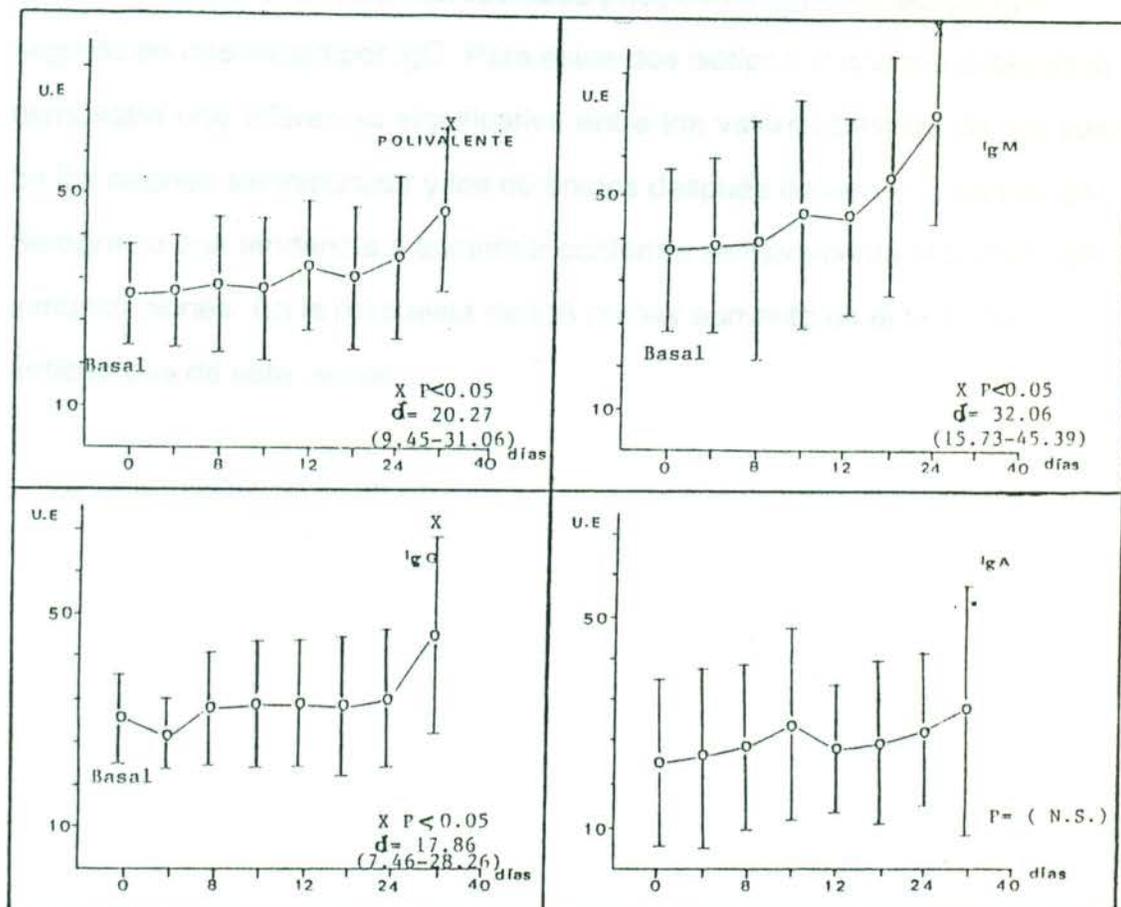


Figura 5: Isotipos de anticuerpos dirigidos contra *E. histolytica* en inmunizados por vía oral, detectados por ELISA. Comparación múltiple con prueba de t con corrección de Bonferroni $p < 0.05$. Intervalos de confianza del 95%.

En la figura 6 se puede apreciar que en los ratones inmunizados por vía intraperitoneal existe un franco aumento en los niveles de inmunoglobulinas totales, este aumento está representado principalmente por el isotipo IgM, seguido en intensidad por IgG. Para estos dos isotipos el análisis estadístico demuestra una diferencia significativa entre los valores basales de los sueros de los ratones sin inmunizar y los obtenidos después de las inmunizaciones. Se aprecia una tendencia a aumentar conforme se incrementa el número de inmunizaciones. En la respuesta de IgA no hay aumento en el título de anticuerpos de este isotipo.



Figura 6. Títulos de anticuerpos (log) contra *E. histolytica* en ratones inmunizados por vía intraperitoneal detectados por ELISA. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre los valores basales y los obtenidos después de las inmunizaciones.

La figura 6 muestra un análisis comparativo de las respuestas de anticuerpos totales y de los isótipos de anticuerpos (anticuerpos intraperitoneales y séricos), y se puede observar que el aumento, sobre todo de IgM en los días 45 y 60, entre los dos grupos.

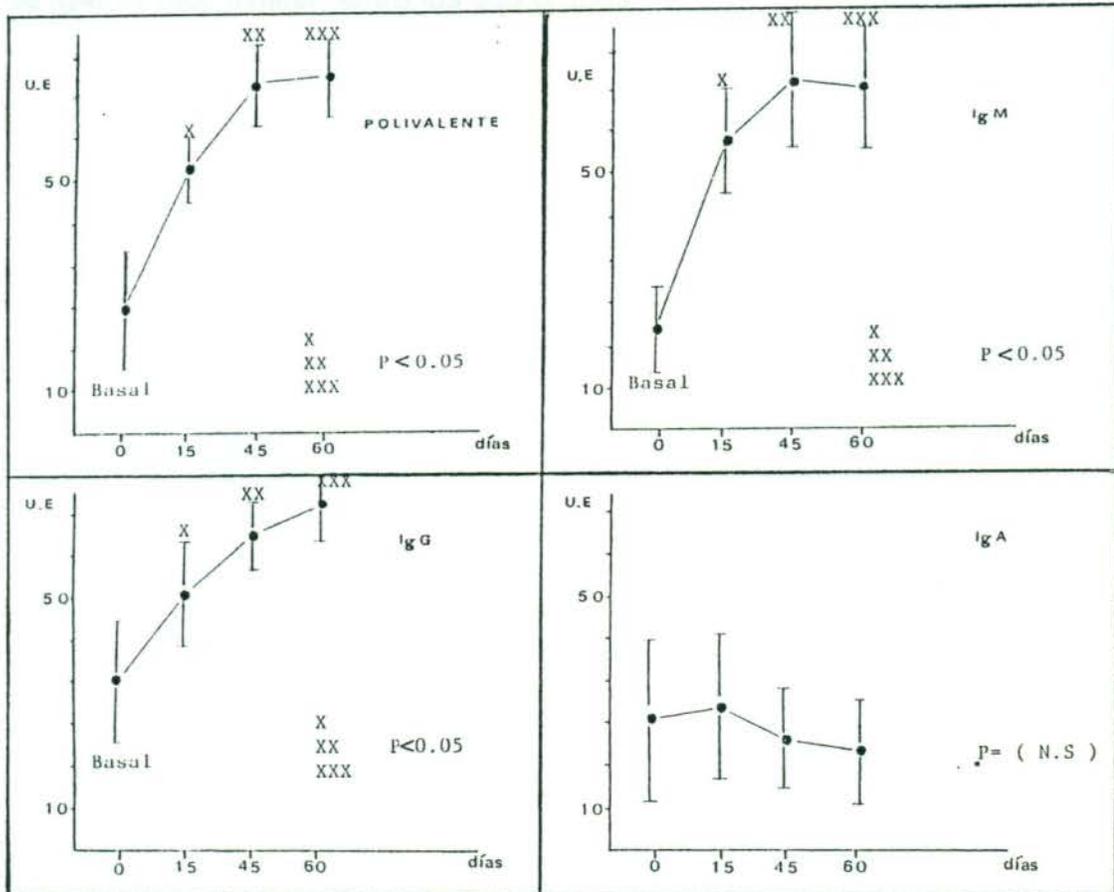


Figura 6: Isotipos de anticuerpos dirigidos contra *E. histolytica* en ratones inmunizados por vía intraperitoneal detectados por ELISA. Comparación múltiple con corrección de Bonferroni.

La figura 7 nos muestra un análisis comparativo de las respuestas de anticuerpos totales y de IgM en los dos grupos de ratones (inmunizaciones intraperitoneales y vía oral), y se puede observar que el aumento, sobre todo de IgM es muy similar entre los dos grupos.



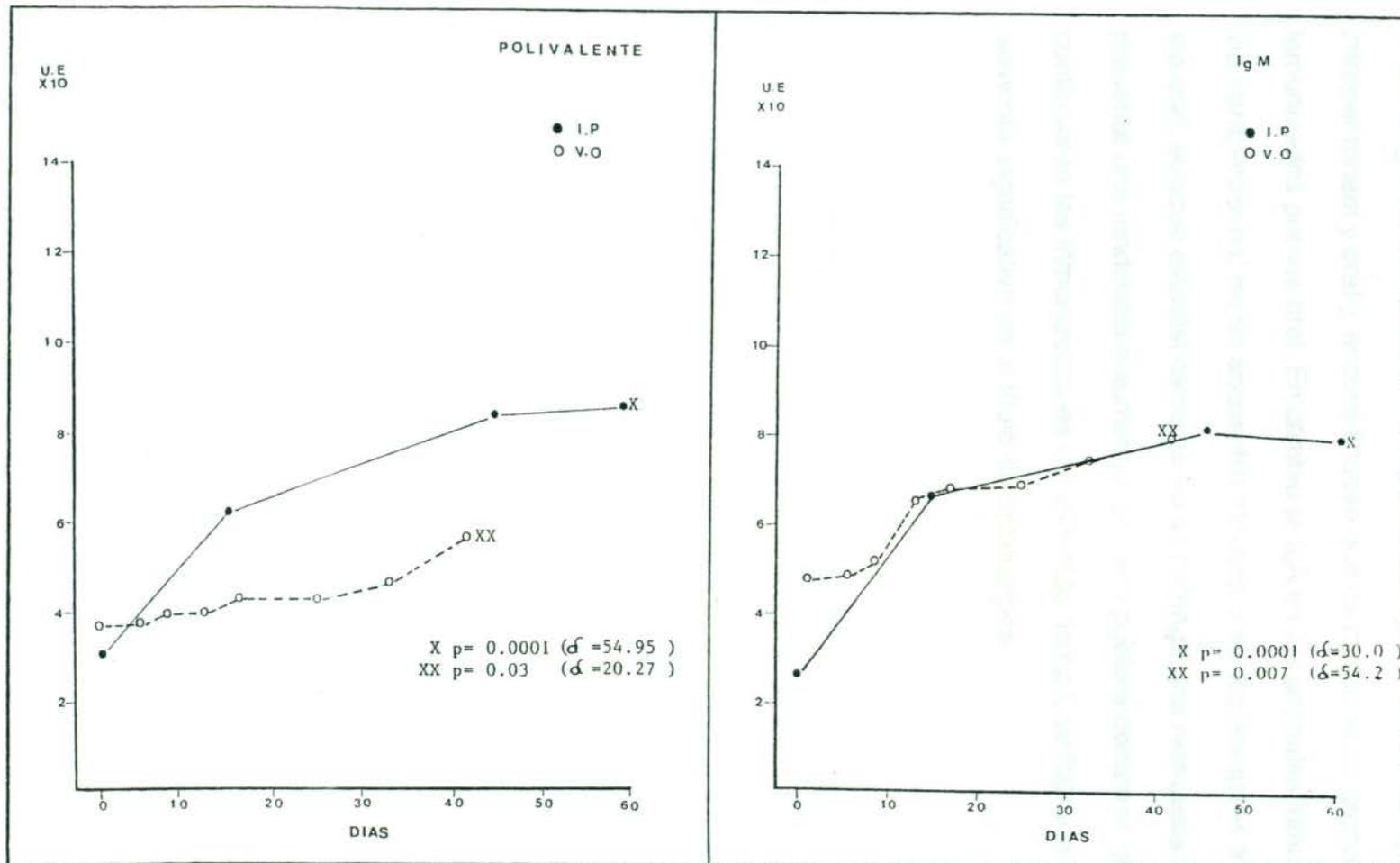


Figura 7: Comparación de respuesta de isotipos de anticuerpos dirigidos contra E. histolytica en ratones inmunizados por vía oral e intraperitoneal detectados por ELISA. Análisis de Varianza.

En la figura 8 se compara la respuesta de IgG entre los dos grupos (intraperitoneal y oral), encontrándose que es menor en el grupo de animales inmunizados por vía oral. En cambio la IgA en los animales inmunizados por vía intraperitoneal no se encuentra elevada y en los animales inmunizados por vía oral, aunque estadísticamente no se obtenga una respuesta significativa , presenta una tendencia a aumentar, por ello pudiera pensarse que, si se continuaran las inmunizaciones durante más tiempo, se lograría obtener un aumento significativo en el título de anticuerpos.

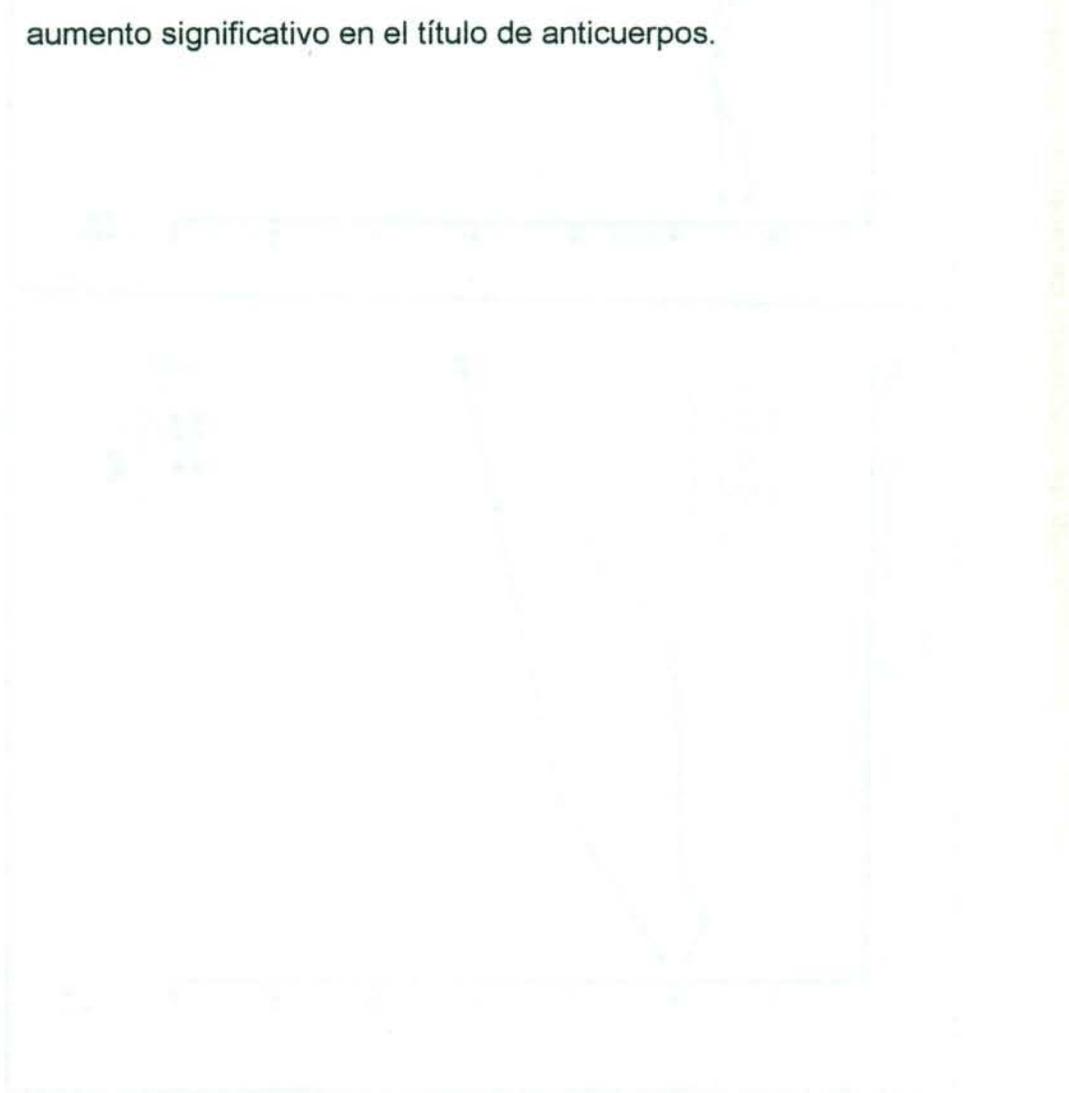


Fig. 8. Respuesta de anticuerpos de IgG e IgA en ratones inmunizados por vía intraperitoneal y oral. El análisis estadístico se realizó con el método de Varianza.

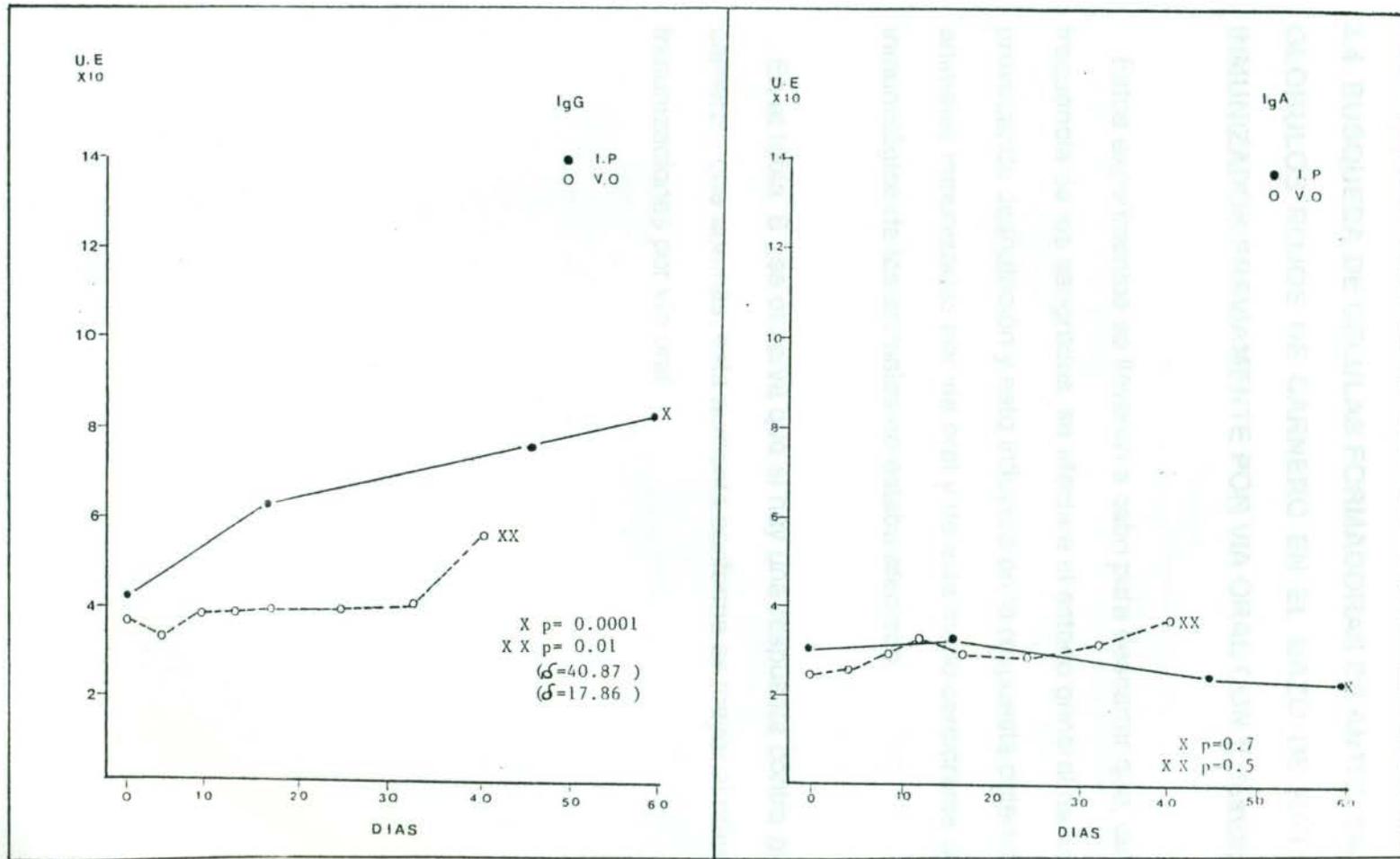


Figura 8: Comparación de respuesta de isotipos de anticuerpos dirigidos contra *E. histolytica* en ratones inmunizados por vía oral e intraperitoneal detectados por ELISA. Análisis de Varianza.

3.4 BUSQUEDA DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS anti- GLOBULOS ROJOS DE CARNERO EN EL BAZO DE RATONES BALB/c. INMUNIZADOS PREVIAMENTE POR VIA ORAL CON E. histolytica.

Estos experimentos se llevaron a cabo para descartar que, debido a la frecuencia de los sangrados, se afectara el estado general de los ratones provocando desnutrición y esto influyera en la respuesta obtenida en los animales inmunizados por vía oral y de este modo cerciorarse de que el estado inmunológico de los animales no estaba afectado.

En la tabla 8 , se observa que sí hay una respuesta contra glóbulos rojos de carnero y que además, ésta aumenta conforme es mayor el número de inmunizaciones por vía oral.

Tabla 8

**BUSQUEDA DE CFP CONTRA GRC EN BAZO DE RATONES
PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON *E. histolytica* POR VIA ORAL**

| INMUNIZACIONES CON <i>E. histolytica</i> (V.O.) | INMUNIZACION CON GRC 10 % (I. P.) | CFA (X 10 ⁶) IgM |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 | 613 +/- 173 |
| 2 | 1 | 980 +/- 170 |
| 4 | 1 | 1101 +/- 165 |
| 6 | 1 | 1407 +/- 167 |
| 8 | 1 | INCONTABLES |
| 10 | 1 | INCONTABLES |

SANGRADOS ANTES DE CADA INMUNIZACION. LAS CELULAS DE BAZO SE OBTUVIERON 4 DIAS DESPUES DE LA INMUNIZACION CON GRC. EL SISTEMA INDICADOR INCLUYE GRC SIN SENSIBILIZAR.

V. DISCUSION

Brandtzaeg y Strobel mencionan que, al administrar un antígeno por la vía oral se puede inducir tolerancia o supresión del sistema inmune contribuyendo esto a la sobrevivencia de la especie, y que cuando esta condición se rompe se induce una respuesta de hipersensibilidad y esto puede ser nocivo para la salud del individuo.(120, 121). Sin embargo, sujetos asintomáticos que residen en zonas endémicas de amibiasis y que se encuentran constantemente expuestos a los antígenos de E. histolytica, presentan anticuerpos en circulación dirigidos contra las amibas (4, 9, 10), lo que sugiere que no existe tolerancia hacia los antígenos amibianos presentados por vía entérica.

En este trabajo, al administrar el antígeno de E. histolytica por la vía oral podrían haberse presentado dos situaciones, 1) que se generara supresión o tolerancia (102-106, 108), 2) que se indujera una estimulación manifestada con la formación de anticuerpos (78, 79, 98, 109, 111). La velocidad de tránsito intestinal y el tiempo de absorción en el intestino del ratón pueden afectar la respuesta hacia los antígenos presentados por vía entérica.

Al estudiar en el presente trabajo la velocidad del tránsito intestinal del ratón, demostramos que a los 25 minutos el colorante administrado se localizó a nivel del

segundo tercio del intestino delgado. Estos datos coinciden con otros obtenidos en estudios sobre productos que afectan la movilidad intestinal y donde se hicieron estudios en ratones administrando partículas de carbón por vía intragástrica para ser utilizados como control interno. Ramaswami y col. en 1992 (91) y Ali y col. en 1993 (92), localizaron el carbón administrado, en el tracto gastrointestinal, observando que en el intestino delgado el carbón había avanzado un 60 % a los 20 minutos y un 70 % a los 30 minutos. A nuestro conocimiento no se han documentado estudios similares hechos con tiempos de tránsito más prolongados en ratones, por lo cual no disponemos de parámetros para una comparación después de los 30 minutos.

Los estudios realizados por Swarbrick y col. en 1979 (124) con Ovoalbúmina (Ova) iodinada y por Peng y col. en 1990 (118) también con Ova , demuestran que, de 2 a 5 minutos después de administrado, el antígeno se encontró en circulación y que el pico de máxima absorción se registró a los 60 minutos de la administración. La Ova es un antígeno soluble que puede ser absorbido fácilmente y aunque los antígenos amibianos se administraron en forma particulada, los resultados obtenidos en nuestros experimentos de tránsito intestinal sugieren que el antígeno permanece en el intestino el tiempo suficiente para: 1) estar en contacto con el tejido linfoide de la mucosa intestinal y 2) ser absorbido pasando a la circulación linfática y/o sanguínea.

Al buscar células formadoras de anticuerpos en las placas de Peyer de

animales inmunizados por la vía oral no fue posible detectarlas. Sin embargo, en los resultados mostrados en este trabajo se demuestra que se tomaron todas las precauciones y se verificaron cada uno de los parámetros que podrían influir en los ensayos de CFA. El hecho de no encontrar CFA en placas de Peyer nos podría sugerir una posible inducción de tolerancia o supresión de la respuesta dirigida contra los antígenos amibianos administrados por vía oral. Campos-Rodríguez y col. (43), observaron que al inmunizar directamente en placas de Peyer con antígenos amibianos particulados, no encontraban células formadoras de anticuerpos (CFA) en las placas de Peyer, también Velkamp y col. (125) obtuvieron resultados similares al inmunizar ratones por vía oral con Vibrio cholerae, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Por otra parte Moreno-Fierros y col. (69, 70), inmunizando por vía oral con trofozoítos de E. histolytica fijados con glutaraldehído, reportaron la presencia de CFA en placas de Peyer utilizando una técnica de Elispot. Sin embargo , de acuerdo con la circulación celular del tejido linfoide asociado a intestino, sabemos que las células plasmáticas productoras de anticuerpos se localizan en la lámina propia del intestino y podría considerarse que probablemente, al tomar el tejido de las placas de Peyer estuviera contaminado con tejido de lámina propia, dando resultados positivos debido a la alta sensibilidad de la técnica utilizada por estos investigadores ya que esta utiliza un sistema de amplificación para detectar los anticuerpos presentes.

Al no encontrar células formadoras de anticuerpos al inmunizar por vía oral se hicieron inmunizaciones por vía intraperitoneal con los antígenos amibianos. Se quiso saber si con el tratamiento que se le estaba dando al extracto amibiano este

conservaba sus propiedades inmunogénicas, por lo que se decidió probar inmunizando ratones por vía intraperitoneal. Los ratones inmunizados de esta manera respondieron formando anticuerpos, los cuales se detectaron al buscar células formadoras de anticuerpos en bazo.

Un dato experimental que nos llamó mucho la atención fue que al inmunizar ratones por vía intraperitoneal con glóbulos rojos de carnero y que previamente habían sido inmunizados por vía oral con antígenos amibianos, se encontró que, conforme era mayor el número de inmunizaciones con antígenos amibianos por vía oral, aumentaba el número de CFA contra glóbulos rojos de carnero. Se ha encontrado que diversos antígenos inducen activación policlonal (76, 126), y que antígenos amibianos poseen cierta capacidad inmunomoduladora (127 - 129). De acuerdo con los resultados obtenidos nosotros proponemos que se indujo una activación policlonal con los antígenos amibianos administrados por vía oral incluyendo células productoras de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en los glóbulos rojos de carnero o que se estén generando anticuerpos contra polisacáridos que dan reacción cruzada con glóbulos rojos de carnero.

Debido a que no se detectaron células formadoras de anticuerpos en las placas de Peyer, se procedió a determinar la existencia de una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico. Para ello se inmunizaron ratones por vía oral y ratones por vía intraperitoneal con antígenos de E. histolytica y se buscaron anticuerpos en el suero, para ello se empleó la técnica de Inmuno-dot y , como esta técnica es

puramente cualitativa, se decidió efectuar un análisis cuantitativo estandarizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

En nuestro modelo, la respuesta tan importante de IgM detectada por Inmuno-dot y por ELISA en ratones inmunizados por vía oral, podría sugerir que se tratara de una respuesta timoindependiente; sin embargo, el hecho de obtener una respuesta de IgG al inmunizar por vía intraperitoneal con el mismo antígeno de E. histolytica va en contra de esta explicación ya que es una respuesta característica hacia antígenos timodependientes (71, 76).

En este trabajo se encontró una menor respuesta de IgA que de IgM aunque la estimulación a nivel del tracto gastrointestinal genera la producción de IgA. Una posible explicación es que debido a la circulación de las células productoras de IgA y de la circulación de ésta hacia mucosas, no sea posible detectarla a nivel sistémico al ser desviada hacia secreciones. Sin embargo en este trabajo se propone que la respuesta de IgA, podría incrementarse si se aumentara el número de inmunizaciones ya que la curva presenta una tendencia a ir en aumento. Esto mismo puede aplicarse a la respuesta de IgG.

Se podría suponer que las enzimas pancreáticas degradaran el antígeno y que debido a ello la respuesta de IgA obtenida fuera tan débil, sin embargo si esto hubiera ocurrido, entonces no se habría observado una respuesta tan importante de IgM e IgG.

Es conocido que las personas que residen en zonas endémicas de amibiasis presentan elevación en los títulos de anticuerpos dirigidos contra las amibas. Esto debido a que, al estar frecuentemente expuesto el sistema inmune de la mucosa del tracto gastrointestinal a los antígenos amibianos estos se absorben y generan una respuesta inmune a nivel sistémico.

En un estudio realizado por nuestro equipo, el Dr. Víctor López V. determinó niveles de anticuerpos anti-*E. histolytica* por ELISA en el suero de sujetos sanos. Se encontró que presentaron anticuerpos anti-antígenos amibianos y al realizar el análisis de los isotipos producidos se determinó que la respuesta fue principalmente del isotipo IgG seguida en intensidad por una respuesta de IgM y una respuesta mucho menor de IgA. Podría esperarse que la respuesta de IgA fuera más evidente en los sueros de individuos de zonas endémicas de amibiasis. Sin embargo es probable que la IgA sea desviada hacia la mucosa intestinal donde se reacciona con los antígenos amibianos que se encuentran presentes en el intestino continuamente.

Al inmunizar los ratones por vía oral nosotros encontramos que la respuesta generada hacia los antígenos amibianos fue principalmente del isotipo IgM, seguida en intensidad por una respuesta de IgG y poca respuesta de IgA. Respecto a la respuesta de IgG y de IgA, estas muestran una tendencia a ir en aumento, lo que sugiere que si se continuara inmunizando durante un período de tiempo más prolongado, los niveles de anticuerpos aumentarían, pudiendo la IgG alcanzar concentraciones iguales o mayores de IgM.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por el Dr. López-Villarreal demostramos que es posible inducir una respuesta sistémica de anticuerpos al administrar los antígenos amibianos por la vía oral, lo cual es similar a lo observado en los individuos que habitan en zonas endémicas y se encuentran expuestos frecuentemente a los antígenos amibianos (4, 9, 10).

Perspectivas:

El implementar un modelo de inmunización por la vía oral con antígenos amibianos permitirá ampliar el estudio de la respuesta inmune generada contra E. histolytica haciendo posible:

- 1) Estudiar la respuesta contra antígenos específicos de E. histolytica presentados al sistema inmune por vía oral.
- 2) Se permitirá también el estudio de la participación de las células del sistema inmune en las respuesta contra E. histolytica inducida por vía oral utilizando cepas de ratones con deficiencias inmunológicas.
- 3) Estudiar la posibilidad de inducir protección administrando antígenos de E. histolytica en modelos animales de amibiasis invasiva.

CONCLUSIONES

1) El colorante utilizado en la determinación de la velocidad de tránsito intestinal permanece en el intestino el tiempo suficiente para entrar en contacto con el sistema inmune gastrointestinal con lo que indirectamente se puede inferir que el antígeno que se administró para los ensayos de búsqueda de células formadoras de anticuerpos , Inmuno-dot y ELISA , permanece en el intestino el tiempo necesario para estar en contacto con el sistema inmune.

2) No se encontraron células formadoras de placas en placas de Peyer ni en bazo de ratones inmunizados por vía oral pero sí en bazo de ratones inmunizados por vía intraperitoneal.

3) Se logró confirmar la hipótesis de trabajo , al lograr inducir una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico en ratones BALB/c inmunizados por vía oral con extracto crudo de Entamoeba histolytica. Se comprobó por este hecho que en los ratones BALB/c inmunizados por esta vía no se induce tolerancia hacia estos antígenos.

4) La respuesta sistémica de anticuerpos dirigidos contra E. histolytica en ratones inmunizados por vía oral se demostró por Inmuno-dot y por ELISA encontrándose que:

a) La respuesta es predominantemente del isotipo IgM seguida en intensidad por una respuesta de IgG. Estas diferencias son estadísticamente significativas.

b) Para todos los isotipos existe una tendencia a aumentar sobre todo después de la octava inmunización, siendo más evidente para el isotipo IgM.

5) La respuesta obtenida por vía intraperitoneal es principalmente de tipo IgM aumentando después de la primera inmunización, seguida en intensidad por IgG la que también presenta una tendencia a aumentar conforme se incrementa el número de inmunizaciones. Estas diferencias son estadísticamente significativas. No se encontró un aumento en la respuesta de IgA.

6) En ratones inmunizados por vía oral con E. histolytica y que posteriormente fueron inmunizados con una sola dosis de glóbulos rojos de carnero, se observó un aumento en la respuesta de células formadoras de anticuerpos IgM dirigidos contra glóbulos rojos de carnero, encontrándose que esta respuesta aumentó en forma directamente proporcional al número de inmunizaciones por vía oral con el antígeno amibiano.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guerrant, R. 1986. The global problem of amebiasis: current status , research needs and opportunities for progress. Rev. Infect. Dis. 8 (2):218-227.
- 2.- Meerovitch, E., and Chadee, K. Immune response in parasitic infections. Vol. IV Protozoan, arthropods and invertebrates. pp. 82-95.
- 3.- Ortíz-Ortíz, L. 1994. Parasitic infections and the immune system. Academic Press. San Diego, Cal. USA.
- 4.- Trissl, D. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. 4 (6):1154- 1184.
- 5.- Walsh, J.A. 1986. Problems on recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8 (2):228-238.
- 6.- Walsh, J.A. 1986. Amebiasis in the world. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl.):385-389.
- 7.- Gutiérrez, G. 1986. Epidemiología y control de la amibiasis en México. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl.):375
- 8.- Kagan, I.G. 1974. Patogenicity of E. histolytica. Arch. Invest. Méd. 5 (Supl. 2):457-464.
- 9.- Martínez-Palomo, A. 1986. Amebiasis. Human parasitic Disease. Vol. 2. pp.12-38.

- 10.- Martínez-Palomo, A. 1989. Amibiasis. Editorial Panamericana.
- 11.- Bruckner, D.A. 1992. Amebiasis. Clin. Microbiol. Rev. 5 (4):356-369.
- 12.- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved of the pathogenesis of the amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4 (6):1185-1202.
- 13.- Lee-Ramos, A.F., González-Montesinos, F. 1970. Pronóstico en la amibiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Méd. 1 (Supl.):s199-s204.
- 14.- Castro, H.F. 1974. Anatomic and pathological findings in amebiasis, report of 320 cases. C.A. Padilla y Padilla and G.M. Padilla Ed. Amebiasis in Man. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. pp.44-68.
- 15.- Abioye, A.A. 1973. Fatal amoebic colitis in pregnancy and puerperium: a new clinico-pathological entity. J. Trop. Med. Hyg. 76:97-100.
- 16.- Mirelman, D. 1987. Ameba-bacterium relationship in amebiasis. Microbiol. Rev. 51 (2):272-284.
- 17.- Vinayak, V.K., Chitkara, N.L., and Chhutani, P.N. 1979. Effect of corticosteroid and irradiation on caecal amoebic infection in rats. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 73 (3):266-268.
- 18.- Singh, B.N., Srivastava, R.V.N., and Dutta, G.P. 1971. Virulence of strains of Entamoeba histolytica to rat and the effect of cholesterol, rat caecal, and hamster liver passage on the virulence of non invasive strains. Indian J. Exp. Biol. 9 (1):21-27.
- 19.- Castro-Garza, J.E. 1992. Actividad citolítica de Entamoeba histolytica dependiente del potencial de óxido-reducción. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- 20.- Arellano, J., Miranda, R., Isibasi, A., Higuera, F., and Kretschmer, R. 1986. HLA and amebic abscess of the liver. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl.):287-289.
- 21.- Arellano, J., Granados, J., Pérez, E., Félix, C., Kretschmer, R.R. 1990. HLA, complotipos y absceso hepático amibiano en mestizos mexicanos. Arch. Invest. Méd. 21 (Supl. 1):11-14.
- 22.- Saíd-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J. 1986. Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl.):173-178.
- 23.- Gitler, C., and Mirelman, D. 1986. Factors contributing to the pathogenic behavior of Entamoeba histolytica. Ann. Rev. Microbiol. 40:237-261.
- 24.- Petri Jr., W.A., Snodgrass, T.L., Chadee, K., and Chapman, M.D. 1989. Monoclonal antibodies directed against the galactose-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica inhibit and enhance amebic adherence. Clin. Res. 37(2).
- 25.- Talamás-Rohana, P., and Meza, I. 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. J. Cell. Biol. 106:1787-1794.
- 26.- Petri Jr., W.A., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F., and Ravdin, J.I. 1987. Recognition of the galactose or N-acetilgalactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. Infect. Immun. 55 (10):2327-2331.
- 27.- Petri Jr., W.A. 1991. Invasive amebiasis and the galactose-specific of Entamoeba histolytica. ASM News 57 (6):299-306.

- 28.- Petri Jr., W.A., Clark, C.G., and Diamond, L.S. 1994. Host-parasite relationships in amebiasis: conference report. *J. Infect. Dis.* 169:483-484.
- 29.- Calderón, J., Muñoz, M.L., and Acosta, H.M. 1980. Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 11:s241- s244.
- 30.- Phillips, B.P. 1973. Concurrent irreversible loss of infectivity/pathogenicity and encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture in vitro. *Exp. parasitol.* 34:163-167.
- 31.- Diamond, L.S., Phillips, B.P., and Bartgis, L.L. 1974. A comparison of the virulence of the nine strains of axenically cultivated *E. histolytica* in hamster liver. *Arch. Invest. Méd.* 5 (Supl.2):423-426.
- 32.- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.B., and Pittman, F.E. 1978. Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *E. histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:248-254.
- 33.- Diamond, L.S. 1968. Thecnics of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* like amoebae. *J. Parasitol.* 54:1047-1056.
- 34.- Diamond, L.S. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431-432.
- 35.- Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B., Navarro-Marmolejo, L., Lozano- Garza, G., Martínez-Rodríguez, H. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Arch. Invest. Méd.* 82:249-253.

- 36.- Thompson, M.D. 1926. Experimental amoebiasis in rabbit. Univ. Calif. Publ. Zool. 29:9-23.
- 37.- Tobie, J.E. 1949. Experimental infection of rabbit with Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. 29:859-870.
- 38.- Faubert, G.M., Meerovitch, E., and Mc Laughlin, J. 1978. The presence of liver auto-antibodies induced by Entamoeba histolytica in the sera from both naturally infected humans and immunized rabbits. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:892-896.
- 39.- Haq, A., Sharma, A., Ahmad, S., Khan, H.M., and Khan, N. 1985. Experimental infection of Rhesus monkeys with Entamoeba histolytica mimics human infection. Lab. Anim. Sci. 35 (5):481-484.
- 40.- Tobie, J.E. 1940. Pathogenicity of "carrier" strains of Entamoeba histolytica in the experimental dog. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45:691-693.
- 41.- Jones, W.R. 1946. The experimental infection of rats with Entamoeba histolytica with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Ann. Trop. Med. Parasitol. 40:130-140.
- 42.- Owen, D.G. 1984. Attempts at oral infection of rats and mice with trophozoites of Entamoeba histolytica. 78:160- 164.
- 43.- Campos- Rodríguez, R., Andrade, P., Acosta, A.G., Barranco-T., C., Isibasi-A., A., Kumate-R., J. 1986. Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl.):277-282.

- 44.- Neal, R.A. 1983. Experimental amoebiasis and the development of anti-amoebic compounds. *Parasitology*. **86**:175-191.
- 45.- Carrera, G.M., and Faust, E.C. 1949. Susceptibility of the guinea pig to Entamoeba histolytica of human origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29** (5-6):647-667.
- 46.- Kaushik, S.P., Ravindra, N., and Vinayak, V.K. 1977. Amebic granuloma. An experimental study. *Am. J. Gastroenterol.* **68**:64-70.
- 47.- Taylor, D.J., Greenberg, J., Highman, B., and Coatney, R. 1950. Experimental infection of guinea pig with Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**:817-828.
- 48.- Phillips, B.P. 1964. Studies on the ameba relationship in amoebiasis III. Induced amebic lesions in the germfree guinea pig. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **13** (1-3):391-395.
- 49.- Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Guerrero, A., y Solís, G. 1973. Inmunidad en hamsters consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de E. histolytica. *Arch. Invest. Méd.* **4** (Supl.1):s159-s164.
- 50.- Mattern, C.F.T., and Keister, D.B. 1977. Experimental amoebiasis. II. Hepatic amoebiasis in the newborn hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26** (3):402-411.
- 51.- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.B., and Pittman, F.E. 1978. Effect of the hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27** (2):248-254.
- 52.- Ghadirian, E., and Meerovitch, E. 1978. Behavior of axenic IP-106 strain of Entamoeba histolytica in the golden hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27** (2):241-247.

- 53.- Gold, D., Norman, L.G., Maddison, S.E., and Kagan, I. 1978. Immunologic studies on hamsters infected with Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64 (5):866-873.
- 54.- Capin, R., Capin, N.R., Carmona, M., and Ortíz-Ortíz, L. 1980. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Méd. 11 (Supl.1):173-180.
- 55.- Norman, L., Gold, D., and Kagan, I. 1979. The serologic response of hamster to experimental liver inoculation with Entamoeba histolytica as measured by indirect hemagglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. 28 (2):198-205.
- 56.- Martínez-Palomo, A., Tanimoto-Weki, M., Tena-Betancourt, E. 1980. Evolución de las lesiones producidas en hamsters por inoculación de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. 11 (Supl.1):169-172.
- 57.- Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., González-Robles, A. 1985. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of Entamoeba histolytica. 34 (4):723-730.
- 58.- Chadee, K., and Meerovitch, E. 1984. The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:47-54.
- 59.- Petri Jr., W.A., Snodgrass, T.L., Murphy, C.F., Ravdin, J.I. 1989. Immunization of gerbils with the galactose-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica prevents amebic liver abscess. Clin. Res. 37 (2).
- 60.- Gold, D., and Kagan, I.G. 1978. Susceptibility of various strains of mice to Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 64 (5):937-938.

- 61.- Stern, J.J., Graybill, J.R., and Drutz, D.J. 1984. Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33** (3):372-380.
- 62.- Owen, D.G. 1985. A mouse model for Entamoeba histolytica infection. *Laboratory animals.* **19**:297-304.
- 63.- Ghadirian, E., Pelletier, M., Konshavn, P.A.L. 1987. Course of Entamoeba histolytica infection in nude mice. *Trop. Med. Parasitol.* **38**:153-156.
- 64.- Bhol, K.C., Mukherjee, R.M., Mehra, S., Maitra, T.K., Jalan, K.N. 1989. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:346-348.
- 65.- Denis, M., and Chadee, K. 1989. Murine T-cells clones against Entamoeba histolytica: in vivo and in vitro characterization. *Immunology* **66**:76-82.
- 66.- Gold, D. 1989. Delayed-type hypersensitivity to Entamoeba histolytica in mice and hamsters: a comparison. *Parasitol. Res.* **75**:335-342.
- 67.- Anaya-Velázquez, F., and Underdown, B.J. 1990. Early expression in mice of genetic resistance to intestinal amebiasis. *Arch. Invest. Méd.* **21** (Supl.1):53-56.
- 68.- Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., and Enríquez-Rincón, F. 1992. Sex differences in systemic and local immune responses to Entamoeba histolytica after intra peritoneal and rectal immunization in BALB/c mice. *Arch. Med. Res.* **23** (2):153-155.
- 69.- Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., and Enríquez-Rincón, F. 1992. Kinetics of the anti-amebic antibody producing cells response in Peyer's

- patches and spleen after both local and systemic stimulation in BALB/c mice. Arch. Med. Res. 23 (2):165-168.
- 70.- Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., and Enríquez-Rincón, F. 1994. ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered Entamoeba histolytica antigen in mice. Arch. Invest. Med. 25 (2):183-187.
- 71.- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. 1988. 2nd. ed. Harper and Row publishers, New York, Canada, Cambridge, St. Louis, Sn. Francisco. J.B. Lippincot Company, Philadelphia. Gower Medical Publishing, London-New York. pp. 3.1-3.10.
- 72.- Aguirre-Cruz, L., y López-Revilla, R. 1990. Inmunidad Intestinal. Editorial Trillas. pp. 1-60.
73. - Acosta-Altamirano, G., Cruz-López, M. 1992. Inmunología de las mucosas. Atelier Producciones, S.A. de C.V. pp.91-204.
74. - Targan, S.R., Kagnoff, M.F., Brogan, M.D., and Shanahan, F. 1987. Immunologic mechanisms in intestinal diseases. Ann. Int. Med. 106:853-870.
- 75.- Dobbins, W.O. III. 1982. Gut immunophysiology: gastroenterologist's view with emphasis on pathophysiology. Am. J. Physiol. 242:G1-G8.
- 76.- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 1994. 2nd ed. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Co. Advision of Hartcourt Brace and Company. pp.209-214.
- 77.- Potten, C.S., and Loeffler, M. 1987. A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. J. theor. Biol. 127:381-391.

- 78.- Korenaga, M., Wang, R.G., Zhu, D.B., and Ahmad, A. 1989. Intestinal immunity to *Trichinella spiralis* is a property of OX8- OXX22- T-helpers cells that are generated in the intestine. *66*:588-594.
- 79.- Veldkamp, J., van der Gaag, R., and Willers, J.M.N. 1973. The role of Peyer's patches cells in antibody formation. *Immunology*. *25*:761
- 80.- Senda, S., Cheng, E., and Kawanishi, H. 1989. IgG in murine intestinal secretions. Agging effect and possible physiological role. *Scand. J. Immunol.* *29*:41-47.
- 81.- Mahida, Y.R., Patel, S., and Jewell, D.P. 1989. Mononuclear phagocyte system of human Peyer's patches: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* *75*:82-86.
- 82.- Ventura-Juárez, J., González-Pérez, S., Jaramillo-Luna, R.A., Campos-Rodríguez, R. 1990. Mastocitos en placas de Peyer de ratón. *Arch. Invest. Méd.* *21*:139-143.
- 83.- Guillón, J. 1981. Where do mucosal mast cells acquire gE ?. *Immunology Today*. (3):80-81.
- 84.- Hay, J.B. 1989. The ins and outs of lymphocyte traffic. Peyer's patches. Sandorama 1989/1. Sandoz LTD. Basle, Switzerland. pp.15-18.
- 85.- Playfair, J.H.L. 1989. General and basic mechanisms. *Current opinion in immunology*. *1*:475-479.
- 86.- Mazanec, M.B., Nerud, J.G., Liang, X., and Lamm, M.E. 1989. Transport of serum IgA into murine respiratory secretions and it's implications for immunization strategies. *J. Immunol.* *142* (12):4275-4281.

- 87.- Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E. 1993. A three-tiered view of the role IgA in mucosal defense. *Immunology Today* 14 (9):430-435.
- 88.- Haaijman, J.J., and Hijmans, W. 1978. Influence of age on the immunological activity and capacity of the CBA mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*. 3:375-398.
- 89.- Marshall, J.C., Christow, N.V., and Meakins, J.L. 1988. Immunomodulation by altered gastrointestinal tract flora. *Arch. Surg.* 123:1465-1469.
- 90.- Hara, H., Nishikawa, H., and Kiriya, S. 1992. Different effects of casein and soybean protein on gastric emptying of protein and small intestinal transit after spontaneous feeding of diets in rats. *Brit. J. Nutr.* 68:59-66.
- 91.- Ramaswamy, S., Srinivasan, D., Bapna, J.S. 1992. Inhibition of tetrahydroxazolo-pyridin-3-ol and mucimol and its mechanisms on gastrointestinal transit in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 220:147-149.
- 92.- Ali, B.H., and Bashir, A.A. 1993. The effect of α -2 adrenoceptor agonist and antagonists on gastrointestinal transit in mice: Influence of morphine, castor oil and glucose. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 20:1-6.
- 93.- Nagata, M., and Osumi, Y. 1993. Central α -2 adrenoceptor-mediated inhibition of gastric motility in rats. *Life Sci.* 62:329-330.
- 94.- Quijano, R.F., Ohnishi, N., Umeda, K., Komada, F., Iwakawa, S., and Okumura, K. 1993. Effect of atropine on gastrointestinal motility and bioavailability of a cyclosporine A in rats. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Therap.* 21 (1):141-143.

- 95.- McGee, D.W., and McMurray, D.N. 1988. The effect of protein malnutrition on the IgA immune response in mice. *Immunology*. 63:25-29.
- 96.- McGee, D.W., and McMurray, D.N. 1988. Protein malnutrition reduces the IgA response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T-cell functions. *Immunology* 64:697-702.
- 97.- McMurray, D.N., Mintzer, C.L., Bartow, R.A., and Parr, R.L. 1989. Dietary protein deficiency and *Mycobacterium bovis* BCG affect Interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 57 (9):2606-2611.
- 98.- Wicker, L.S., Katz, M., Sercarz, E.E., and Miller, A. 1984. Immunodominant protein epitopes. I. Induction of suppression to hen egg white lysozyme is obliterated by removal of the first three N-terminal amino acids. *Eur. J. Immunol.* 14:442-447.
- 99.- Domen, P.L., Muckerheide, A., and Michael, J.G. 1987. Cationization of protein antigens. III. Abrogation of oral tolerance. *J. Immunol.* 139:3195-3198.
- 100.- Skogh, T., Eskild, W., Sundqvist, T., and Berg, T. 1988. Elimination kinetics of circulating antigens and immune complexes: II. Hepatic and extrahepatic elimination of chemically modified albumin preparations in relation to their non-specific physicochemical properties. *J. Clin. Lab. Immunol.* 27:13-17.
- 101.- Jacobs, M.J.M., van der Hoek, A.E.M., van de Putte, L.B.A., and van den Berg, W.B. 1993. Aberrant tolerance induction with cationic antigens. *Scan J. Immunol.* 37:97-103.
- 102.- Ngan, J., and Kind, L.S. 1978. Suppressor T-cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. Immunol.* 120 (3):861-865.

- 103.- Richman, L.K., Chiller, J.M., Brown, W.R., Hanson, D.G., and Vaz, N.M. 1978. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J. Immunol.* 121 (6):2429-2434.
- 104.- Lamont, A.G., Bruce, M.G., Watret, K.C., and Ferguson, A. 1988. Suppression of an established DTH response to ovalbumin in mice by feeding antigen after immunization. *Immunology* 64:135-139.
- 105.- Parish, N.M., Roitt, I.M., and Cooke, A. 1988. Phenotypic characteristics of cell involved in induced suppression to murine experimental autoimmune thyroiditis. *Eur. J.Immunol.* 18:1463-1467.
- 106.- Lider, O., Santos, L.M.B., Lee, C.S.Y., Higgins, P.J., and Weiner, H.L. 1989. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T Lymphocytes. *J.Immunol.* 142:748-752.
- 107.- Gesualdo, L., Lamm, M.E., and Emancipator, S.N. 1990. Deffective oral tolerance promotes nephritogenesis in experimental IgA nephropathy induced by oral immunization. *J.Immunol.* 145:3684-3691.
- 108.- Zhang, Z.J., Lee, C.S.Y., Lider, O., and Weiner, H. 1990. Suppression of adjuvant arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *J. Immunol.* 145:2489- 2493.
- 109.- Heeseman, J., Schroder, J., and Ulrich, M. 1988. Analysis of the class-specific immune response to *Yersinia enterocolitica* virulence-associated

- antigens in oro-gastrically infected rabbits. *Microbial Pathogenesis* 5:437-447.
- 110.- Czerkinsky, C., Nilsson, L., and Ouchterlony, Ö. 1989. Kinetics and isotype distribution of parasite-specific antibody responses in the spleen of mice during primary infection with *Schistosoma mansoni*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88:280-287.
- 111.- Pedoussaut, S., Delmas, A., Milhaud, G., Rivaille, P., and Gruaz-Guyon, A. 1989. Oral immunization with a free peptide from cholera toxin: local protection and IgA production. *Molecular Immunology.* 26 (2):115-119.
- 112.- Sugita-Konishi, Y., Smart, C.J., and Trejdosiewickz, L.K. 1992. Regulation of intestinal immunoglobulin production in response to dietary ovalbumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98:64-69.
- 113.- O'Hagan, D.T., Palin, K., Davis, S.S., Artusson, P., Sjöholm, I. 1989. Microparticles as potentially orally active immunological adjuvants. *Vaccine.* 7:421-424.
- 114.- Mowat, A.M., and Donachie, A.M. 1991. ISCOMS- a novel strategy for mucosal immunization? *Immunology Today* 12 (11):383-385.
- 115.- Mowat, A.M., Donachie, A.M., Reid, G., and Jarret, O. 1991. Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes *in vivo* and are immunogenic by the oral route. *Immunology.* 72:317-322.
- 116.- Challacombe, S.J., Rahman, D., Jeffery, H., Davis, S.S., and O'Hagan, D.T. 1992. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after

- oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. *Immunology*. 76:164-168.
- 117.- Peng, H.J., Turner, M.W., and Strobel, S. 1989. The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology*. 67:425-430.
- 118.- Peng, H.J., Turner, M.W., and Strobel, S. 1990. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin. exp. Immunol.* 81:510-515.
- 119.- Enomoto, A., Konishi, M., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. 1993. Milk whey protein fed as a constituent of the diet induced both oral tolerance and a systemic humoral response, while heat-denatured whey protein induced only oral tolerance. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66 (2):136-142.
- 120.- Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Hvatum, M., Kvale, D., and Scott, H. 1993. The serologic and mucosal immunologic basis of celiac disease. *Immunophysiology of the gut. Bristol-Myers Squibb/Mead Johnson Nutrition Symposia. Academic Press.* pp. 295-333.
- 121.- Strobel, S. 1993. Food allergy. Role of mucosal immune regulation and oral tolerance: facts, fiction, and hypotheses. *Immunophysiology of the gut. Bristol-Myers Squibb/Mead Johnson Nutrition Symposia. Academic Press.* pp. 336-371.
- 122.- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72:248-254.

- 123.- Cunningham, A.J., and Szenberg, A. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*. 14:599.
- 124.- Swarbrick, E.T., Stokes, C.R., and Soothill, J.F. 1979. Absorption of antigens after oral immunisation and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut*. 20:121-125.
- 125.- Veldkamp, J., van der Gaag, R., and Willers, J.M.N. 1973. The role of the Peyer's patch cells in antibody formation. *Immunology* 25:761-771.
- 126.- Capron, A., and Camus, D. 1979. Immunoregulation by parasite extracts. Springer Semin. Immunopathol. 2:69- 77.
- 127.- Diamanstein, T., Klos, M., Gold, D., and Hahn, H. 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 126:2084-2086.
- 128.- Savanat, T., Viriyanond, P., and Nimotmongkol, N. 1973b. Blast transformation of lymphocytes in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22:705-710.
- 129.- Segovia, E., Capin, R., and Landa, L. 1980. Transformación blastoide de linfocitos estimulados con antígeno lisosomal en pacientes con amibiasis intestinal. *Arch. Invest. Méd.* 11:s225-s228.