

11261

2
20/

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**“*E.histolytica*: CITOTOXICIDAD CELULAR MEDIADA
POR ANTICUERPOS IgA”.**

T E S I S

Que para obtener el grado de
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(ESPECIALIDAD INMUNOLOGIA)**

P R E S E N T A:

BIOLOGA ANABELL ALVARADO NAVARRO

DIRECTORA DE TESIS: DRA.CECILIA XIMENEZ GARCIA

273657

México, D.F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA

DEDICO ESTE TRABAJO CON MUCHO CARIÑO:

A mis padres por su apoyo, amor y comprensión

A mis hermanos Carlos, Edith e Ileana

A mis amigas Miriam y Paty que me ayudaron siempre con sus consejos y apoyo incondicional.

A Marisela por su paciencia y comprensión

A todas las personas que me acompañaron durante este proceso.

AGRADEZCO:

A la Dra. Cecilia Ximénez G. por su apoyo y asesoría durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Emma I. Melendro, por su valiosa participación.

A todo los compañeros del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM que me brindaron su amistad y apoyo.

A Enrique González Rivas, por su paciencia y amistad

A Malena por el manuscrito de ésta tesis y sobre todo por su compañerismo

A Don Rafa que a lo largo de todo este proceso conté con su ayuda desinteresada

A los compañeros del Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología, de la Universidad de Guadalajara por su comprensión y apoyo.

Al Dr. Alfonso Islas por su apoyo al inicio de este trabajo

Y muy en especial un profundo agradecimiento a la Dra. Mary Fafutis M. por su desinteresado apoyo gracias al cual fué posible la terminación de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	6
ABREVIACIONES UTILIZADAS EN EL TEXTO	7
INTRODUCCION	9
Antecedentes	9
Biología de <i>E.histolytica</i>	11
Mecanismos de transmisión	13
Diferencias entre cepas patógenas y no patógenas	14
Epidemiología	16
Tejido linfóide asociado a mucosas (MALT)	19
Características de la respuesta de anticuerpos en la amibiasis	23
Seroepidemiología de la amibiasis	25
Papel de la IgA en la mucosa intestinal	25
Respuesta inmune celular contra <i>E.histolytica</i>	27
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
OBJETIVOS	36
MATERIAL Y METODOS	37
RESULTADOS	45
DISCUSION Y CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	54

RESUMEN

La amibiasis es la parasitosis intestinal causada por *E.histolytica* cuyo órgano blanco es el intestino grueso. La adherencia de los trofozoítos a las células epiteliales del colon es uno de los eventos determinantes en el desarrollo de lesiones invasoras en el huésped, y al menos en sistemas *in vitro* e *in situ* la adherencia de trofozoítos de amiba a tejidos y células blanco es inhibido por la presencia de IgA anti-*E.histolytica*.

En otros modelos de infecciones gastrointestinales la IgA parece participar en la eliminación de microorganismos patógenos a través de fenómenos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Por lo que el objetivo del presente trabajo fué investigar si dichos fenómenos participan en la inmunidad protectora contra *E.histolytica*.

Para ello, se utilizaron como células efectoras; esplenocitos, células de ganglios mesentéricos y de placas de Peyer de ratones BALB/c inmunizados con el parásito y como testigo células linfoides de animales no tratados, los experimentos se realizaron en presencia o no de IgA monoclonal anti-amiba, además de los controles adecuados.

Los resultados obtenidos se expresaron en valores del índice de citotoxicidad sobre trofozoítos de *E.histolytica* HMI:IMSS; la viabilidad se evaluó por medio del método de exclusión por Azul Tripano.

Los resultados indican que la sensibilización *in vivo* y la presencia de anticuerpos anti-amibianos en suero y fluido intestinal hiperinmune pueden incrementar considerablemente la capacidad citotóxica de las células linfoides.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
AHA	Absceso Hepático Amibiano
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
CN	Citotoxicidad Natual
Cs	Componente secretor
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DO	Densidad Optica
Fc	Fracción Cristalizable
GALT	Tejido Linfoide Asociado a Intestino
IL	Interleucina
ILR	Receptor de Interleucina
IELs	Linfocitos Intraepiteliales
IP	Intraperitoneal
IG	Intragástrica
Ig	Inmunoglobulina
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
K	Asesina
LP	Lámina Propria
LPG	Lipofosfoglicano
LPPG	Lipopéptidoglicano
M	Molar
MAD CAM-1	Moléculas de Adhesión Celular Adhesina de Mucosa Tipo 1.
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad

mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Militros
mM	Mili Molar
MNC	Células Mononucleares
μ	Micras
μm	Micrómetros
NK	Asesinas Naturales
nm	Nanómetros
NP	No Patógena
P	Patógena
PBS	Solución Amortiguadora Salina de Fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
PP	Placas de Peyer
ppm	Partes por millón
RFc	Receptor de Fc
R	Rectal
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
TCR	Receptor de células T
TGFβ	Factor Transformador de Crecimiento Beta

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

La amibiasis es la infección humana causada por el protozoo denominado *Entamoeba histolytica*. Existen reportes en México que datan del siglo XVIII en los que se describe una enfermedad caracterizada por obstrucciones inflamatorias del hígado, compatibles con el absceso hepático amibiano (1,2). En 1875 Fedor Aleksandrovich Lösch (3) publicó un artículo titulado “Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso”, denominando al agente infectante, por él descubierto, como *Ameba coli* por haberlo encontrado en el colon. En 1886 Robert Koch durante su estancia en Egipto estudió cinco casos de disentería, dos de ellos complicados con absceso hepático, encontró amibas no solamente en ulceraciones, sino que además pudo observar que éstas se ubicaban en la profundidad de las ulceraciones intestinales, en los abscesos hepáticos, incluso llegó a advertirlas en las paredes y en los capilares del absceso. Koch fué el primero en observar al parásito en preparaciones teñidas (4). De todas las investigaciones la de mas trascendencia fué la publicada por William Councilman y Henri LaFleur en 1891 (5) quienes reconocieron a la amibiasis como una entidad patológica definida ocasionada por un germen específico al que llamaron *Ameba dysenteriae*, convencidos de que ese nombre era más apropiado, ya que el síntoma principal es la disentería. En 1893 publicaron en Europa, Quincke y Ross (6) la existencia de otra especie de amiba distinta de la patógena, hasta entonces conocida, llegaron a demostrar experimentalmente que dicha amiba no era capaz de producir lesiones. Esta especie corresponde a lo que hoy conocemos como *E. coli*. Es en 1903 cuando Shaudinn denomina a la especie patógena con el nombre de *Entamoeba histolytica* (7).

Estudios posteriores acerca de este parásito llevaron a los investigadores a encontrar otras especies de amibas (8). Es en 1913 cuando Kuenen y Swellingrebel (9) informaron que la *E. histolytica* tiene tres fases en su ciclo de vida: la invasora propiamente dicha, la comensal o minuta y la quística tetrágena. Paralelamente se hizo

un importante progreso principalmente en las técnicas para cultivar amibas en medios monoxénicos (10), los primeros intentos estuvieron a cargo de Musgrave y Clegg en 1904, en medios con agar y sangre que contenían una sola especie de bacterias (10). En 1925 Boeck y Drbohlav diseñaron un medio donde la amiba se desarrolló fácilmente aunque en asociación con bacterias (11).

Además Brumpt acuñó el término de *E. dispar* para la *Entamoeba* avirulenta o no patógena descrita por algunos parasitólogos (12).

En 1928 Dobell describió el ciclo biológico de la *E. histolytica* en el humano y monos (13). Para 1930 Cleveland y Sanders describieron amibas multinucleadas con duplicación por fisión y su enquistamiento, especularon sobre la producción de esporozoítos y el proceso de enquistamiento (14). Además hubo un importante adelanto en el desarrollo de técnicas para demostrar la presencia de amibas en heces. En 1938 Faust desarrolló la importante técnica de sulfato de zinc, con el propósito de concentrar las amibas de la materia fecal (15). Diez años más tarde Ritchie introdujo la técnica de sedimentación con éter (16).

Finalmente en 1961 Diamond (17) desarrolló el cultivo axénico de amibas lo que permitió modernos estudios sobre *E. histolytica* e incrementó el conocimiento en la biología de este parásito, en 1968 comunicó la forma de producirla masivamente (18). En ese mismo año Thompson y col. prepararon y estandarizaron la técnica para la obtención de antígenos amibianos provenientes de este tipo de cultivo. El material antigénico así obtenido es heterogéneo y está formado por varios compuestos de diversa naturaleza química tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Esta mezcla de antígenos recibió el nombre de histolisina. La definición de los antígenos de amiba se hizo a partir de los estudios hechos con trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en medios axénicos (19).

El diagnóstico de la enfermedad amibiana llegaba a tener un alto grado de dificultad a pesar de los descubrimientos realizados y es a partir de 1914 que se introdujeron varias pruebas serológicas orientadas al diagnóstico de la amibiasis invasora. Izar encontró una reacción de fijación de complemento, mediante el empleo

como antígeno de un extracto acuoso de heces que contenían el parásito (20). Mas tarde Craig utilizaría extractos alcohólicos, en tanto Stone empleaba antígenos obtenidos de lavado de quistes (21). En 1942 Rees logró un indudable progreso al encontrar una reacción de fijación de complemento con antígenos de *E. histolytica*, cultivada en un medio con una sola especie bacteriana (22). Finalmente en 1970 Morris y Elsdon Dew introdujeron la prueba de aglutinación del látex (23).

BIOLOGIA DE *E. histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* carece de estadio sexual y hospederos intermedios, oscilando entre dos formas diferentes: el quiste infectivo y el trofozoíto vegetativo (24) este último con un diámetro de 20 a 40 μm , que es la fase móvil e invasiva, el cual produce necrosis en diversos tejidos (24). Tradicionalmente se ha aceptado que se divide por fisión binaria. Sin embargo, en *E. histolytica* han sido descritos cuatro estadios en su división nuclear, de acuerdo a la forma nuclear (25), y al movimiento de los microtúbulos (26) Profase, Metafase, Anafase A, B y Telofase. Todos los estudios realizados sobre la división nuclear reconocieron que ocurría sin rompimiento de la membrana nuclear (13). Se sabe muy poco acerca del número exacto de cromosomas y la regulación de la expresión de genes en éste protozooario (27). Los trofozoítos poseen un único núcleo aunque no es raro encontrar amibas con diferente número de núcleos, el significado no está claro, pero parece que la división nuclear no está acoplada a la división celular (28), los trofozoítos frecuentemente se observan con eritrocitos ingeridos, algunas veces con leucocitos o bacterias, son ricos en glicógeno, con ribosomas agregados en hélices las cuales se agregan para formar barras alargadas con extremos redondeados (cuerpos cromatoides), carecen de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico bien desarrollado (29). Por otro lado, se ha observado que el núcleo tiene poros nucleares y estructura laminar que mide de 4 a 7 μm en diámetro, consistiendo de una delicada membrana acromática (29), además poseen una estructura similar al nucleosoma (29). Los estudios citoquímicos y la incorporación de precursores

radioactivos revelaron una posible compartimentalización temporal de los ácidos nucleicos en el núcleo (30), también se ha observado cromatina periférica cerca de la membrana nuclear, pulsos de marcaje con ^3H -timidina y ^3H -uridina mostraron que esta zona contiene ADN y que es rica en síntesis de ARN (31). Se ha propuesto esta zona como el equivalente funcional del nucleolo de otros eucariotes. En la parte central del núcleo hay una estructura denominada endosoma, en donde el ADN se encuentra más concentrado (32).

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una cubierta externa o glicocálix de la cual se han aislado y parcialmente caracterizado dos glicolípidos: un lipofosfoglicano (LPG) y un lipopéptidoglicano (LPPG) (33), por debajo de ésta se encuentra la membrana plasmática de aproximadamente 10 nm de espesor. Se han identificado además la presencia de lectinas, carbohidratos, lípidos (34) y proteínas como antígenos de superficie, actualmente la identificación y purificación de los antígenos de superficie se ha facilitado por el uso de anticuerpos monoclonales específicos (35). Se ha observado que la lectina (Gal/GalNac) la cual reconoce N y O-oligosacárido (36), no sólo media la adherencia a una serie de células blanco sino también participa en la actividad citolítica e inhibe la activación del complejo de ataque a membrana C5b-9 del complemento humano (37). Además tiene similitud en la secuencia y en la reactividad antigénica cruzada con CD59, un inhibidor del complejo de ataque de membrana (MAC) en eritrocitos humanos. Flores-Romo y col. 1994 (38) observaron que la cepa virulenta HM1-IMSS: contenía una molécula similar al CD59 al detectarlo con anticuerpos monoclonales antihumanos CD59 de rata. En otro estudio Gutiérrez-Kobeh y col. 1997 (39) propusieron que la resistencia adquirida al complemento es debido a la incorporación y uso de moléculas reguladoras de complemento del hospedero, tomando en cuenta que los trofozoítos de la cepa patógena al invadir la mucosa intestinal están en contacto directo con componentes de la sangre del hospedero la cual contiene éstas moléculas reguladoras, explicándose de esta manera la adquisición de dichos factores por las amibas. Además del reconocimiento de carbohidratos específicos por parte de las lectinas de la superficie de los trofozoítos, el contacto inicial y la subsecuente

destrucción de las células y tejido del hospedero por *E. histolytica* parecen requerir la mediación de ciertos tipos de receptores de superficie algunos de los cuales actuarán por ejemplo en el reconocimiento específico que los trofozoítos hacen de la colágena y que activan la secreción de colagenasa al medio externo (40). En el hábitat natural de los trofozoítos se podría pensar que la degradación de la matriz extracelular es una etapa necesaria en la invasión de la Lámina Propria (LP) que hacen los trofozoítos después de penetrar en la mucosa intestinal (41). Se encontró que la actina es la proteína mas abundante del citoesqueleto de los trofozoítos (42) constituyendo del 10 al 15 % de la proteína total en el trofozoito, requerida en el movimiento amiboideo (28) y en el mecanismo de redistribución de proteínas en la membrana (capping) con la participación de miosina (43, 44). Este parásito es una célula móvil capaz de ingerir una variedad de partículas incluyendo bacterias y eritrocitos y de destruir casi cualquier célula. Se mueve por la formación de pseudópodos sin microfilamentos aparentes, los microtúbulos son solamente observados durante la división nuclear (45). Además forma filópodos los cuales son proyecciones fagocíticas con vacuolas orientadas al exterior y a una región caudal uroide. La superficie de los trofozoítos es altamente activa con un notable intercambio de membrana. El capping inducido por anticuerpos es probablemente una manifestación de un mecanismo del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (45).

Su principal fuente de energía son los carbohidratos los cuales son incorporados a través de transportadores específicos. A pesar de la ausencia de mitocondrias, el trofozoito es capaz de crecer bajo condiciones aeróbicas, por arriba de 5% de oxígeno (46). Tanto los trofozoítos completos así como sus fracciones subcelulares tienen la capacidad de activar el complemento a través de las vías clásica y alterna (47), en la primera lo hacen mas vigorosamente e incluso en ausencia de anticuerpos (48).

El quiste maduro cuadrinucleado mide de 5 a 15 μ puede permanecer viable durante períodos prolongados y en diversas condiciones ambientales e inclusive resisten la acción del jugo gástrico y de las enzimas digestivas, según la temperatura y la

deseccación conservan su capacidad infectante en las heces, en el agua y en el suelo; hasta ocho días cuando la temperatura oscila entre 28° y 34° C y hasta un mes cuando baja a 10 °C; el quiste puede sobrevivir durante 45 min debajo de las uñas de las manos, sucumbiendo a la desecación después de 10 min sobre la superficie de las manos (49), es resistente a la acción del cloro en las cantidades que normalmente se usan para purificar el agua por lo que este procedimiento no previene las epidemias que se originan por la contaminación fecal de las redes de distribución, los quistes se destruyen cuando se exponen a 200 ppm de yodo, al ácido acético a temperatura superior a 68°C y se pueden remover por filtración con arena (49, 50).

MECANISMO DE TRANSMISION

La infección causada por este parásito puede ocurrir cuando el quiste maduro es ingerido en agua contaminada con heces de portadores, la transmisión de quistes también puede ser a través de insectos (51), de los hábitos higiénicos inadecuados (52, 53, 54), de los hábitos sexuales y del uso de materia fecal como fertilizante en algunos países asiáticos, éstos son también mecanismos importantes de transmisión de la amibas en países en desarrollo.

El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica* y epidemiológicamente el único importante, si bien se ha encontrado el parásito en algunos primates y experimentalmente se ha transmitido a diferentes especies de mamíferos, las principales fuentes emisoras de agentes infecciosos patógenos las constituyen los portadores sanos de cepas patógenas, sobre todo los convalescientes de alguna forma de enfermedad amibiana. Los enfermos solo eliminan trofozoítos en las fases iniciales del padecimiento (49, 55).

Los quistes se desenquistan en el intestino delgado para formar los trofozoítos, éstos se adhieren a la mucosa del colon para colonizar el intestino, entonces pueden invadir a través del epitelio intestinal, causar colitis o absceso hepático o formar quistes, los cuales son eliminados con las heces para iniciar un nuevo ciclo de infección (56). En el caso de invasión de la mucosa del intestino grueso, puede causar disentería amibiana,

absceso hepático, y menos frecuentemente afectar cerebro, piel, cartilago y hueso (24), lo que se conoce como amibiasis intestinal invasora. *E. histolytica* puede invadir exclusivamente epitelio intestinal lo cual requiere de tres pasos: 1) movimiento celular, 2) la unión a la célula blanco o a ciertas macromoléculas en la matriz extracelular por medio de lectinas y receptores y 3) la destrucción de macromoléculas como fibronectina, laminina y colágena, se ha propuesto que ocurre por una cascada proteolítica (57), involucrando serina proteasas (58), tiol proteinasas (59) y metaloproteinasas (60), las cuales degradan matriz extracelular y mucoproteínas, que desplazan células epiteliales y degradan membrana del basamento epitelial (57).

Además otro factor citotóxico el cual puede dañar directamente células o matriz extracelular es el factor formador de poro llamado “ameboporo” (61).

La mayoría de los individuos infectados por *E. histolytica* no desarrollan la enfermedad : el parásito vive y se multiplica en el intestino, aparentemente sin lesionar los tejidos . En condiciones naturales, la relación entre el número de portadores y el de enfermos varía considerablemente de una región a otra. La proporción de portadores es mas alta en países con endemia elevada.

DIFERENCIAS ENTRE CEPAS PATOGENAS Y NO PATOGENAS

En 1925 Brumpt (12) propuso la existencia de dos especies; una patógena (P) y otra no patógena (NP) tratando de explicar el amplio rango de síntomas clínicos en la enfermedad causada por *E. histolytica*, desde infección asintomática (correlacionada con cepas NP) a enfermedad sintomática que se manifiesta por disentería ligera o severa y enfermedad extraintestinal invasiva que amenaza la vida (relacionada con la cepa P). En 1970s Sargeant (62) revivió esta hipótesis al identificar distintos patrones de cuatro diferentes isoenzimas asociadas al metabolismo de carbohidratos (zimodemos) que se correlacionaron con la presencia de enfermedad sintomática. Se desarrolló otra hipótesis en la que se sugiere la existencia de mecanismos reguladores los cuales producen variabilidad en la expresión de genes involucrados en virulencia. En 1994 Orozco y col. (57) propusieron una nueva hipótesis para explicar la variación de *E. histolytica*

tomando en consideración que un trofozoíto puede generar individuos no idénticos, esto es que algunos de ellos pueden expresar el fenotipo invasivo y otros no. Esto descarta la existencia de dos especies de *E. histolytica* pero acepta la existencia de poblaciones de trofozoítos P y NP y asume la posibilidad de interconversión de población P a la NP y viceversa, basados en suficientes evidencias de variación clonal en cultivos de *E. histolytica* (63, 64). Diferentes clonas expresan diferente fenotipo incluyendo aquellos relacionados a virulencia (57).

Mackenstedt y col. en 1995 (65) realizaron un estudio en el que llevaron a cabo la diferenciación genética de las cepas de *E. histolytica* P y NP, los resultados coincidieron con la clasificación de las cepas basadas en el análisis de isoenzimas, siendo consistentes con el concepto de que representan dos especies diferentes.

Algunos grupos han descrito la interconversión de cepas NP a P bajo ciertas condiciones de cultivo de los trofozoítos (66, 67).

Finalmente el largo debate sobre si la diferencia se atribuye al hospedero o al parásito fué efectivamente aclarado en el Seminario de Amibiasis en 1992 y fué formalizado un año después por la distinción del parásito en dos especies diferentes, *E. histolytica* patógena *sensu stricto* y *E. dispar* comensal (29), basado en las divergencias bioquímicas, inmunológicas y genéticas analizadas que apoyan el concepto de dos especies de Brumpt (12).

Recientemente Moody y col. en 1995 (33) observaron una correlación directa entre la abundancia de los lipofosfoglicanos del glicocálix en diferentes cepas de amibas y su virulencia, al encontrar que una razón para la disminución en la virulencia es la pérdida de moléculas de LPG de superficie y que los procedimientos de restauración de virulencia causan la reaparición de los LPG de superficie. Actualmente se están realizando esfuerzos dirigidos a conocer la estructura de los LPG así como a identificar la vía biosintética de los mismos.

EPIDEMIOLOGIA

Las infecciones con parásitos, tales como protozoarios, helmintos y ectoparásitos actualmente cuentan con la mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra clase de organismos infecciosos particularmente en los países en desarrollo. Se estima que aproximadamente el 30% de la población del mundo sufre de infestaciones parasitarias, como es el caso de la malaria que afecta casi 250 millones de personas alrededor del mundo con aproximadamente 1 o 2 millones de muertes anualmente (68).

La amibiasis ha sido considerada como la tercera causa de morbilidad y mortalidad entre las enfermedades parasitarias en el mundo después de la malaria y schistosomiasis (69).

La amibiasis es endémica en India, Egipto, Turquía y México (22); de acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud la infección con *E. histolytica* está presente en aproximadamente 480 millones de individuos en el mundo (excepto China) (70), el 10 % de los cuales sufre de invasión tisular por el parásito (69, 70). Se estima que mueren anualmente de 40,000 a 110,000 personas por complicaciones intestinales y extraintestinales de amibiasis (4). Los síndromes que resultan de la infección por *E. histolytica* son: infección asintomática, infección sintomática no invasora y la forma invasora. Se le denomina invasora a la existencia de lesiones patológicas y manifestaciones clínicas intestinales y extraintestinales que ocurren debido a la presencia de factores del parásito y del hospedero que al presentarse en un mismo momento propician la aparición de la enfermedad, por lo que la amibiasis invasora es un estado potencialmente fatal (71). La mayoría de los individuos infectados por este protozoario (se calcula que llegan al 90%), son asintomáticos (72). El cuadro clínico de la enfermedad sintomática intestinal puede incluir desde dolor cólico abdominal bajo con diarrea ligera y llegar hasta la forma grave que se acompaña de fiebre alta y síndrome disentérico (indicativo de invasión de los tejidos), que está constituido por diarrea con sangre y moco, tenesmo rectal e intenso dolor cólico abdominal generalizado. Por otro lado, existen además tres formas clínicas de amibiasis intestinal grave: colitis fulminante, ameboma y apendicitis (73). La forma extraintestinal invasora de la

amibiasis es el absceso hepático, que es 10 veces más frecuente en adultos que en niños y de aquéllos, tres o cuatro veces más frecuente en los varones.

Existen otras formas de amibiasis extraintestinales menos comunes, pero en ocasiones muy graves y de difícil diagnóstico que son la cerebral, la pulmonar, la cutánea, y otras más raras como la uterina (74).

Los niños constituyen uno de los grupos más vulnerables a la enfermedad amibiana, en las comunidades donde esta enfermedad es endémica, son afectados en proporción semejante o mayor que la población adulta, observándose que la amibiasis intestinal es más frecuente en niños (75) y la letalidad en la forma diarreico-disentérica no complicada es menor al 1%, pero se incrementa cuando se complica con perforación intestinal y peritonitis (21.3 a 40.2%) (76). Mientras que el absceso hepático es más frecuente en adultos jóvenes, aunque afecta también a los niños que viven en áreas endémicas de amibiasis (75, 77). A nivel mundial se ha encontrado que el 10% de la población es portadora de *E. histolytica* (78). Sin embargo la prevalencia tiende a ser mayor en países tropicales y áreas rurales, con un rango del 2 al 60% (77). En México ha sido estimado que entre el 10 y el 20% de la población son portadores. Esta prevalencia se ve aumentada con la edad así como en las áreas rurales (77, 79), y es diferente comparada con otras poblaciones (80), éstas diferencias están seguramente determinadas por factores relacionados con: el parásito (patogenicidad, virulencia, inóculo), con el huésped (edad, sexo, embarazo, nutrición, estado inmunológico), y con el medio (uso de aguas negras, hábitos higiénicos) (81, 82). En México la infección y enfermedad amibianas son más frecuentes en los estratos socioeconómicos bajos, donde la desnutrición es prevalente.

En una serie de estudios necrópsicos realizados en un hospital de adultos en México en los años de 1963 a 1973, el 5.1% de 5,000 necropsias correspondió a casos de absceso hepático amibiano y en otro estudio comprendido en el período de 1973 a 1979, disminuyó al 2.2% de otras 5,000 necropsias (83). La letalidad por absceso hepático amibiano en hospitales de la Cd. de México se redujo gradualmente del 2.0% (en 1,333 casos de adultos) de 1963 a 1970 hasta el 0.2% (de 444 adultos estudiados) de 1975 a

1977 (84). De acuerdo a éstas cifras se obtuvo un estimado global de 500 millones de casos de amibiasis en 1984 con cerca de 40 millones de enfermos de amibiasis intestinal y más de 40,000 muertes causadas por *E. histolytica*.

En 1986 el Instituto Mexicano del Seguro Social trató 369,440 casos nuevos de amibiasis, así como 1922 casos de absceso hepático amibiano, encontrándose en las zonas rurales de México un porcentaje de mortalidad de aproximadamente 10.3% (85) mientras que en las series de la bibliografía anglosajona se reportó del 28.6% al 66.6%, (86).

De acuerdo al estudio epidemiológico realizado por Treviño García-Manzo y col. en México (1994), se encontró que la incidencia de amibiasis es mayor en los estados del sur del país que en los estados del norte, donde es cuatro veces menor que la encontrada por ejemplo en Chiapas o en Oaxaca (87). En las áreas rurales de Oaxaca se descubrió que más de un infante entre los 2 y 14 años de edad presentan quistes de *E. histolytica* en sus heces (88). Mientras que la incidencia de absceso hepático amibiano muestra una distribución más irregular con rangos más bajos en el noreste y sureste del país (85). Sin embargo, la mortalidad debida a la amibiasis no es congruente con lo mencionado en relación a la incidencia de la infección ya que en los estados del sur del país la mortalidad disminuye con respecto al resto del país (87).

Estudios clínicos realizados en México han demostrado que una tercera parte de los abscesos hepáticos durante la edad pediátrica han ocurrido en niños menores de 2 años de edad (89). La mortalidad por absceso hepático amibiano en niños se redujo dramáticamente mostrando una disminución desde 26.9% (en 67 casos de 1963-67) hasta 1.1% (de 89 casos de 1976 a 1985) (90). Esto puede deberse a los oportunos y eficientes servicios médicos con que se cuenta en algunas áreas del país.

La magnitud de este problema de salud pública es la razón principal del gran interés que ha surgido en el desarrollo de la inmunoparasitología como una distinta rama de la inmunología. Una característica fundamental de la mayoría de las infecciones parasitarias es su cronicidad; las razones para que esto ocurra son por una parte la débil inmunidad innata del hospedero y la habilidad de los parásitos para evadir o resistir la

respuesta inmune específica. La persistencia de parásitos en hospederos humanos también conduce a reacciones inmunológicas que son crónicas y pueden resultar en daño patológico del tejido también como en anomalías en la regulación inmune. Por lo tanto algunas de las consecuencias patológicas de infestaciones parasitarias son debido a la respuesta del hospedero y a la infección por sí misma (68).

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS (MALT)

Representa una barrera entre el medio externo e interno y es una importante línea de defensa, en el cual los linfocitos se encuentran agregados en tejidos, algunas de éstas colecciones se encuentran anatómicamente bien organizadas y tienen propiedades únicas. Localizadas debajo de la mucosa del tracto gastrointestinal y respiratorio son agregados de linfocitos y células accesorias que semejan nódulos linfoides en estructura y función. Estos agregados incluyen: placas de Peyer (PP), la Lámina Propria (LP) del intestino delgado, (éstos integran el tejido linfoide asociado a intestino GALT) (91), las amígdalas en la faringe y folículos linfoides submucosos en el apéndice y en las vías aéreas superiores (68).

La estructura mucosa puede ser dividida en zonas aferentes y eferentes. Dentro de la zona aferente están las áreas especializadas del intestino en el cual linfocitos T, B y macrófagos son referidos como agregados linfoides o PP, amígdalas y apéndice donde se captan antígenos capaces de iniciar respuestas inmunitarias (91).

Las PP son un conjunto de nódulos linfoides, localizados en la mucosa del intestino delgado, cada nódulo presenta un centro germinativo cercano a la *Muscularis mucosae* y un casquete o corona en contacto con el epitelio; se distribuyen a lo largo del intestino desde el duodeno hasta el íleon, tienen localización antimesentérica y se forman durante el último tercio de vida embrionaria. El epitelio intestinal que los recubre es de tipo plano con escasas microvellosidades formado por células planas denominadas "M" en las cuales al microscopio electrónico se observan pequeñas vesículas intracitoplásmicas que transportan sustancias de la luz intestinal hacia los folículos linfoides iniciando una respuesta inmunitaria (91), de manera que el antígeno es

transportado dentro de los compartimentos linfoides mucosos donde los macrófagos por pinocitosis procesan y presentan el antígeno sobre su superficie celular. Estos agregados inducen la respuesta de células T y B disparando su activación celular y liberación de citocinas (IL-1, TGF β , IL-6, IL-5) dentro de las PP (92). Estas citocinas participan en la activación de células B de la mucosa para la producción de anticuerpos del isotipo IgA que predomina en las secreciones intestinales (93). Después de la activación y diferenciación las células T y/o B migran de las PP hacia los ganglios mesentéricos (94), linfa y sangre periférica, las células blastoides luego circulan a través del ducto torácico regresando a la circulación y por interacciones de ligandos específicos (95) se unen y cruzan el epitelio para llegar a la LP de la mucosa intestinal para llevar a cabo su función efectora (96). Se ha postulado que el fenómeno de recirculación y residencia de linfocitos a sitios mucosos, es favorecido por la presencia de vénulas con endotelio alto que presentan receptores para moléculas de superficie de ciertos linfocitos (91).

En la rama eferente de la mucosa existen dos compartimentos: La LP y el compartimento intraepitelial, capaces de producir inmunoglobulinas, en particular de la clase IgA y de proporcionar inmunidad mediada por células.

La LP (área no organizada), capaz de producir una respuesta inflamatoria, incluye células NK, linfocitos T y B, macrófagos, eosinófilos, células cebadas, células endoteliales, fibroblastos tisulares, células de músculo liso y células epiteliales (97). La LP es el sitio de la mucosa intestinal donde los precursores de linfocitos B migran para diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA e IgE. En humanos los linfocitos B constituyen el 37% de la población total de leucocitos en la mucosa intestinal, mientras que en la sangre periférica existe en un 15%. Los linfocitos T se localizan en la mucosa intestinal únicamente después de un reto antigénico. En humanos el 69% son linfocitos T CD4⁺ y el 31% CD8⁺, siendo más abundantes ambas poblaciones celulares en el intestino delgado que en el grueso (91).

La proximidad de éstas células con otras permite interacciones potencialmente múltiples entre tipos celulares. El hecho de que la mayoría de células T dentro de la LP

estén activadas y sean del fenotipo de memoria, hace este compartimento uno en el cual hay elevados niveles de citocinas inducibles comparado con otros compartimentos (68).

Los linfocitos intraepiteliales (IELs) residen en el espacio paracelular entre células epiteliales, la mayoría de los IELs expresan una integrina $\alpha\epsilon\beta7$ recientemente descubierta (CD103) cuya expresión es conocida y parece estar regulada por TGF- β 1. Los IELs se adhieren a células epiteliales a través de adhesión heterotípica entre CD103 y la cadherina E de las células epiteliales. Se demostró que CD103 además de funcionar como una molécula de adhesión funciona también como una molécula capaz de transducir señales de activación a IELs vía substrato de tirosin-cinasa. El tráfico de linfocitos en las mucosas está regulado por una serie de receptores y ligandos que están localizados sobre linfocitos y vénulas con endotelios altos, la molécula 1 de adhesión celular adhesina de mucosa (Mad CAM-1) es expresada sobre vénulas con endotelio alto de placas de Peyer y nódulos linfoides mesentéricos, pero no en nódulos linfoides periféricos y es el contrareceptor para la integrina $\alpha4\beta7$ (CD499/ $\beta7$), la cual es expresada sobre linfocitos que circulan en la superficie mucosa (98).

La función de las células T $\gamma\delta$ dentro del epitelio intestinal todavía no se conoce, sin embargo ha surgido nueva información en relación a esta subpoblación celular. El reconocimiento por medio del receptor de células T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) parece ser similar al realizado por anticuerpos, ya que quizás reconoce antígenos de superficie de patógenos sin requerir el procesamiento del antígeno (98).

Varios grupos han presentado información sobre la importancia de la comunicación entre IELs y células epiteliales en el crecimiento y desarrollo de estas últimas. Las células epiteliales intestinales producen interleucina-7 (IL-7) y estimulan la proliferación de IELs $\gamma\delta$, los cuales expresan receptores para IL-7 (IL-7R) después de la estimulación con IL-7 e IL-2 o con factor de células pluripotenciales. Kiyono y cols. reportaron en el 8° Congreso Internacional de Inmunología de las Mucosas (1995) que en ratones knockout para el IL-7R carecían de IELs $\gamma\delta$ mientras que la población $\alpha\beta$ estaba

dismínuida ligeramente. Este grupo previamente había propuesto que IELs $\gamma\delta$ pueden regular la respuesta en las mucosas mediada por IgA, esto apoyado por estudios en ratones knockout $\gamma\delta$ que mostraron una marcada disminución en células plasmáticas productoras de IgA en la mucosa intestinal, así como también niveles disminuidos de IgA en suero y un decremento en la respuesta de IgA a la estimulación antigénica, en contraste con la respuesta de IgG e IgM las cuales fueron normales en ratones knockout $\gamma\delta$ (98).

El compartimento intraepitelial consiste principalmente de células T que se localizan entre las células epiteliales con muy pocas células B las que constituyen el 5% y los macrófagos el 3% (91). Los receptores de las células T varían dependiendo de la especie, por ejemplo en roedores y gallinas más del 50% son células T $\gamma\delta$. Las poblaciones celulares equivalentes no son tan abundantes en el humano únicamente el 10% de las células T intestinales humanas expresan el TCR $\gamma\delta$ comparado con menos del 5% de las células T sanguíneas (68).

Los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) predominan en el compartimento intraepitelial humano con cifras del 57 al 85% . Del 30 al 45% de estas células presentan gránulos citoplásmicos (linfocitos granulosos), con actividad citotóxica natural. Se han descrito porcentajes de 17% de células con fenotipo $CD4^+$ cuya función no está bien determinada (91).

Las células epiteliales delimitan la superficie de las mucosas. Las células epiteliales pueden actuar como células presentadoras de antígeno (APC) no profesionales, ya que se ha observado que estas células en humanos normales no expresan las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 o molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), pero, sin embargo, pueden tomar polipéptidos solubles y activar células T $CD8^+$. La glicoproteína (gp) 180, es un nuevo miembro altamente glicosilado de la superfamilia de los genes de las Igs, el cual parece ser un ligando clave localizado sobre la superficie de las células epiteliales intestinales para células T $CD8^+$ (98).

Se sabe que las células epiteliales juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune natural y adquirida del hospedero en superficies mucosas. M. Kraghoff (98) discutió nuevos hallazgos que muestran que células epiteliales del colon humano regulan la expresión y producción de un amplio grupo de citocinas proinflamatorias así como prostanoïdes, en respuesta a la invasión bacteriana. Además, las células epiteliales expresan varios receptores de citocinas. Una estrategia adicional utilizada por las células epiteliales para incrementar la protección del hospedero involucra la producción de proteínas por células caliciformes intestinales, estas proteínas protegen a las células epiteliales del daño externo por agregación de glicoproteínas de mucina (98).

CARACTERISTICAS DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN LA AMIBIASIS

Los anticuerpos humorales pueden ejercer *in vitro* efectos deletéreos sobre *E. histolytica* que a su vez posee mecanismos de evasión muy efectivos. No se sabe que función pudieran tener estos anticuerpos *in vivo*, ya que solo se han hecho experimentos aislados de inmunización humoral pasiva (99, 100) y únicamente las pruebas epidemiológicas algunas veces sugieren que las respuestas de inmunidad local pudieran brindar protección efectiva contra la enfermedad (101), muchos autores han llegado a la conclusión de que en la amibiasis la respuesta inmune humoral no confiere protección (102).

La respuesta serológica positiva a *E. histolytica* puede indicar invasión por el parásito y regularmente los títulos elevados se presentan en las etapas iniciales de la enfermedad invasora (103). El valor indiscutible de los anticuerpos es su uso en el serodiagnóstico y en la seroepidemiología.

Aun cuando todavía se desconoce el lapso que transcurre entre la infección con *E. histolytica* virulenta y la aparición de anticuerpos locales, en 80% de los pacientes con disentería amibiana y en el absceso hepático amibiano se han encontrado coproanticuerpos y anticuerpos en saliva (104,105). Se han realizado varios estudios sobre la respuesta inmune humoral, encontrándose coproanticuerpos de las clases IgG e

IgA en un 80% de los niños con amibiasis intestinal (73) detectados mediante hemaglutinación indirecta (IHA) e inmunolectroforesis (106); después de tres semanas sólo el 55% de los casos permanecieron positivos, pero en ese tiempo el nivel de los anticuerpos séricos también determinados mediante IHA, habían aumentado de manera significativa. Esta observación ilustró inicialmente el curso regular de la respuesta inmunológica en amibiasis intestinal invasora, que probablemente consiste en una respuesta secretora local corta y transitoria, como resultado de la penetración de la mucosa por las amibas virulentas y de la subsecuente producción de anticuerpos circulantes (72, 107). Sin embargo, estudios muy recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la respuesta secretora en la amibiasis intestinal y en el absceso hepático amibiano humano aparece dentro de la primera semana del período de estado de la enfermedad y se mantiene a títulos elevados hasta por 18 meses después de concluir el tratamiento anti-amibiano (105).

Además la presencia de anticuerpos de la clase IgA secretora anti-*E. histolytica* se demostró en la bilis de ratas inmunizadas intracecalmente (106) en leche humana (108) y en calostro (109). Los anticuerpos IgA e IgM anti-*E. histolytica* han sido encontrados en secreciones de íleon y colon así como en saliva y heces de pacientes con absceso hepático amibiano (110).

En la actualidad no existen pruebas concluyentes de que los anticuerpos secretores desempeñen una función protectora. De hecho, Quezada Calvillo y López Revilla descubrieron que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar a la IgA secretora (111), lo que ocurre también con IgG (112).

Los niveles absolutos de IgG y en menor proporción los de IgM, IgA e IgE se encuentran elevados en la amibiasis intestinal invasora (72, 111, 113). Este incremento en los niveles globales de las Igs podría deberse a la activación policlonal de las células productoras de anticuerpos (114) así como a la producción de enormes cantidades de diferentes familias de anticuerpos específicos contra las amibas. Sin embargo, algunos reportes indican que las proteínas amibianas no inducen la proliferación de linfocitos B humanos en un sistema *in vitro* (115).

En relación a la serología de la amibiasis, se ha encontrado que los pacientes con absceso hepático amibiano poseen anticuerpos circulantes a títulos elevados, los cuales pueden permanecer entre unos cuantos meses y varios años después de la convalecencia (116), probablemente por la persistencia de antígenos amibianos en el sistema retículo endotelial (117). Los métodos más comunmente empleados en serodiagnóstico y estudios seroepidemiológicos son: Fijación de complemento (CF), Contrainmunolectroforesis (CIE), Hemaglutinación Indirecta (IHA) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (118). Al parecer los anticuerpos de la clase IgG en particular la subclase IgG₂ (119) es mas comunmente encontrada, así como los anticuerpos IgA (120) e IgM (121), se sabe poco acerca de las respuestas de la IgE en la infección amibiana (72). En algunos estudios se han encontrado niveles normales de IgE (122, 123) mientras que en otros se han demostrado niveles elevados de esta Ig en amibiasis luminal e invasora (124).

SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA AMIBIASIS

En un estudio seroepidemiológico de amibiasis en México realizado por Caballero-Salcedo y col., en el período de 1987 a 1991 (125), en el cual se analizaron muestras séricas de la población correspondiente a los 32 estados de la República Mexicana, para determinar la presencia de anticuerpos anti-*E. histolytica*, se encontró una seroprevalencia nacional de 8.41% con una distribución irregular; siendo mas baja en las regiones del norte (6.64%), noreste (6.26%) y la región del Golfo de México (7.09%) y moderada en el noroeste (8.67%) y región centro occidental (8.52%). La seroprevalencia mas elevada se observó en las áreas sur centrales (9.25%), del pacifico sur (9.80%) y en la Península de Yucatán (9.48%). Por otro lado, la seroprevalencia en las áreas rurales fué mayor que en las áreas urbanas, y se encontró además que ésta es mas elevada en las mujeres (9.34%) que en los hombres (7.09%) con una alta frecuencia durante la edad escolar. Estos resultados indican que la amibiasis es una enfermedad endémica en la República Mexicana y que no está directamente relacionada con el clima o con la edad. A pesar de los progresos logrados en el desarrollo de técnicas para la identificación de cepas amibianas patógenas, para la identificación de anticuerpos

específicos y para el diagnóstico oportuno y preciso de enfermos con colitis o absceso hepático amibiano, así como en el diseño de métodos probabilísticos para el muestreo de poblaciones, persisten limitaciones en los estudios epidemiológicos como son: la frecuencia y distribución de portadores en las encuestas seroepidemiológicas y en la frecuencia y distribución de casos y defunciones. Sin embargo las cifras reportadas nos permiten tener una visión global de la importancia de esta enfermedad parasitaria.

PAPEL DE LA IgA EN LA MUCOSA INTESTINAL

La IgA constituye la primera línea de defensa en contra de agentes infecciosos en las mucosas. Esta inmunoglobulina en otros modelos experimentales, parece tener una importancia crucial en los mecanismos de inmunidad contra infecciones virales y bacterianas gastrointestinales, en un modelo utilizado por M. Lamm y referido por Kragnoff en 1996 (98), en el cual emplearon monocapas polarizados de células epiteliales, para corroborar el paso de complejos inmunes con IgA secretora tomados desde la superficie basolateral de la célula epitelial y por transcitosis llevados a la superficie apical. Además Burns y col., 1996 (126) en un modelo murino de protección contra rotavirus, probaron que la implantación en el dorso de células de hibridoma productoras de IgAs monoclonal las cuales fueron subsecuentemente transportados en el sistema circulatorio hacia la superficie mucosa, tuvieron la capacidad de inactivar los virus, después del reto oral durante la transcitosis a través de las células epiteliales del intestino.

Por otro lado, en el caso de parásitos como *Giardia lamblia* la IgA participa activamente en la protección inhibiendo su adherencia a las células epiteliales del duodeno (127), ya que aglutina antígenos, siendo ésta una de las principales funciones de la IgA secretora por poseer sitios receptores para lectinas bacterianas (128). También coopera con las células mononucleares citotóxicas en la eliminación de los antígenos patógenos del organismo (129). Además participa en el fenómeno de citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpo (ADCC) por medio de receptores Fc α sobre varios tipos celulares como en el caso de eosinófilos (130).

En pacientes con absceso hepático amibiano se han detectado anticuerpos secretores de clase IgA e IgM (105,110). Otros autores han descrito que también en el calostro y leche humana existen anticuerpos específicos de la clase IgA contra amiba (108). De ahí que en nuestra opinión es posible que como en los anteriores ejemplos, en el caso de *E.histolytica* la IgA pudiera participar de una manera activa en las etapas iniciales de la relación huésped-parásito en el intestino impidiendo la adherencia de los trofozoítos a la mucosa intestinal en el colon.

Con la utilización de anticuerpos monoclonales IgA anti-*E.histolytica* (131) ha sido posible determinar en estudios *in vitro* en células MDCK y células HT-29 que la IgA monoclonal antiamibiana, es capaz de inhibir entre el 60 y 80% la adherencia de trofozoítos a dichas células. Por otro lado, utilizando secciones de mucosa intestinal de ratones BALB/c y gerbos (*Meriones unguiculatum*), se observó que trofozoítos opsonizados con IgA monoclonal se fijaban a la mucosa intestinal con una menor eficiencia (30%) que los trofozoítos no opsonizados (132).

RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA *E.histolytica*

Al parecer la respuesta inmunológica contra *E. histolytica* ocurre sólo como resultado de invasión tisular por el parásito. Al invadir los trofozoítos la mucosa intestinal sobreviene una respuesta inmunológica convencional en la que probablemente participen células inflamatorias aisladas en el lugar de la invasión, especialmente las que se encuentran en el margen de las úlceras amibianas, en donde se presenta de manera inevitable el primer contacto entre los antígenos amibianos y el sistema inmunológico (133).

Sin embargo cuando las amibas de las úlceras intestinales penetran en el hígado a través de la vena porta no logran por lo menos inicialmente inducir una respuesta de inmunidad celular (134). Los estudios respecto a absceso hepático amibiano (AHA) en

hamster han puesto en claro los procesos morfológicos implicados en el desarrollo de AHA experimentalmente desde el hospedaje en los sinusoides hepáticos hasta el desarrollo de necrosis extensa del hígado. La formación de AHA posterior a la inoculación intraportal de amibas virulentas en hámsters comprende tres etapas: reacción inflamatoria aguda, formación de granuloma y necrosis progresiva (135).

En los 80's se realizaron trabajos para evaluar la respuesta inmune celular en amibiasis en los que se describió que la transformación blástica de los linfocitos obtenidos de pacientes con AHA, estimulada específicamente por extractos acuosos de *E. histolytica* y determinada mediante la incorporación de timidina tritiada, es mayor que la observada en los linfocitos de personas sanas (136); la transformación blástica específica al parecer se correlaciona mas con las respuestas de inmunidad humoral que con la inmunidad mediada por células en pacientes con amibiasis invasora: los anticuerpos se presentan desde que se establece el diagnóstico y persisten durante muchos meses o años después de la convalecencia (118).

Los primeros estudios sobre la confrontación *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* y leucocitos de origen no humano los llevó a cabo Jarumilinta y Kradolfer (137) y posteriormente Chévez y Segura (138), quienes descubrieron que las amibas con frecuencia efectúan una acción citolítica contra los leucocitos, la cual también ejercen a distancia por medio de sustancias citotóxicas capaces de difundirse en los tejidos. Estos autores postularon que debido a que el daño de los leucocitos es posterior al contacto con *E. histolytica* virulenta, se caracteriza por lisis rápida y extensa de los gránulos citoplásmicos, parece razonable suponer que el parásito puede realmente romper los lisosomas de los leucocitos lo que finalmente le causa daño generalizado y muerte (137).

El problema lo volvió a examinar Guerrant y col. (139) quienes descubrieron resultados muy similares mediante el uso de células humanas. A diferencia de las amibas no virulentas, las virulentas produjeron pérdida de la motilidad, degranulación, muerte y en ocasiones fagocitosis de PMN en un proceso que aparentemente depende del funcionamiento intacto de los microfilamentos. Se ha sugerido que el contacto celular es importante para el efecto citolítico de *E. histolytica*, y mas aún, que un lisosoma activo

de superficie constituye el mecanismo por el cual las amibas producen daño a la membrana celular de la célula blanco (140). Estos estudios se han realizado con monocitos y macrófagos humanos en interacción con amibas virulentas cultivadas en medios axénicos, encontrándose que las amibas destruyeron a éstas células sin perder su propia viabilidad.

Recientemente se han realizado estudios para elucidar el efecto de la *E.histolytica* sobre el efecto citotóxico de los macrófagos en modelos murinos y de gerbos en modular la producción del óxido nítrico (ON), y el factor de necrosis tumoral (TNF α) y en la expresión del gen de la óxido nítrico sintetasa inducible (iONS) y del gen el ARNm del TNF α en macrófagos estimulados con interferón (IFN γ) y lipopolisacáridos (LPS), en los que se observó que la *E.histolytica* indujo disfunción de la actividad citotóxica de los macrófagos a través de la modulación de la expresión de la iONS y la producción de ON (141), además causó la inducción de la expresión del ARNm del TNF α el cual es rápidamente degradado de manera que la proteína TNF α no fué secretada (142). Esto sugiere un nuevo mecanismo donde el parásito puede suprimir la función del macrófago lo cual le permite sobrevivir dentro del hospedero.

Por otro lado existen reportes en los que se ha observado que el macrófago activado es una célula efectora contra trofozoítos de *E.histolytica*, ejerciendo un efecto citotóxico sobre estos últimos por un mecanismo dependiente de contacto e independiente de anticuerpo. Lo anterior se dedujo de un estudio en el que macrófagos derivados de monocitos activados por un agente mitogénico o por una proteína amibiana soluble, destruyeron al 55% de las amibas en tres horas, presentándose la máxima muerte amibiana después de 18 horas de incubación (143). Estos estudios sugieren que el macrófago activado es una célula efectora humana competente contra trofozoítos de *E.histolytica* que puede ser eficaz para prevenir amibiasis invasora recurrente (144). Estos estudios sugieren que el macrófago confiere resistencia natural a la amibiasis.

Uno de los primeros reportes de citotoxicidad contra *E.histolytica* inducido por linfocitos de sangre periférica de pacientes recuperados de AHA fué el de Guerrero y col.

(145); sin embargo, los linfocitos de pacientes con infección aguda no tenían efectos citotóxicos. Posteriormente Cox y col. (146) demostraron que existen linfocitos T citotóxicos (CTL) en el humano con fenotipo CD8⁺ capaces de destruir amibas virulentas de *E. histolytica* HM1:IMSS, después de haber sido estimulados con fitohemaglutinina. Los CTL lisaron el 92% de los trofozoítos después de 18 h de incubación. Resultados obtenidos de otro estudio semejante en pacientes con AHA indican que en este caso ocurre una activación específica de los linfocitos T citotóxicos de los pacientes por antígenos del parásito (147). Indicando un posible papel de los CTL como una célula efectora en la respuesta inmune mediada por células en amibiasis invasora. Sin embargo, es importante señalar que las células T citotóxicas desarrollan su función efectora de manera restringida por las moléculas de tipo I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (68), que lisan principalmente células infectadas con microorganismos intracelulares y puesto que la *E. histolytica* es un parásito extracelular existe la posibilidad de que sean otras células las que se encuentren involucradas en éste efecto citotóxico.

Se conoce que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en el restablecimiento de infecciones amibianas (148). Observaciones en varios modelos han indicado que la sensibilización celular estimula al hospedero a controlar la infección (149). Además la citotoxicidad mediada por linfocitos dependiente de anticuerpo es efectiva en lisar trofozoítos de amiba *in vitro* (150). La habilidad de los macrófagos y de los linfocitos T activados para resistir y destruir trofozoítos de *E. histolytica* se ha demostrado en experimentos *in vitro* (147) e *in vivo* por medio de procedimientos que deprimen la actividad de éstas células, lo cual hace que el hospedero se vuelva mas susceptible a las infecciones amibianas, ésto se ha observado incluso en ratones genéticamente resistentes a infecciones intestinales (144).

CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO

Actualmente, se conoce que diferentes poblaciones de leucocitos así como los linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, fagocitos mononucleares y especialmente células NK son capaces de lisar varios tipos de células blanco. En algunos casos se requiere que la célula blanco se encuentre recubierta con IgG específica, proceso lítico al cual se le denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Los eosinófilos median un tipo especial de ADCC dirigido contra parásitos (helminetos), en este caso la IgE o IgA son las inmunoglobulinas participantes en el fenómeno las cuales se unen a la superficie de los helmintos, después los eosinófilos se unen a estas Igs a través de receptores para el Fc de los anticuerpos IgE o IgA (151), activándose de esta manera para secretar enzimas que destruyen los parásitos (68) Las células NK tienen la capacidad de lisar células malignas o infectadas con virus por dos mecanismos: Uno involucra la exocitosis de gránulos líticos, de la célula NK que incluye la citotoxicidad mediada por células (CMI) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) ambos mecanismos son dependientes de la activación temprana de la proteína tirosina cinasa (PTK) ésta se inicia por la unión del RFcy de las células NK a su ligando, el que puede estar en forma soluble o asociado a otras células, disparándose así una serie de eventos moleculares en cascada que terminan en el incremento de la concentración de calcio intracelular y en la liberación de los gránulos a la interfase efector-blanco, estos gránulos contienen perforina la cual produce poros (poliperforina) de 10-20 nm y las llamadas granzimas (152). Estas enzimas se cree que penetran a la célula blanco a través de los poros producidas por la perforinas induciendo la activación de la vía ICE/ced-3 de apoptosis (152,153).

Otro mecanismo de lisis independiente de gránulos que ha sido recientemente descrito por varios autores, en el que se involucra la interacción de Fas Ligando (FasL) de células efectoras y el Receptor de Fas sobre la célula blanco, jugando un papel importante en la apoptosis inducida en célula NK humanas (154, 155). Eischen y col. 1996 (156) reportaron un trabajo en el que describieron que la expresión de FasL sobre

células NK activadas, es inducida por la unión del RFcy a su ligando, influyendo en su capacidad de mediar apoptosis paracrina y autocrina, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (152,154,157).

Se ha demostrado que la ADCC constituye un mecanismo inmune efector importante contra células infectadas con virus y células tumorales las cuales pueden ser destruidas por la acción combinada de anticuerpos asociados a la superficie celular (isotipo IgG) y células NK principalmente. Actualmente se han hecho estudios encaminados a dilucidar el papel de la ADCC en infecciones virales especialmente en el caso del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (158,159) así como en algunos tumores (160, 161).

Se han identificado receptores sobre células linfoides capaces de unir inmunoglobulinas a través del fragmento Fc de las IgG e IgM en células de ratón y de humanos, estos isotipos se unen a células B y células T, en el caso de IgG a “células K”, aunque la afinidad de los sitios de unión de estas inmunoglobulinas (Igs) puede diferir entre los tipos celulares (162). En algunos estudios se ha observado que la interacción de los sitios de unión celulares con los componentes Fc de las Igs puede resultar en la estimulación o supresión de la función celular *in vitro* (153, 163, 164,).

Warren y Col., (165) reportaron en el modelo del ratón la unión de IgA a células linfoides por medio del fragmento Fc; estas poblaciones linfoides ricas en células B y T podrían además contener una tercera población de células, por ejemplo células K o células “null” en el bazo, las cuales se sabe tienen receptores de alta afinidad para el Fc de IgG.

Se ha establecido que una variedad de tipos celulares expresan receptores de superficie celular para IgA, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células mieloides humanas expresan receptores de superficie celular Fc α (166) y se ha demostrado que median funciones efectoras tales como fagocitosis (167), ADCC y liberación de mediadores inflamatorios (168).

Mientras que los receptores para IgA pueden estar asociados con inmunoregulación, se ha visto que su presencia sobre fagocitos puede probablemente estar relacionada con la mediación de funciones secundarias tales como la fijación de complemento a través de la vía alterna (169) ya que se sabe que la IgA es incapaz de fijar complemento por la vía clásica (170).

En el trabajo realizado por Li Shen y Fanger (168) se demostró que la IgA secretora sinergiza con la IgG en la actividad de ADCC con células polimorfonucleares (PMN), monocitos y linfocitos de humanos en las mucosas (73). Kaplan y col., (127) reportaron en el modelo de ratón mediante la interacción *in vitro* entre IgG e IgA secretora específica y células fagocíticas, el fenómeno de ADCC como mecanismo efector de resistencia en giardiasis. Además se demostró este mismo fenómeno en neutrófilos de sangre periférica humana y células de exudado peritoneal de conejo contra trofozoítos de *Giardia lamblia* (171, 172). En otro estudio Fanger y col., (173) reportaron que el número de linfocitos con receptores Fc α constituían al menos el 30% de los linfocitos en sangre periférica humana.

En el modelo del conejo se encontró que en PP había mas linfocitos expresando el receptor Fc α (174) lo cual es importante, ya que las PP proveen de células precursoras formadoras de anticuerpo IgA las cuales eventualmente poblan la LP del intestino (175). Estas células precursoras entran a los vasos linfáticos que drenan las PP, luego pasan a través de los nódulos linfáticos mesentéricos, hacia el conducto torácico y de ahí al sistema venoso y al arterial, desde donde viajan hacia la LP intestinal (176).

Existen estudios que indican que el receptor Fc α (RFc α) de las células mieloides humanas es una proteína de aproximadamente 60 KD (177), la cual por deglicosilación puede ser separada en dos proteínas de 32 y 36 KD (177). Los RFc α se parecen a otros RFcs que contienen varios residuos conservados los cuales son característicos de estas moléculas y por otro lado, las hacen semejantes en al menos dos dominios contiguos (178). Estos residuos, incluyendo dos cisteínas en cada dominio forman el enlace disulfuro que mantiene juntos los pliegues de las Igs (178), conservándose la estructura

de dominios características de las moléculas codificadas por genes pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (179). El análisis de la estructura del receptor demostró que posee una región extracelular seguida por 19 residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Leu 207 a Val 225) correspondiendo a una región transmembranal potencial. La región intracitoplásmica podría estar compuesta por 41 aminoácidos (180).

De acuerdo a los resultados publicados por Lamkhioved y col., (151) parece ser que la respuesta inmune en las mucosas mediada por IgA, podría estar manifestada a través de la unión de blancos cubiertos por IgA, ya sea por receptores $Fc\alpha$ o por un receptor para componente secretor (Cs). Además, la expresión en la superficie de un receptor para Cs sobre eosinófilos humanos podría explicar el porqué la IgA secretora preferentemente activa poblaciones de eosinófilos. Estos datos sugieren que el Cs y la IgA secretora pueden interactuar con eosinófilos no sólo en las mucosas sino también en la sangre periférica, al menos en enfermedades hepáticas o intestinales (47).

Grezel y col., (181) describieron la inmunidad protectora inducida en el modelo de Schistosomiasis en rata, involucrando anticuerpos IgE e IgA lo cual sugiere una asociación sinérgica entre estas dos Igs en el fenómeno de citotoxicidad dependiente de anticuerpo mediada por eosinófilos (181).

El ADCC ha sido investigado como un importante mecanismo de defensa contra infecciones virales, bacterianas y parasitarias (182). Se ha implicado como una extensión de la respuesta inmune del hospedero, pero raramente se ha considerado que contribuye a la mediación de protección sobre superficies mucosas. De acuerdo a su abundancia y a la habilidad en la interferencia con la adherencia de patógenos a superficies mucosas, la IgA secretora se ha propuesto como la mediadora principal de protección de superficies secretoras, así como en la leche materna (183). Además con la identificación de receptores IgA sobre linfocitos, monocitos y neutrófilos de ratón y humanos, se ha especulado que la IgA secretora puede tener la habilidad de promover ADCC, y esto puede representar un papel adicional para esta Ig en respuesta a una infección mucosa (168). Además la IgA secretora específica ha sido encontrada mediando la ADCC contra

algunas bacterias cuando se une a linfocitos del tejido linfoide asociado a intestino murino (184).

Chug y Col., (185) analizaron la interacción entre trofozoítos de *E. histolytica* y células mononucleares (MNC) no inmunes las cuales fueron capaces de ejercer un efecto citotóxico sobre trofozoítos de *E. histolytica*. La adición de suero inmune dirigido contra los trofozoítos en este sistema incrementó la capacidad de lisis de los MNC de animales inmunizados con una fracción del extracto crudo de *E. histolytica* (FI). Los resultados mostraron que el evento citotóxico fue independiente de la presencia de complemento. En 1987 Vinayak y col. (186) Realizaron un estudio para investigar la habilidad de antígenos asociados a membrana de una sublínea axénica de *E. histolytica* en la protección de hamsters frente al reto hepático experimental con amibas. Los resultados indicaron que los antígenos de membrana pueden estimular altos niveles de sensibilización celular y mostraron que los macrófagos obtenidos de animales inmunizados desarrollaron una mayor capacidad para lisar trofozoítos de amiba *in vitro*, por medio de citotoxicidad mediada por macrófagos dependiente de anticuerpo en animales inmunizados. Este mecanismo de ADCC ha sido reportado contra tumores, células infectadas por virus y también contra diferentes parásitos (187).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *E. histolytica* es un parásito morfológicamente muy simple, sin embargo, su capacidad para producir enfermedad parece ser muy variada por lo que los mecanismos inmunológicos que participan en la protección contra este parásito, pudieran ser muy complejos. Es por ello que nos interesó analizar el papel que tiene el fenómeno de citotoxicidad mediada por anticuerpos IgA en la eliminación de *E. histolytica*; ya que este es uno de los aspectos menos estudiados de la respuesta inmune en la amibiasis. Cabe mencionar que la ADCC mediada por IgA ha sido ampliamente descrita en infecciones gastrointestinales, virales, bacterianas (166, 168) y parasitarias (124).

El objetivo central del presente trabajo, fué el de analizar el fenómeno de ADCC mediado por IgA utilizando células linfoides efectoras provenientes del bazo, placas de Peyer y ganglios mesentéricos de ratones BALB/c inmunizados por vía intragástrica, con trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS comparativamente con células linfoides de animales no inmunes.

Para ello utilizamos tanto anticuerpos séricos antiamibianos, anticuerpos antiamibianos presentes en el fluido intestinal de animales inmunizados, así como anticuerpos monoclonales de la clase IgA anti-*E. histolytica* , producidos en nuestro laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el fenómeno de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos de la clase IgA, participa como mecanismo de eliminación de *E. histolytica* en un modelo *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Estudiar la participación de anticuerpos séricos, y secretores antiámibianos en el fenómeno de ADCC en un modelo murino. 2) Utilizar un monoclonal de la clase IgA antiámibiano como herramienta para demostrar el fenómeno de ADCC mediado por IgA utilizando células linfoides de ratones Balb/c inmunes y no inmunes.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones BALB/c singénicos de 6 a 8 semanas de edad, alimentados con tabletas de Purina (Purina de México S.A.) y agua estéril *ad libitum*. Los ratones fueron desparasitados de acuerdo a la técnica descrita por Belosevic, M. y Faubert, G.M. (188) con una solución de Metronidazol (solución inyectable de Metronidazol 500, Sector Salud), a una dosis de 5 mg/ratón/día, durante 6 días consecutivos por vía intragástrica. Se realizaron coproparasitoscópicos seriados con el objeto de comprobar que los animales estuvieran libres de parásitos utilizando una modificación de la técnica de Faust (189). Se colectaron las deyecciones expulsadas por los animales, las cuales fueron pesadas y resuspendidas en 8 ml de solución salina isotónica de NaCl 0.15 M y se incubaron a temperatura ambiente de 20 a 30 min, después se disgregaron con un aplicador de madera para obtener una suspensión uniforme de materia fecal, la cual se centrifugó a 650 g durante 3 min a 4°C (Centrifuga Beckman Mod. TS-6). Posteriormente se decantó el sobrenadante y el paquete de materia fecal obtenido se lavó una vez en las condiciones antes descritas, realizado esto último se descartó el sobrenadante.

La muestra empaquetada en el fondo del tubo se resuspendió en 2.5 ml de solución acuosa de ZnSO₄ ajustada a una densidad de 1.185 g/ml y se centrifugó a 650 g durante 3 min. a 4°C el sobrenadante se vertió a un tubo de 16 X 150 y se reconstituyó con 10 ml de una solución de formol al 5% v/v en solución salina isotónica. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 400 g durante 3 min a 4°C, después de esto se eliminó el sobrenadante por decantación y con el diluyente escurrido por las paredes del tubo se resuspendió el botón empaquetado en el fondo.

El volumen aproximado de esta suspensión fue de 0.3 ml.

Posteriormente se añadieron 30 µl de lugol parasitológico (diluído 1:5 con agua destilada) y en esta suspensión teñida se procedió a contar microscópicamente el número

de quistes/ml en la cámara de Neubauer (Boeco) para después calcular el número de quistes/g de heces.

TROFOZOITOS

Se utilizaron trofozoitos de la cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* en fase logarítmica de crecimiento, los cuales se mantuvieron en cultivo axénico en medio TY1-S-33 (190).

IgA MONOCLONAL ANTI-*E.histolytica*

Para los ensayos de ADCC se utilizaron los anticuerpos monoclonales con isotipo IgA (F1P1D4) obtenidos por el grupo de la Dra. Cecilia Ximénez, en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM (131), los cuales se purificaron en una columna de Sefarosa -4B acoplada con anticuerpo anti-IgA de ratón (Zymed Laboratories, Inc. Sn. Francisco Ca USA) (191). La columna se lavó con 100ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.2. El anticuerpo monoclonal previamente dializado contra PBS durante 18 horas en agitación y a 4°C, fué incorporado a la columna de Sefarosa -anti-IgA de ratón, la columna se incubó durante toda la noche a 4°C. Para eliminar la proteína no unida a la anti-IgA, se lavó la columna con 100 ml de PBS, 0.15 M, pH 7.2 para lo cual se colectaron fracciones de 2.5 ml, detectando la presencia de proteínas en las fracciones por la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 280 nm. Una vez eliminada toda la proteína no pegada específicamente se procedió a eluir la IgA monoclonal por medio de una solución amortiguadora de glicina-HCl, 0.1 M, pH 2.2 (Merck de México S.A.). Nuevamente se colectaron fracciones de 1 ml para seleccionar aquellas con mayor D.O. Las fracciones se neutralizaron de inmediato con una solución de Tris-Base, 0.5 M (Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo. USA).

Después de corroborar que toda la proteína unida a la anti-IgA había sido colectada, se procedió a lavar la columna nuevamente con PBS.

El volumen del eluido se concentró en amicón con una membrana YM 100 (Amicon Corp. Danvers, MA. USA) y se determinó la concentración de proteína por medio de espectrofotometría.

Posteriormente, se realizó un análisis electroforético del anticuerpo monoclonal purificado con isotipo IgA, en geles de poliacrilamida al 7.5% y al 10% en presencia de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) en condiciones reductoras y no reductoras, de acuerdo al método descrito por Laemmly (192), los geles se tiñeron con un reactivo para tinción con plata (Bio Rad Laboratories, Inc. USA)

Se utilizó como patrón comparativo la IgA monoclonal producida por el mieloma murino TPC15 (Sigma, Chemical Co., St. Louis Mo. USA).

INMUNIZACION

Los ratones se inmunizaron por intubación intragástrica con 5×10^6 trofozoítos de *E. histolytica*, fijados de acuerdo al método descrito por Moreno F. y col., (193) los cultivos de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, se cosecharon en baño de hielo y se lavaron 3 veces con una solución amortiguadora de Fosfato de Potasio 19 mM pH 7.2, adicionada con 0.27 M de Cloruro de Sodio (Merck de México, S.A.) (PD) y se centrifugaron a 200 g durante 10 min a 4°C (centrífuga refrigerada Beckman mod. TJ-6), se decantaron los sobrenadantes y los botones se colectaron en un tubo cónico para centrifuga de 50 ml (Costar, Cambridge MA. USA) El botón se resuspendió en una solución amortiguadora de Fosfato de Sodio y Potasio 0.15 M (isotónica) sin Calcio ni Magnesio (PBS) pH 7.2; este procedimiento de lavado se utilizó cada vez que se cosecharon los trofozoítos para los diferentes ensayos realizados en este trabajo. La viabilidad se determinó por el método de exclusión con Azul Tripano.

Posteriormente los trofozoítos se fijaron con glutaraldehído (Merck de México, S.A.) al 2.5 % con PBS. La suspensión se almacenó a 4°C hasta su utilización, para ello, los trofozoítos se lavaron para eliminar el glutaraldehído y se resuspendieron en medio de intubación, el cual contenía 80% de PBS pH 7.2 y 20% de solución al 7.5% de Bicarbonato de Sodio (J.T Baker S.A. de C.V. México) en cada dosis. Cada ratón se inmunizó con 0.5 ml de la suspensión durante 3 días consecutivos. Este esquema de inmunización se repitió a los 15, 30, 45 y 60 días después de la primera dosis (131).

OBTENCION DE FLUIDO INTESTINAL Y SUERO DE RATONES BALB/c.

Con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti*amibianos* se obtuvo el fluido intestinal de los ratones inmunizados y de los controles (no inmunes) por medio de la técnica descrita por Elson O. y col., (194).

Para ello, cada ratón se colocó sobre una malla de alambre dentro de un vaso de precipitado; el cual contenía 3 ml de una solución compuesta de inhibidor de tripsina de soya 0.1 mg/ml en EDTA 50 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA). Posteriormente se les administró a cada uno de los ratones 4 dosis de 0.5 ml de una solución de lavado, a intervalos de 15 min por vía intragástrica. Dicha solución se preparó con: NaCl 25 mM, Na₂ SO₄ 40 mM KCL 10 mM, NaHCO₃ 20 mM (Merck de México S.A.) y polietilenglicol 3350 (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island, NY USA) 48.5 mM. Treinta minutos después de la última dosis de la solución de lavado se les administró 0.1 mg de pilocarpina por vía intraperitoneal (IP), la descarga del contenido intestinal ocurrió dentro de los 30 min posteriores a la administración de la pilocarpina. Todo el material obtenido se transfirió a tubos de 15 ml (Costar, Cambridge MA. USA) ajustando el volumen a 6 ml con PBS. A continuación las muestras se agitaron en vortex y se centrifugaron a 650 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Beckman, modelo. TJ-6). Por cada 5 ml de sobrenadante obtenido se agregaron 50 µl de Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) 100 mM en etanol al 95%, el fluido se centrifugó a 27,000 g durante 20 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Beckman, Mod. J2-21, Rotor JA 20.1) nuevamente, por cada 5 ml del sobrenadante de la muestra recién centrifugada se agregaron 50 µl de PMSF y 20 µl de Azida de Sodio al 1% (Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA).

Para la obtención de suero, los animales se sangraron a través del plexo retroorbitario, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 200 g durante 20 min a 4°C, después de los cuales se tomó el suero y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta el momento de su utilización.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*E.HISTOLYTICA* POR EL METODO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

La detección de anticuerpos anti-*E.histolytica* se realizó en las muestras de suero y fluido intestinal obtenidas tanto de ratones inmunizados como de los ratones controles.

La determinación de dichos anticuerpos se realizó utilizando el método de ELISA de acuerdo con la técnica descrita por Ortíz.-Ortíz y col., (35).

Para la realización de la técnica se emplearon tiras con 8 pozos removibles para microtitulación (Costar, Cambridge MA. USA), a los cuales se les acoplaron 1×10^3 trofozoitos suspendidos en 50 μ l de una solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M pH 9.6 por cada pozo. Las tiras se secaron al vacío por espacio de aproximadamente 12 h a temperatura ambiente. En el momento de su utilización los pozos se hidrataron con PBS 0.15 M, pH 7.2 adicionado con 0.5% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y 0.5% de Tween 20 (PBS-BSA-Tween) (Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA) así mismo se lavaron en dos ocasiones durante 5 min cada una con PBS-Tween, este procedimiento de lavado se utilizó durante todo el ensayo.

Posteriormente los pozos se bloquearon con BSA 3% (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA), incubando toda la noche a 4°C. A continuación y previo lavado de los pozos, se adicionaron 50 μ l de la muestra (fluido intestinal o suero) y se incubaron durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente.

Los pozos se lavaron y se les añadieron 50 μ l del anticuerpo peroxidado anti-inmunoglobulina de ratón, anti-IgG, IgM o IgA (Cappel Pa., USA). A continuación las tiras se incubaron nuevamente durante 60 min utilizando los anticuerpos conjugados a la enzima peroxidasa se utilizaron a las diluciones que previamente habían dado lecturas de D.O. a 490 nm similares a cuando se probaron con concentraciones iguales de las inmunoglobulinas purificadas correspondientes. Por último se añadieron 50 μ l del sustrato el cual consistió en: 10 ml de una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5, adicionada de 10 mg de O-Fenilendiamina (Sigma Chemical Co, St, Louis MO. USA) y 4 μ l de H₂O₂ al 30% (Merck de México S.A.). La reacción se dejó transcurrir hasta la aparición de color (aproximadamente 15 min). La reacción se bloqueó añadiendo 200 μ l de H₂SO₄ 1 M (Merck de México S.A.) por pozo y las tiras se leyeron en un

lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm (Biokinetics Reader-Biotek-Instruments).

OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES DE NODULOS MESENERICOS

Se obtuvieron células de nódulos mesentéricos de ratones BALB/c inmunes y normales, para ello, los ratones se anestesiaron con éter y se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se sumergió a cada uno en alcohol y se procedió a disecar la piel del abdomen, a continuación se realizó una incisión vertical a lo largo del peritoneo, se localizó el intestino y los ganglios mesentéricos los cuales se extrajeron, se colocaron en una caja de Petri estéril con aproximadamente 5 ml de Solución Salina Balanceada de Hanks sin Calcio ni Magnesio (HBSS) adicionada con HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO. USA) y con 1% de una solución de antibióticos-antimicóticos (Sol 100 X) (Gibco Laboratories Inc. Grand Island NY. USA), el pH se ajustó a 7.2 con Hidróxido de Sodio 5 N. Los ganglios se mantuvieron en la caja de Petri en baño de hielo.

Posteriormente, los nódulos mesentéricos se liberaron de vasos sanguíneos, grasa y serosa peritoneal y se disgregaron con agujas hipodérmicas estériles. Esta suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 50 ml (Costar, Cambridge MA. USA) la cual se incubó en baño de hielo por 10 min, después de los cuales el sobrenadante se transfirió a otro tubo cónico y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C (Centrífuga refrigerada Beckman, modelo TJ-6). La suspensión celular se lavó dos veces y el botón celular se resuspendió en RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) adicionado con 1% de la mezcla de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 X) (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co; St. Louis MO. USA). El porcentaje de viabilidad celular se determinó por medio del método de exclusión con Azul Tripano, las células se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/ml para proceder al ensayo de ADCC.

OBTENCION DE CELULAS LINFOIDES DE PLACAS DE PEYER

Las placas de Peyer se obtuvieron de ratones BALB/c inmunizados y de ratones normales. Para su obtención se procedió a disecar el intestino de cada uno de los ratones

seleccionados, iniciando por la porción pilórico-duodenal, se identificaron las placas de Peyer y se fijaron con pinzas de Allis de forma tal que pudieran ser resecadas con tijeras curvas, tratando de no llegar a la luz intestinal, evitando así una posible contaminación con materia fecal.

A continuación las placas de Peyer se depositaron en una caja de Petri estéril con aproximadamente 5 ml de HBSS adicionado con 1% de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 X) (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA), las placas se lavaron en 5 ocasiones aproximadamente, cambiando la caja de Petri cada vez, ésta contenía medio fresco, todo lo anterior se realizó en un baño de hielo. Las células linfoides se obtuvieron disgregando las placas de Peyer con dos agujas hipodérmicas estériles.

La suspensión celular se transfirió a un tubo de plástico cónico de 50 ml (Costar Cambridge MA. USA) y se incubó en baño de hielo por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para centrifugarlo a 200 g por 10 min a 4°C (Centrífuga refrigerada Beckman modelo TJ-6), el lavado se repitió una vez más y el botón celular se resuspendió en RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) adicionado con 1% de la mezcla de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 X) (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA), finalmente las células se ajustaron a 5×10^6 células/ml.

OBTENCION DE CELULAS DE BAZO

Se obtuvieron células de ratones BALBC/c inmunes y normales, se localizó el bazo, se extrajo y se colocó en una caja de Petri estéril con aproximadamente 5 ml de HBSS adicionado con 1% de solución de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 X) (Gibco Laboratories Inc. Grand Island N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA). Esta solución se utilizó para infiltrar el bazo y finalmente se disgregó con pinzas de disección. Esta suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 50 ml (Costar Cambridge MA. USA) y se incubó en baño de hielo por 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo cónico y se centrifugó a 200 g por 10 min. a 4°C, la suspensión celular se lavó únicamente dos veces. El botón celular se resuspendió en RPMI-1640

adicionado con 1% de una solución de antibióticos-antimicóticos (Sol. 100 X) (Gibco Laboratories, Inc. Grand Island N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA). Para determinar el porcentaje de viabilidad celular se utilizó el método de exclusión con Azul Tripano, las células se contaron y ajustaron a 5×10^6 células/ml.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) se utilizó la técnica descrita por Tagliabue con algunas modificaciones (195). Los trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento como se mencionó anteriormente y se ajustaron a 1×10^5 /ml. De esta suspensión se tomaron 100 μ l que se colocaron en viales para microtitulación (Costar, Cambridge MA. USA), a éstos se les adicionaron 100 μ l de la suspensión de células linfoides provenientes de los diferentes órganos o compartimentos intestinales. Para determinar las concentraciones de los anticuerpos antiamibianos policlonales y monoclonales para utilizarse en el ensayo de ADCC, así como los anticuerpos no específicos, suero y fluido intestinal no inmunes, que se usaron como controles, se hizo una cuantificación comparativa de los niveles de los tres isotipos estudiados, mediante la titulación simultánea de los conjugados anti-isotipo específicos contra concentraciones conocidas de IgG, IgM e IgA de ratón purificados por afinidad (Sigma Chemical Co, St Louis Mo.). Este procedimiento nos permitió utilizar concentraciones equivalentes de inmunoglobulinas en las diferentes condiciones en el sistema. De ahí que se hayan ajustado los diferentes anticuerpos a una concentración aproximada de 60 μ g de inmunoglobulinas por tubo de ensaye tanto para IgG sérica como para IgA en fluido intestinal cabe mencionar que la selección de dicha concentración de inmunoglobulinas se basó en una serie de ensayos previos con diferentes concentraciones para disminuir en lo posible un efecto citotóxico de fondo sobre los trofozoítos. Para ello se probaron, fluido intestinal inmune y normal, suero hiperinmune y preinmune, anticuerpo monoclonal del isotipo IgA (obtenido en el Laboratorio de la Dra. Ximénez) y N.Y. USA) y HEPES 25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA). Las mezclas (células-trofozoítos) se centrifugaron a 200 g durante

5 min a 4°C y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 4 horas, después de transcurrido el tiempo el paquete se resuspendió y se determinó la viabilidad de los trofozoítos por medio del método de exclusión con azul tripano.

Los resultados se expresaron como porcentaje de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS muertos, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - (100) \frac{\text{No de trofozoítos viables en los tubos experimentales}}{\text{No de trofozoítos viables en los tubos control}}$$

ANALISIS ESTADISTICO.

Para evaluar la significancia estadística de los resultados se utilizó un análisis de varianza seguido de (ANOVA) la prueba de t de Student cuando las varianzas resultaron homogéneas, en el caso de varianzas heterogéneas se utilizó la prueba de U de Mann Whitney (196).

RESULTADOS

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*E. histolytica*.

La detección de anticuerpos en fluido intestinal y en suero se realizó mediante la prueba de ELISA. Los animales inmunizados con 5 dosis de trofozoítos fijados con glutaraldehído administrados intragástricamente respondieron con un incremento moderado de las clases de inmunoglobulinas IgG, e IgM en el suero, sin embargo, en el fluido intestinal de ratones inmunizados, se observó un incremento básicamente de la IgA anti*amibiana* (Tabla 1).

EXPERIMENTOS DE ADCC

Los resultados de los experimentos fueron expresados como porcentaje de trofozoítos muertos después de un período de incubación con las células linfoides de 4 h. El fondo de citotoxicidad obtenida de la incubación de los trofozoítos y los reactivos probados (anticuerpos monoclonales, suero o fluido intestinal) en ausencia de células linfoides (células efectoras) se muestra en la Tabla 2. Estos controles fueron incluidos en cada uno de los 6 experimentos realizados. Los resultados indican que el número de trofozoítos muertos después del período de incubación fué menor al 10% del número original de trofozoítos viables. Las preparaciones de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS utilizados en cada experimento, contaban con una viabilidad mayor al 95%.

En la Tabla 3 se muestra la citotoxicidad natural (CN) de las células linfoides sobre los trofozoítos, en donde puede observarse que solo cuando los trofozoítos se incubaron con células de bazo de animales inmunizados la citotoxicidad se incrementó con respecto a la obtenida con la utilización de células de animales normales, con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$); en el resto de las condiciones no se observaron diferencias significativas.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de células linfoides no inmunes dependiente de anticuerpo se muestran en la Tabla 4, en este caso las células linfoides de

bazo mostraron un efecto citotóxico del 27.17% cuando se utilizó suero hiperinmune anti*amiba*, sin embargo, este valor no resultó significativamente diferente al valor de citotoxicidad obtenido en la CN (Tabla 3). En el resto de las condiciones analizadas tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la citotoxicidad natural. Por otro lado, las células linfoides obtenidas de las PP de animales no inmunes mostraron efecto citotóxico sobre el 57.4% (Tabla 4) de los trofozoítos en presencia de fluido intestinal inmune, siendo esta es la única condición donde se encontró una diferencia ($p < 0.003$) estadísticamente significativa con respecto a la CN. En general las células linfoides de nódulos mesentéricos mostraron un efecto citotóxico similar al obtenido en el ensayo de CN bajo todas las condiciones estudiadas, no encontrándose diferencias significativas en el análisis estadístico ($p > 0.05$).

Cuando los experimentos de ADCC se realizaron con las células linfoides de placas de Peyer de animales inmunizados en presencia de fluido intestinal inmune se obtuvo un efecto citotóxico del 88.57% el cual resultó estadísticamente significativo cuando se comparó con los valores de CN correspondiente (Tabla 5) ($p < 0.001$). Cuando la incubación de estas mismas células se hizo con el monoclonal anti*amiba*, se obtuvo un importante incremento en la citotoxicidad de 60.71% con respecto a la correspondiente CN; dicha diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Tabla 5).

El efecto citotóxico de las células de bazo de animales inmunes en presencia de suero hiperinmune fue estadísticamente significativo con relación a la citotoxicidad natural, en el caso de la citotoxicidad de esas mismas células en presencia de fluido intestinal inmune ésta fue comparable a los valores obtenidos con células linfoides no inmunes (36.27% y 22.14% de trofozoítos muertos, respectivamente) (Tabla 4,5). Dichos valores corresponden a valores muy cercanos a los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad natural, por lo que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

Por otro lado, las células linfoides de nódulos mesentéricos de animales inmunizados intragástricamente, mostraron un efecto citotóxico del 27.24 % (Tabla 5) sobre la población de trofozoítos, cuando se incubaron en presencia de fluido intestinal inmune, el análisis estadístico de los resultados con

respecto a los valores de citotoxicidad natural no resultó ser significativo ($p>0.05$). El resto de las condiciones tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 1
ANTICUERPOS ANTIAMIBIANOS DE RATONES BALB/c^a

	IgG		IgM		IgA	
	Preimmune	Inmune	Preimmune	Inmune	Preimmune	Inmune ^c
Suero	0.336 (± 0.05)	1.262 (± 0.18) ^b	0.325 (± 0.01)	0.889 (± 0.26)	0.358 (± 0.12)	0.745 (± 0.09)
Fluido intestinal	0.196 (± 0.10)	0.509 (± 0.14)	0.123 (± 0.06)	0.338 (± 0.07)	0.142 (± 0.05)	0.810 (± 0.04)

^a Ratones BALB/c inmunizados con 5×10^6 trofozoitos de *E. histolytica* fijados previamente con glutaraldehído al 2.5%, administrados por vía intragástrica, con tres dosis en días consecutivos, repetidas cada 15 días durante tres meses.

^b Los valores representan la media de la D.O. a 490 nm de 6 experimentos ± la desviación estándar.

^c Los conjugados anti-Inmunoglobulinas fueron ajustados a la dilución que previamente habían dado lecturas de D.O. a 490 nm, similares a cuando se probaron con concentraciones iguales de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM de ratón purificadas por afinidad.

TABLA 2.
EFECTO DEL SUERO Y FLUIDO INTESTINAL SOBRE TROFOZOITOS DE
E. histolytica

	SUERO ^a		FLUIDO INTESTINAL ^a		ANTICUERPOS IgA ^b MONOCLONALES	
	Preinmune	Inmune	Preinmune	Inmune	TPC15	F1P1D4
% de trofozoítos muertos ^c	2.5 (± 1.7)	6.12 (± 3.2)	9.5 (± 1.3)	10.15 (± 1.9)	8.73 (± 2.3)	10.12 (± 1.8)

^a El suero de ratón de complementado a 56°C/30 min y fluido intestinal preinmune, corresponden a los obtenidos de ratones BALB/c antes de ser inmunizados con trofozoítos de *E. histolytica* fijados previamente con glutaraldehído al 2.5 %, administrados por vía intragástrica. Los sueros y fluidos intestinales inmunes son de animales inmunizados con tres dosis en días consecutivos, repetidas cada 15 días durante tres meses.

^b TPC15 es una IgA monoclonal de mieloma de ratón, F1P1D4 es la IgA monoclonal anti-*E. histolytica*

^c Los valores representan la media de 6 experimentos ± la desviación estándar, se utilizaron 1X10⁴ trofozoítos/tubo en cada experimento.

El % de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - (100) \frac{\text{No. de trofozoítos viables en tubos experimentales}}{\text{No. de trofozoítos viables en tubos controles}}$$

TABLA 3

CITOTOXICIDAD DE CELULAS LINFOIDES MURINAS SOBRE TROFOZOITOS
DE *E. Histolytica*^a

% de trofozoitos muertos ^b	CELULAS LINFOIDES					
	BAZO		PLACAS DE PEYER		NODULOS MESENTERICOS	
	Preimmune	Inmune	Preimmune	Inmune	Preimmune	Inmune
	17.3 (± 9.2)	42.07(±12.6)*	27.8 (± 6.3)	33 (± 7.9)	17 (± 8.3)	23.03 (± 6.8)

^a Proporción 1:50 Trofozoito:Célula efectora (1×10^4 : 5×10^5)

^b Los valores representan la media de 6 experimentos, ± la desviación estándar, expresados como % de trofozoitos muertos. Las células se obtuvieron de los órganos linfoides de ratones BALB/c antes de ser inmunizados (preimmune), y después de ser inmunizados intragástricamente con trofozoitos fijados con glutaraldehído al 2.5% con tres dosis en días consecutivos, repetidas cada 15 días durante tres meses.

El % de citotoxicidad e calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - (100) \frac{\text{No. de trofozoitos viables en tubos experimentales}}{\text{No. de trofozoitos viables en tubos controles}}$$

* CN de células de animales inmunizados contra células de animales normales $p < 0.05$ por U de Mann-Whitney.

TABLA 4

CITOTOXICIDAD DE CELULAS LINFOIDES DE RATONES BALB/c
NORMALES ^a

TRATAMIENTO	CELULAS LINFOIDES		
	BAZO	PLACAS DE PEYER	NODULOS MESENTERICOS
^b -	17.39 (± 9.2) ^c	27.8 (± 6.3)	17 (± 8.3)
SUERO PREINMUNE	12.34 (± 8.2)	NSD	23 (± 7.3)
SUERO HIPERINMUNE	27.17 (± 6.89)	NSD	29.16 (± 6.17)
FLUIDO INTESTINAL PREINMUNE	21.73 (± 2.49)	29.2 (± 3.5)	18 (± 5.3)
FLUIDO INTESTINAL INMUNE	22.14 (± 5.23)	57.4 (± 11.4) *	28.46 (± 6.45)
F1P1D4	23.82 (± 6.9)	21.25 (± 6.2)	20.3 (± 8.75)
TPC15	15.3 (± 2.7)	22.8 (± 6.3)	23.33 (± 9.37)

^a Proporción 1:50 Trofozoito:Célula efectora (1×10^4 : 5×10^5).

^b Citotoxicidad Natural de las células linfoides (CN).

^c Los valores representan la media de 6 experimentos ± la desviación estándar, expresados como % de trofozoitos muertos. Las células se obtuvieron de los órganos linfoides de ratones BALB/c no inmunizados. El % de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - (100) \frac{\text{No. de trofozoitos viables en tubos experimentales.}}{\text{No. de trofozoitos viables en tubos controles}}$$

NSD No se determinó.

*ADCC contra CN $p < 0.003$ por U de Mann-Whitney

TABLA 5

CITOTOXICIDAD DE CELULAS LINFOIDES DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON TROFOZOITOS DE *E. histolytica* ^a

TRATAMIENTO	CELULAS LINFOIDES		
	BAZO	PLACAS DE PEYER	NODULOS MESENTERICOS
^b —	42.07 (± 12.6) ^c	33 (± 7.9)	23.03 (± 6.8)
SUERO PREINMUNE	40.48 (± 7.7)	NSD	27.56 (± 5.4)
SUERO HIPERINMUNE	64.27 (± 8.27) [*]	NSD	28.10 (± 6.3)
FLUIDO INTESTINAL PREINMUNE	35.28 (± 8.9)	49.5 (± 10.3)	28.24 (± 6.1)
FLUIDO INTESTINAL INMUNE	36.27±(9.7)	88.57 (± 10.7) ^{**}	27.24 (± 7.2)
F1P1D4	38.78 (± 9.25)	60.71 (± 9.9) ^{***}	25.4 (± 8.9)
TPC15	31.57 (± 9.42)	35.38 (± 7.4)	23.38 (± 7.2)

^a Proporción 1:50 Trofozoito:Célula efectora (1X10⁴:5X10⁵).

^b Citotoxicidad Natural de las células linfoides (CN).

^c Los valores representan la media de 6 experimentos ± la desviación estándar, expresados como % de trofozoitos muertos. Las células se obtuvieron de los órganos linfoides de ratones BALB/c inmunizados intragástricamente con trofozoitos fijados con glutaraldehído al 2.5% con tres dosis en días consecutivos, repetidas cada 15 días durante tres meses. El % de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - (100) \frac{\text{No. de trofozoitos viables en tubos experimentales}}{\text{No. de trofozoitos viables en tubos controles}}$$

NSD No se determinó.

^{*} ADCC contra CN p = 0.05 por U de Mann-Whitney.

^{**} ADCC contra CN p < 0.001 por U de Mann-Whitney.

^{***} ADCC contra CN p < 0.05 por U de Mann - Whitney.

DISCUSION

Se han hecho importantes esfuerzos encaminados al estudio de la relación huésped-parásito en la amibiasis, en particular relacionados con el papel que juega el sistema inmune en el control y eliminación del parásito. Se ha visto que varias poblaciones celulares tienen efecto citotóxico sobre *E.histolytica* el cual parece incrementarse en presencia de anticuerpos anti-amibianos (197-200).

El esquema de inmunización utilizado en el presente trabajo usando la vía intragástrica y trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS fijados con glutaraldehído, nos permitió obtener un incremento moderado de las inmunoglobulinas de las clases IgG e IgM en el suero y en el caso del fluido intestinal la IgA se encontró incrementada con respecto a las otras inmunoglobulinas probadas, lo que coincide con los datos reportados por Moreno-Fierros y col. en 1995 (199). Dichos autores usaron varios esquemas de inmunización en ratones, (rectal, intragástrica, e intraperitoneal), con el propósito de inducir la producción de células formadoras de anticuerpos anti-amibianos en PP y bazo, encontrando una mayor producción de células formadoras de IgA, IgG, e IgM en PP cuando los animales recibieron cuatro dosis de trofozoítos fijados con glutaraldehído por la vía intragástrica. Cuando los animales se inocularon por las vías rectal e intraperitoneal se encontró mayor número de células productoras de IgM en células de bazo.

Estos autores mencionan que la estimulación sistémica resulta muy eficiente a nivel de bazo, mientras que la estimulación de células linfoides asociadas a la mucosa intestinal, indujo una mayor respuesta en términos de células formadoras de anticuerpos anti-amibianos en PP.

Nuestros resultados muestran que las células linfoides de bazo de animales inmunizados producen un aumento en su efecto citotóxico natural, lo cual puede deberse al estado de activación en el que se encuentran las células de animales inmunizados. En este sentido se ha reportado previamente por varios autores (70,185,198,) que la estimulación antigénica específica de células efectoras *in vivo*, incrementa significativamente la citotoxicidad *in vitro* contra los trofozoítos de *E. histolytica*. Lo

anterior se ha demostrado con diferentes tipos celulares: linfocitos (150,197), macrófagos (201), y neutrófilos (139) en varios modelos: murino, humano, hamster y cobayo. Por otro lado, estudios previos en modelos murinos han demostrado que tanto la IgG como la IgA con especificidad antibacteriana pueden armar linfocitos y expresar la ADCC (184,200). Interesantemente la actividad antibacteriana natural en ratones en algunos casos podría ser atribuible a una forma espontánea de ADCC-dependiente de IgA (202). En 1985 Tagliabue y col. (203) realizaron un trabajo en el que analizaron la actividad antibacteriana natural de linfocitos TCD4⁺ de humanos sanos contra *Salmonella typhimurium*, y observaron que la actividad antibacteriana natural era bloqueada con el tratamiento de linfocitos periféricos con fragmentos F(ab')₂ de cabra anti-IgA sérica humana, estas observaciones apoyan la hipótesis de que la actividad antibacteriana natural podría ser una forma de ADCC dependiente de IgA, ya que las células linfoides podrían estar recubiertas con anticuerpos IgA preexistentes específicos.

La citotoxicidad natural de las células de bazo de animales inmunizados aumentó en presencia de suero hiperinmune anti-amiba; estos resultados coinciden con los obtenidos y reportados por Saxena y col. (1986) (197), quienes observaron que las células de bazo eran capaces de ejercer un efecto citotóxico sobre trofozoítos de *E. histolytica in vitro*, demostrando que la sensibilización específica *in vivo* podía aumentar el potencial citotóxico de las células de bazo, especialmente cuando participan los anticuerpos anti-amiba de la clase IgG. En ese sentido, nuestros resultados también sugieren que el efecto citotóxico de las células linfoides obtenidas de bazo, sobre trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de suero, pudiera estar mediado por anticuerpos anti-amiba de la clase IgG. Esto ha sido documentado en otros modelos experimentales, Kanwar y col. (1986) (200), reportaron en el modelo de infección de ratones con *Giardia lamblia*, que las células linfoides de bazo requieren de anticuerpos para llevar a cabo un efecto citotóxico. Por otro lado, otros autores mencionan que los anticuerpos con isotipo IgG son predominantes en la mediación de la ADCC a nivel sistémico (171,204,205). Al parecer el fenómeno de citotoxicidad encontrado en el presente trabajo es un fenómeno independiente de la activación del complemento, ya que en todos nuestros experimentos

se utilizó suero hiperinmune anti-amiba inactivado por calor, esto, también ha sido ampliamente demostrado en otros modelos experimentales (185,205).

En cambio cuando las células linfoides de bazo tanto de animales inmunizados como no inmunizados, se pusieron en contacto con trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de fluido intestinal, no produjeron un efecto citotóxico significativo, probablemente debido a que en el fluido intestinal la IgAs predominan sobre el resto de los otros isotipos de anticuerpos, y esta Ig no es capaz de inducir un incremento en la función citotóxica natural de las células linfoides de bazo, al contrario de lo que sucede en el caso de la IgG.

Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente por Tagliabue y col. (1984) (195) en un modelo experimental de ADCC con bacterias enteropatógenas en ratones, donde se observó que la IgAs no es capaz de inducir actividad citotóxica contra *Shigella X-16* aún utilizando concentraciones equiparables de IgA y de IgG, esta última si participa mediando la ADCC con células linfoides de bazo murino.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la sensibilización *in vivo* y la presencia de anticuerpos antiamibianos (suero hiperinmune) pueden incrementar considerablemente la capacidad citotóxica de las células linfoides de bazo, lo cual coincide con observaciones hechas por otros investigadores. Vinayak y col. (1987) (186), Saxena y col. (1986) (197) intentaron definir la población celular y la naturaleza de los anticuerpos participantes en el evento citotóxico, a través de ensayos de remoción de poblaciones de células adherentes (monocitos/macrófagos) y linfocitos B, sin embargo, las células eluidas en las columnas de lana de nylon conservaron la capacidad citotóxica (células T, células NK y K).

Las células citotóxicas del linaje linfocítico son tres: las células K (Killer) quienes requieren anticuerpos específicos contra la célula blanco, pero no necesariamente previa sensibilización para ejercer su potencial citotóxico.

Las células T citotóxicas (CTL) las cuales por el contrario requieren de previa sensibilización pero no de anticuerpos específicos, y en este caso el fenómeno de citotoxicidad es un fenómeno restringido por moléculas de clase I de complejo principal

de histocompatibilidad (MHC) (68); el tercer tipo de células linfoides que pueden ejercer actividad citotóxica son las células NK o asesinas naturales las cuales pueden actuar en presencia o no de anticuerpos específicos y no requieren de sensibilización previa, sin embargo deben expresar receptores Fc para el blanco.

En nuestros experimentos la citotoxicidad observada en los ensayos de células linfoides no inmunes en ausencia de una fuente de anticuerpos (suero o fluido intestinal) representaría la actividad de células NK (Tablas 3, 4), y cuando estas mismas células se incubaron con el blanco (trofozoítos) en presencia de anticuerpos específicos (Tabla 4) tendríamos la actividad citotóxica de células K y NK, la cual en nuestros ensayos no resultó significativa con respecto a la citotoxicidad natural ($p > 0.05$) tanto en células de bazo como en las células de nódulos mesentéricos en presencia de anticuerpos séricos anti*amiba*. En las PP se observó un incremento mayor en la citotoxicidad cuando los experimentos se hicieron en presencia de fluido intestinal inmune ($p < 0.003$) (Tabla 4). De igual manera, las células linfoides provenientes de animales inmunes (Tabla 5) pudieran representar la actividad citotóxica de células NK y células K cuando los ensayos se realizaron en presencia de suero o fluido intestinal anti*amibiano*, sin embargo, es poco probable que los linfocitos T $CD8^+$ (Tc) pudieran tener un efecto citotóxico para trofozoítos de *E. histolytica*, especialmente en las poblaciones de células linfoides del bazo en donde la mayoría de los linfocitos T (en este caso citotóxicos) poseen receptores para antígeno de tipo $\alpha\beta$ los cuales funcionan de manera restringida por moléculas de tipo I del MHC. Aunque en algunos compartimentos del MALT intestinal se ha reportado un alto porcentaje de linfocitos T con receptor para antígeno $\gamma\delta$ los cuales podrían participar en un fenómeno citotóxico directo, ya que no están restringidos por moléculas del MHC; es poco probable que este fenómeno se presente en nuestro sistema, ya que éstos linfocitos están aumentados en el compartimento intraepitelial y en ganglios mesentéricos pero no en placas de Peyer (68), y existen datos que apoyan su participación en respuestas inmunes no restringidas por moléculas del MHC (68).

En el caso de la citotoxicidad obtenida en los experimentos realizados con células linfoides de PP (Tablas 4, 5), ya que se sabe que el mecanismo de ADCC en el intestino está básicamente mediado por IgAs se decidió omitir la realización de la ADCC con suero hiperinmune, sin embargo, encontramos que el fenómeno de citotoxicidad celular mediado por el fluido intestinal de animales inmunes es bastante claro, encontrando en el caso de células de PP de animales normales una diferencia significativa con respecto a la CN ($p < 0.003$) (Tabla 4), además dicha citotoxicidad aumentó significativamente (88.57%) cuando se usaron células de PP obtenidas de animales inmunes ($p < 0.001$) (Tabla 5).

Nuestros resultados correlacionan con otros estudios previos en donde se ha documentado claramente que la IgAs juega un papel importante en la mediación del fenómeno de ADCC con células linfoides no solo de PP sino de ganglios mesentéricos, Lámina Propria y espacio intraepitelial (184,195, 203).

Stafford y col. (1980) (174) encontraron en un modelo de conejo que tanto los linfocitos de bazo, como de PP y nódulos mesentéricos expresan el receptor RFc α sin embargo las células linfoides asociadas al GALT lo hacen en mayor proporción. Además Sell y col. quienes probaron la modulación de la expresión de este receptor sobre los linfocitos de bazo y PP utilizando un anticuerpo específico dirigido contra el fragmento Fab de la IgG de conejo, el cual es un mitógeno para los linfocitos de conejo (206), ya que induce proliferación de células B e inicia eventos típicos de estimulación antigénica. Dichos autores observaron que este anticuerpo incrementó significativamente la expresión del RFc α sobre los linfocitos de bazo y PP. Por otro lado se probó que es específico de IgA por estudios de inhibición con IgA soluble de la formación de rosetas con eritrocitos recubiertos de IgA y por medio del tratamiento con cicloheximida y actinomicina D lo que significa que se requiere de síntesis de proteínas para su expresión. Además demostraron que los RFc α pueden ser reexpresados *in vitro* después del tratamiento de linfocitos con pronasa. Por lo anterior se concluye que como en el caso del RFc μ (207,208), RFc γ (209,210) y el RFc ϵ (211,212), la expresión del RFc α puede ser

inducida sobre poblaciones celulares de tejidos inmunes importantes en el desarrollo de inmunidad mediada por IgA y bajo condiciones que probablemente imitan la estimulación antigénica lo que sugiere que la modulación del receptor para Fc de IgA puede ocurrir en el desarrollo o en la regulación de la respuesta inmune mediada por IgA.

Lo anterior refuerza nuestros resultados de ADCC realizados en presencia del anticuerpo monoclonal específico F1P1D4, el cual es una IgA dimérica que reconoce antígenos de superficie de trofozoítos de *E. histolytica*, éstos datos indican que en efecto, el monoclonal media por lo menos la muerte del 60 % de los trofozoítos en nuestros experimentos (Tabla 5), cuando se utilizan células efectoras de PP de animales inmunes.

Cabe mencionar que a diferencia de lo reportado por otros autores, nuestros experimentos realizados con células linfoides de ganglios mesentéricos no sugieren la participación de un mecanismo de citotoxicidad, que por un lado dependa del estatus inmunológico del donador de células efectoras (Tablas 3, 4, 5) y por otro lado, aunque se observó un aparente aumento porcentual en la citotoxicidad cuando se usaron células linfoides inmunes y fluido intestinal inmune, la comparación estadística de las diferencias no resultaron ser significativas ($p > 0.05$). Esto está en contraste con otros investigadores quienes han encontrado una clara citotoxicidad mediada tanto por IgAs como por células linfoides inmunes y no inmunes de ganglios mesentéricos en modelos de infección por otros patógenos gastrointestinales (184,195).

Puesto que la unión de los trofozoítos de *E. histolytica* a la pared intestinal es el evento que dispara la invasión de este organismo a su huésped, es importante el papel que desempeñan los anticuerpos a nivel local, y una de las funciones que cumplen es evitar la adhesión de los trofozoítos a las células epiteliales del intestino. De acuerdo a los resultados previos, en los que se ha demostrado la participación de la IgAs en eventos de ADCC, se considera a ésta como otra función de la IgAs en la protección contra parásitos y enterobacterias (181,184,195,203). Además de las células K y NK se han descrito diferentes poblaciones celulares, como células mononucleares, macrófagos,

linfocitos, y granulocitos en ratón y en humanos (171,205,213) las cuales expresan receptores Fc para la IgA. Grezel en 1993 (181) demostró un efecto sinérgico entre IgE e IgA en protección contra schistosomiasis en el modelo de rata, implicando a los eosinófilos como células efectoras, por otro lado, en otro estudio realizado por Li Shen (1981) (168) se demostró que la IgG e IgAs son capaces de actuar sinérgicamente en la promoción de ADCC por células PMN, monocitos y linfocitos humanos.

También es importante considerar la migración de granulocitos a los sitios de infección (171,205,203) donde se produce una respuesta inflamatoria, como en el caso de la amibiasis intestinal invasora en sus fases mas tempranas (214) donde los granulocitos participan en la ADCC, lo cual ha sido observado en modelos de infección por *Giardia lamblia* en humanos (171) y de *S.mansoni* en ratón (205).

Los datos anteriores ponen de manifiesto que son varias las poblaciones celulares que participan en la protección contra la invasión de agentes patógenos en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), y varios isotipos de Igs los que intervienen en ese evento de ADCC, sin embargo, parece ser muy clara la importancia que puede tener este fenómeno de ADCC mediado por IgAs, una vez que el fenómeno de inhibición de la adherencia de los trofozoítos a la mucosa intestinal ha fracasado. Lo anterior nos da una visión de la importancia de la respuesta inmune celular y humoral en el control y eliminación de patógenos a nivel local.

BIBLIOGRAFIA

1. Eguia y Muro, J.P., Disertación sobre las obstrucciones inflamatorias del hígado, 1790. Cited by Fournier. R., en Bibliografía Mexicana del Absceso Hepático Amibiano, La Prensa Médica Mexicana, México, 1956.
2. Moreno, M., Disertación sobre las obstrucciones inflamatorias del hígado, 1790, Cited by Fournier, R., en Bibliografía Mexicana del Absceso Hepático Amibiano, La Prensa Médica Mexicana, México, 1956.
3. Lösch, F.A., Massenhafte Entwicklung von Amoeben in Dickdarm, Virchows Arch. Pathol. Anat. Klin. Med. 1875; 65: 196.
4. Celis, A., y Alava, J. Patología de la pobreza. Rev. Med. Hosp. Gen. Mex. 1970;33:371.
5. Councilman, W.,T., y LaFleur, H.A. Amoebic dysentery. Johns Hopkins Hosp. Rep. 1891; 2: 393.
6. Quincke, H., y Ross, E. Über Amoeben-enteritis, Berl. Klin.Wchschr. 1893; 30: 1089.
7. Schaudinn, F., Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden, Arb. Kaiserl Ges. 1903; 19: 547.
8. Burrows, R., R. *Entamoeba harmannii*. Am. J. Hyg. 1957; 65: 172.
9. Kuenen, N., A., y Swellingrebel, N. Die Entamoeban der menschen und ihre praktische bedeutung, Zeitsch. Bact. 1913; 71: 378.
10. Musgrave, W.E. and Clegg, M.T. Amebas, their cultivation and etiological significance, Manila Bur. Govt. Laboratories. 1904.
11. Boeck, W.,C., y Drbohlav, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Hyg. 1925; 5: 371.
12. Brumpt, E. Étude sommaire de l' *Entamoeba dispar* nsp. Amibe a kystes quadrinuclees, parasite de l' homme. Bulletin Acad. Med. Paris. 1925; 94: 943. En: Cavalier S.T. Eukariotes with no mitochondria. Nature 1987; 326:326.

13. Dobell, C. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General introduction. II. Description of the whole life history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitol.* 1928; 20: 357.
14. Cleveland, L., R., Sanders, E., P., Encystation, multiple fision without encystation, metacystic development and variation in a pure line and nine strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch. F. Protosistenk.* 1930; 70: 15.
15. Faust, E., C., D' Antoni, J., S., y Odom, V., A. Critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cyst and helminth eggs in feces. *Am. J. Trop. Med.* 1938; 18: 169.
16. Ritchie, T. An ether sedimentation technic for routine stool examination. *Bull. U.S. Army Med. Dept.* 1956; 8: 826.
17. Diamond, L., S., Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* 1961; 134: 336.
18. Diamond, L., S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, and *Entamoeba histolytica* – like amebae. *J. Parasitol.* 1968; 54: 1047.
19. Thompson, P. E., Graedel, G., K., Schneider, C., R., Stucki, W., P., y Gordon, R., M. Preparation and evaluation of standarized amoeba antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. W. H. O.* 1968; 34: 349.
20. Izar, G. Sulla dissenteria da ameba, Nota IV, Presenza di anticorpi specifici nel siero di dissenterici (Disenteria da *Entamoeba tetragena*) *Ann. Clin. Med. Sper.* 1914; 5: 305.
21. Craig, C.,F. Laboratory diagnosis of protozoan diseases, Lea and Febiger, Filadelfia 1942.
22. Rees, C., W., Bozicevich, J., Reardon, L., W., y Jones, F., A. A preliminary note on the complement fixation test for amebiasis with antigens prepared from *Entamoeba histolytica* grown with a large single of bacteria. *Am. J. Trop. Med.* 1942; 22: 581.
23. Morris, M., N., Powel, S., J., y Elsdon-Dew, R. Latex agglutination test for invasive amebiasis. *Lancet.* 1970; 1: 1362.

24. Martínez-Palomo, A. en : The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press, Wiley, Chichester. 1982. pp 5-59.
25. Orozco, E., Solis, F., Domínguez, J., Chávez, B., y Hernández, F. *Entamoeba histolytica*: Cell cycle and nuclear division. Exp. Parasitol. 1988; 67: 85-95.
26. Solis, F., Barrios, R. *Entamoeba histolytica*: Microtubule movement during mitosis. Exp. Parasitol. 1991; 73: 276-284.
27. Argüello, C., Valenzuela, B. y Rangel, E. Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch. Med. Res. 1992; 23 (2): 77-80.
28. Meza, I., Torres-Guerrero, H., k., Meraz, M., A. Organización molecular de *Entamoeba histolytica* en: Kretschmer, R. Amibiasis infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Ed. Trillas. 1994. pp 36-62.
29. Diamond, L., S., y Clark, C., G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *dispar* Brumpt, 1925. J. Euk. Microbiol. 1993; 40: 340-344.
30. Sharma, N., N., Albach, R.,A., y Shaffer, J., G. Autoradiographic studies of uridine 5-H³ uptake on *Entamoeba histolytica* in the CLG medium. J. Protozool. 1969; 16: 405.
31. Albach, R., A., Booden, T., Bonlayangoor, P., y Downing, S., W. *Entamoeba histolytica* analysis of nuclear sites of RNA synthesis. Exp. Parasitol. 1977; 42: 248.
32. Albach, R., A., Booden, T., Downing, S., W. Site of synthesis of nuclear RNA in *Entamoeba histolytica* . J. Protozool. 1974; 21: 439.
33. Moody, S., Becker, S., Nuchamowitz, Y. y Mirelman, D. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* differ in their all surface phosphorylated glycolipids. Abstract Proceedings of the First Conference of the Israel Society for Experimental Biology, Eilat, Israel. 1995; 132.
34. Gitler, C., Clef, E., y Rosenberg, I. Citopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Phil. Trans. R. Soc. Londres. 1984; 307: 73.

35. Ortiz-Ortiz, L., Ximénez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E., I., y Oliva, A. *Entamoeba histolytica*: specific antigen recognized by monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 1986; 61: 390.
36. Ravdin, J., I., y Guerrant, R., L. Role of adherence in cytopathic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1981; 68: 1305-13.
37. McCoy, J.,J., Mann, B., J. y Petri W. A., Jr. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect and Immunity.* 1994; 62 (8): 3045-50
38. Flores-Romo, L., Tsutsumi, V., Estrada-García, T., Shibayama, M., Aubry, J.-P., Bacon, K.B., Martínez-Palomo, A. CD59 (protectina) molecule, resistance to complement, and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 88:116-117.
39. Gutiérrez-Kobeh, L., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R. A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 1997;83 (2):234-241.
40. Martínez-Palomo, A., Meza, I., Chávez, B., Rosales, E., J., L., Muñoz, M., L., González, R., A., y Rojkind, M. *Entamoeba histolytica*: activation and release of membrane dense bodies, en Chang, K., P., Snary, D. (eds.) *Host parasite cellular and molecular interactions*, Springer Verlag, Berlín. 1987. pp 371.
41. Takeuchi, A., y Phillips, B., P. Electron microscope studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in guinea pigs. Early cellular and vascular changes accompanying invasion of the lamina propria. *Virchows Arch. B.* 1976; 20: 1.
42. Petter, R., Rozenblatt, S., Nuchamowitz, Y., Mirelman, O. Chromosome walk in *Entamoeba histolytica*: the gene encoding for ribosomal protein L 21 neighbors one of the actin genes. *Arch. Med. Res.* 1992; 23(2): 45-8.
43. Espinoza-Cantellano, M., y Martínez-Palomo, A. *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* 1994; 79: 424-435.

44. Arhets, P., Gounon, P., Sansonetti, P., Guillen, N. Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Infect & Immun.* 1995; 63 (11): 4358-67.
45. Martínez-Palomo, A. Las amibas enemigos invisibles. SEP, 2nd ed. La ciencia desde México. 1987: 46.
46. Carrero, J., C., Laclette, J., P. Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: A Review. *Arch. Med. Res.* 1996; 27 (3): 403.
47. Reed, S., L., Curd, J., G., Gigli, I., Guillin, F., D., y Braude, A. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 1986; 136: 2265.
48. Calderón, J., y Schreiber, R., D. Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 1985; 50: 560.
49. Feachen, R., G., Bradley, D., J., Garelick, H., y Mara, D., D. Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management, John Wiley & Sons, N.Y., publicado por el World Bank, Washington, D.C. 1983; 337.
50. Boeck, W., C. The thermal death point of the human intestinal protozoan cysts. *Am. J. Hyg.* 1921; 1:365.
51. Schmidt, G., D., y Roberts, L., S. Foundations in Parasitology, 2^a ed. C.V., Mosby, St. Louis. 1981; 105.
52. Druckman, D., A., y Quinn, T., C. *Entamoeba histolytica* infections in homosexual men. En Ravdin, J., I. (ed), Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*, John Wiley & Sons, N.Y. 1988.
53. Nnochiri, E. Observations on childhood amebiasis in urban family units in Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.* 1965; 68: 231.
54. Schoenleber, A., W. The food handler as a transmitter of amebiasis. *Am. J. Trop. Med.* 1977; 20: 99.
55. Sepúlveda, B., y Martínez-Palomo, A. Amebiasis. En Warren, K., S., y Mahmoud, A., A., F. (eds.) Tropical and geographical medicine, McGraw Hill, N.Y. 1984; 305.

56. Petri, W., A., Jr., Clark, C., G., y Diamond, L., S. Host parasite relationships in amebiasis. *J. Infect. Dis.* 1994; 169: 483-484.
57. Orozco, E., Benítez-Bibriesca, L., Hernández, R. Invasion and metastasis mechanisms in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutation Research.* 1994; 305: 229-239.
58. Quigley, J., P. Proteolytic enzymes of normal and malignant cells, en: R. O. Hynes (Ed.). *Surface of normal and malignant cells*, Willey, London. 1979. pp 247-285.
59. Recklies, A., D., Mort, J., S., y Poolle, A., R. Secretion of a thiol proteinase from mouse mammary carcinomas and its characterization. *Cancer Res.* 1982; 42: 1026-1032.
60. Mackay, A., R., Corbitt, R., H., Hartzler, y Thorgeirsson, V., P. Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res.* 1990; 50: 5997-6001.
61. Rosenberg, I., Bach, D., Loew, L., M., Gitler, C. Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 33: 237.
62. Sargeant, P., G., y Williams, J., E. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1979; 73: 225-227.
63. Orozco, E., Suarez, M., E., y Sanchez, T. Different adhesion, phagocytosis and virulence in clones from *Entamoeba histolytica* strain HM1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* 1985; 15: 660-665.
64. Vargas, M., A., Garcia-Rivera, G., Gonzales, R., A., y Orozco, E. *Entamoeba histolytica* presents a variable degree of virulence, expresses different antigens and displays genome rearrangements through the process of axenitation, in preparation. 1994.
65. Mackenstedt, U., Johnson, A., M. Genetic differentiation of pathogenic and non pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 1995; 81(3):217-21.

66. Mirelman, D., Bracha, R., Wexler, A., Chayen, A. Change in isoenzyme patterns of a cloned culture of non pathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infect. Immun.* 1986; 54: 827.
67. Vargas, M., A., Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: changes in the zymodeme of cloned nonpathogenic trophozoites cultured under different conditions. *Parasitol. Res.* 1993; 79: 153-159.
68. Abbas, A., K., Lichtman, A., H., Pober, J., S. Cellular and molecular immunology. Ed. W. B. Saunders Company 1997.
69. Walsh, J., A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 1986; 8: 228.
70. Purnima, C., K., N., y Vinayak, V., K. Elicitation of protective immunity to *Entamoeba histolytica* an experimental study. *Immunol. Cell. Biol.* 1987; 65 (Pt3): 217-222.
71. Sepúlveda, B., y Treviño, G., M., N. Clinical manifestations and diagnosis of amebiasis. En Martínez Palomo, A. (ed), *Amebiasis*, Elsevier, Amsterdam. 1986; 170.
72. Trissl, D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4: 1154.
73. Aguirre, G., J. Peculiaridades histopatológicas de la lesión amibiana. *Arch. Inv. Med. México.* 1970; 1 (supl.1): 147.
74. Treviño, G., M., N. Espectro clínico de la amibiasis en adultos. En Kretschmer, R. (Ed.) *Amibiasis, infección y enfermedad por Entamoeba histolytica* Ed. Trillas. 1994. pp226-245.
75. Muñoz, O. Clinical spectrum of amebiasis in children. En Kretschmer, R. (Ed.) *Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica*, CRC Press, Boca Ratón, F.L. 1990.
76. Adams, E., B., y MacLeod, I., N. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications, *Medicine*, Baltimore. 1977; 56: 315.

77. Muñoz, O. Epidemiology of amebiasis. In Martínez-Palomo A. Ed. Amebiasis.: Elsevier Amsterdam. 1968: Chap. 7.
78. Martínez-Palomo, A., Martínez Baez, M. Selective primary health care: strategies for control of disease in developing world. X. Amebiasis. Rev. Infect. Dis. 1983; 5: 1093.
79. Gutiérrez, G., Muñoz, O. Epidemiology of amebiasis. In Kretzschmer R. (Ed.) Amebiasis: Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boca Ratón, F. L. 1990: Chap. 7.
80. Sepúlveda, B. Progress in amebiasis, Scand. J. Gastroenterol. 1982; 11: 153.
81. Walker, E., L. y Sellards. W., S. Experimental entamoebic dysentery, Philipp. J. Sci. B. Trop. Med. 1913; 8: 253.
82. Gutiérrez, G., Sánchez, R., J., Sánchez, R., y Mercado, A. Influencia de la edad en las características del absceso hepático del niño. Gac. Med. Méx. 1970; 100: 145.
83. Ramos, M., E., Martínez, M., F., Velasco, A., F., Flores, B., F., y Aguirre, G., J. Amibiasis: estudio comparativo de dos grupos de 5000 necropsias del Hospital General Dr. Bernardo Sepúlveda, del Centro Médico Nacional. Arch. Invest. Med. Méx. 1986; 17 (supl.1): 351.
84. Gutiérrez, G. Epidemiología y control de la amibiasis en México. Arch. Invest. Méd. Méx. 1986; 17 (supl.1): 375.
85. Martínez-García, M., C., Castro, D., J., M., Armenta, M., Muñoz, O., Gutiérrez, G. Características del absceso hepático amibiano en un hospital rural del altiplano mexicano. Arch. Invest. Med. Méx. 1986; 17: 335.
86. Haffar, A., Boland, J., Morren, S., y Edwards, S. Amebic liver abscess in children. Pediatr. Infect. Dis. 1982; 1: 322.
87. Treviño Manzo-G., N., Romero-E., C., Escobedo de la P., J., Hernández-R., J., M., Fierro-H., H. Amebiasis in the epidemiologic transition in México: its morbidity and mortality trends in the Mexican Institut of Social Security. Arch. Med. Res. 1994; 25 (4): 393.

88. Navarrete, E., J., Navarrete, C., E., Escandón, R., C., Escobedo de la P., J. Prevalencia de parasitosis intestinal en la población infantil de Santiago Jamiltepec, Oaxaca. Rev. Med. IMSS (Méx). 1993; 31: 157.
89. Gutiérrez, T., G. Características principales de la amibiasis invasora en el niño. Actualización de algunos conceptos clínicos y epidemiológicos. Arch. Invest. Med. (Méx). 1980; 11(Suppl): 281.
90. González, G.,M., y Gutiérrez, G. Reducción de la letalidad por absceso hepático amibiano. Experiencia de un hospital pediátrico mexicano. Arch. Invest. Med. Méx. 1986; 17 (Supl.1): 341.
91. Ventura, J., J., y Campos, R., R. Estudio morfológico del tejido linfoide asociado al intestino en Acosta, A., G., Cruz, L., M. Inmunología de las mucosas. Edit. D.E.M. S.A. de C.V. 1992. pp 90-98.
92. Kraehenbuhl, J., P., y Neutra, M., R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. Physiol. Revs. 1992; 72: 853-879.
93. MacGhee, J., R., Mestecky, J., Olson, Ch., O., y Kiyono, H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells interleukines. J. Clin. Immunol. 1989; 9: 175-199.
94. Roux, M., E., McWilliams, M., Philips-Quagliata, J., M., y Lamm, M., E. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. Cell. Immunol. 1981; 61: 141-153.
95. Hamman, A., Andrew, D., P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., y Butcher, E., C. Role of the $\alpha 4$ integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues *in vivo*. J. Immunol. 1994; 152: 3282-3295.
96. McWilliams, M., Philips-Quagliata, J., M., y Lamm, M., E. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. J. Exp. Med. 1977; 145: 866-875.

97. Staats, H., F., Jackson, R., J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., y McGhee, J., R. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immun.* 1994; 6: 572-583.
98. Kagnoff, M., F. Mucosal immunology: new frontiers. *Immunology Today.* 1996; 17 (2): 57-59.
99. Swartzwelder, J., C., y Avant, W., H. Immunity to amebic infection in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952; 1: 567.
100. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Calderón, P., y de la Torre, T. Neutralización de la virulencia en cultivos de *E. histolytica* con suero inmune. *Arch. Invest. Méd. Méx.* 1974; 5 (supl. 2): 447.
101. Islam, A., Stoll, B., J., Ljungstrom, I., Biswas, J., Nazrul, H., y Huldt, G. The prevalence of *Entamoeba histolytica* in lactating women and in their infants in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 89: 99.
102. Krupp, I., M., Jung, R., C. Immunity to amebic infections. En Cohen, S., y Sadun, E. (Eds), *Immunology of parasitic infections*, Blackwell, Oxford, 1975; 163.
103. Patterson, M., Healy, G., R., y Shabot, M. Serologic testing for amebiasis. *Gastroenterol.* 1980; 78: 136.
104. Sharma, P., Das, P., y Dutta, G., P. Use of glutaraldehyde-treated sheep erythrocytes in indirect haemagglutination test for amoebic coproantibody. *Indian J. Med. Res.* 1981; 74: 215.
105. Ramos, F., Valenzuela, O., Moran, P., Gonzalez, E., Ramiro, M., Cedillo, R., Martínez, M., C., Gómez, A., Muñoz, O., Melendro, E., I., Ximénez, C. Anti-*E. histolytica* IgA antibodies in saliva of *E. histolytica* or *E. dispar* infected individuals: longitudinal study of cohorts. *Arch. Med. Res.* 1997; 28, Suppl: s327-s329.
106. Martínez-Cairo, S., Gorab, A., Muñoz, O., y Reyes, M. Coproanticuerpos en amebiasis intestinal. *Arch. Invest. Méd. Méx.* 1979; 10: 121.
107. Harries, J. Amoebiasis: a review. *J. R. Soc. Med.* 1982; 75: 190.

108. Grundy, M., S., Cartwright-Taylor, L., Lundin, L., Thors, C., y Huldt, G. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. J. Clin. Microbiol. 1983; 17: 753.
109. Acosta, A., G., Torres, S., E., Meraz, E., Isibasi, A., y Kumate, J. Detección de anticuerpos de la clase IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en muestras de calostro humano. Arch. Invest. Méd. Méx. 1986; 17(supl.1): 291.
110. O'Shea-Alvarez, M., S., y Treviño-García, M., N. Presence of antiamebic antibodies in secretions from ileum, colon and feces in patients with amebic hepatic abscess. Arch. Invest. Méd. Méx. 1985; 16: 401.
111. Quezada, C., R., y López, R., R. Proteolisis de inmunoglobulinas por *Entamoeba histolytica*, en Proc. 7th Natl. Congr. Immunology, Méx. Absstr. 1987. pp 7.
112. Mulks, M., H. Microbiol IgA proteasas. En Holder, I. A. (Ed) Bacterial enzymes and virulence, CRC Press, Boca de Ratón, F.L. 1985, 82.
113. Sepúlveda, B. Immunology of amebiasis. En Larralde, C., Willms, K., Ortiz Ortiz, L., y Sela, M. (Eds) Molecules, cells and parasites in immunology. Academic Press, N. Y. 1980; 163.
114. Zuckerman, A. Current status of the immunology of blood and tissue protozoa. I. Leishmania. Exp. Parasitol. 1975; 38: 370.
115. Diamantstein, T., Klos, M., Gold, D., y Hahn, H. Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. J. Immunol. 1981; 126: 2084.
116. Kretschmer, R. Immunology of amebiasis. En Martínez-Palomo, A.,(Ed.). Amebiasis. Elsevier, Amsterdam. 1986.
117. Krupp, I., M., y Powell, S., J. Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1971; 20: 421.

118. Knobloch, J., y Mannweiler, E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32: 727.
119. Arellano, D., M., T., y Ortiz Ortiz, L. Algunas propiedades de la globulina específica del suero de pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. Invest. Méd. Méx.* 1974; 5 (supl. 2): 487.
120. Osisanya, J., O., S., y Warhurst, D., C. Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* 1980; 74: 605.
121. Jackson, T., T., H., G., Anderson, C., B., y Simjee, A., E. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984; 78: 342.
122. Savanat, T., Thammapalerd, N., Jaronvesma, N., y Bunnang, D. Total serum IgE in patients with amoebic liver abscess and other parasitic infections, en Sout Heast *Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1977; 8: 149.
123. Harris, W., G., Friedman, M., J., y Bray, R., S. Serial measurement of total and parasite specific IgE in an African population infected with *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1978; 72: 427.
124. Dasgupta, A. Immunoglobulin in health and disease. III. Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. *Clin Exp. Immunol.* 1974; 16: 163.
125. Caballero-S., A., Viveros-R., M., Salvatierra, B., Tapia-C., R., Sepúlveda, A., J., Gutiérrez, G., Ortiz-O., L. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50 (4): 412.
126. Burns, J.,W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.,A., Greenberg,H.,B. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 1996; 272:104-107.
127. Kaplan, B., S., Uni, S., Aikawa, M., Mahmoud, A., F. Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell mediated toxicity. *J. Immunol.* 1985; 3: 134.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

128. Wold, A., E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., y Svanborg, E., C. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type I fimbrial lectin. *Infection and Immunity*. 1990; 58 (9): 3073-3077.
129. Lowell, G., H., y col. IgA-dependent monocyte mediated antibacterial activity. *J. Exp. Med.* 1980; 152: 452..
130. Monteiro, R.,C., Hostoffer, R.,W., Cooper, M.,D., Bonner, J., R., Gartland, G.,L.,Kabagawa, H. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1681-1685
131. Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., Leyva, O., Melendro, E., I. Specific anti-*Entamoeba histolytica* IgA monoclonal antibodies. En *advances in mucosa immunology*. Edited by J. Mesteck et. al. Plenum Press, New York. 1995; 963.
132. Leyva, O., Rico, G., Ramos, F., Morán, P., Melendro, E., I., Ximénez, C. Inhibition of adhesion process mediated by anti-*Entamoeba histolytica* specific monoclonal IgA antibodies. *Arch. Med. Res.* 1992; 23 (2): 227.
133. Kretschmer, R. Immune consequences of amebiasis. *Ped. Infect. Dis.* 1986; 15: S109.
134. Tsutsumi, V., Mena, López, R., Anaya, Velázquez, F., y Martínez Palomo, A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 1984; 117: 81.
135. Sepúlveda, B., y Martínez Palomo, A. Immunology of amoebiasis by *Entamoeba histolytica*. En Cohen, S., Warren, K. S. (Eds.). *Immunology of parasitic infections*, 2 ed. Blackwell, Oxford. 1982; 170.
136. Salata, R., A., y Ravdin, J., I. N-Acetyl-galactosamine- inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 1985; 151: 816.
137. Jarumilinta, R., y Kradolfer, F. The toxic effect of *Entamoeba histolytica* on leukocytes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1964; 58: 375.

138. Chévez, A., Segura, M. Interacción entre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y los leucocitos de varias especies animales. Arch. Inv. Méd. Méx. 1974; 5: S373.
139. Guerrant, R., L., Brush, J., Ravdin, J., I., Sullivan, J., A., y Mandell, G., L. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis. 1981; 143 (1): 83.
140. Eaton, R., D., P., Meerovitch, E., y Costerton, J., W. The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1970; 64: 299.
141. Wang, W., Keller, K., Chadee, K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. Immunology. 1994; 83: 601-610.
142. Seguin, R., Keller, K., Chadee, K. *Entamoeba histolytica* stimulates the unstable transcription of c-fos and tumour necrosis factor- α mRNA by protein kinase C signal transduction in macrophages. Immunology. 1995; 86: 49-57.
143. Salata, R., A., Pearson, R., D., y Ravdin, J., I. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. J. Clin. Invest. 1985; 76: 491.
144. Ghadirian, E., y Kongshavn, P., A., L. Effect of silica on resistance of mice to *Entamoeba histolytica* infection. Infect. Immun. 1984; 45: 399.
145. Guerrero-Alcázar, M., Ríos, D., y Landa, L. Interactions between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and lymphocytes of patients with invasive amebiasis, en Sepúlveda, B., y Diamond, L., S. (Eds). Proc. Int. Conf. Amebiasis Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F. 1976; 529.
146. Cox, J., C., Salata, R., A., y Ravdin, J., I. The killing of virulent *Entamoeba histolytica* trophozoites by cytotoxic T-lymphocytes. Clin. Res. 1984; 32 (2): 365A.
147. Salata, R., A., Martínez Palomo, A., Murray, H., W., Conales, L., Treviño, W., Segovia, E., Murphy, C., F., y Ravdin, J., I. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune response effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. J. Immunol. 1986; 136: 2633.

148. Vinayak, V., K., Jain, P., Gupta, B., Kaushik, S., P., Sawhney, S. Cellular and humoral responses in amoeba. *Tropical and Geographical Medicine*. 1980; 32: 298-302.
149. Sharma, A., Haq, A., V., Siddiqui, M., V., Ahmad, S. Immunization of guinea pigs against *Entamoeba histolytica* using glucan as an adjuvant. *International Journal of Immunopharmacology*. 1984; 6: 483-491.
150. Vinayak, V., K., Chug, S., Saxena, A., Sharma, S., P. Antibody dependent lymphocyte mediated cytotoxicity in amoebiasis. *Indian Journal of Medical Research*. 1984; 80: 421-427.
151. Lamkhioved, B., Soussi, G., A., Gruart, V., Pierce, A., Capron, A., Capron, M. Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in Secretory IgA dependent activation. *Eur. J. Immunol*. 1995; 25: 117.
152. Bonnema, J.,D., Karnitz, L., M., Schoon, R.,A., Abraham, R.,T., Leibson, P., J. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in Natural Killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med*. 1994; 180: 1427-1435.
153. Berke, G. The fast-based mechanism of lymphocytotoxicity. *Human Immunology*. 1997; 54: 1-7.
154. Oshimi, Y., Shoji, O., Honda, Y., Nagata, S., Miyazaki, S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human Natural Killer cells. *J. Immunol*. 1996; 157: 2909-2915.
155. Brumbaugh, K.,M., Binstadt, B.,A., Leibson, P.,J. Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol*. 1998; 230:103-131.
156. Eischen, C., M., Schilling, J.,D., Lynch, D., H., Krammer, P., H., Leibson, P.,J. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol*. 1996; 156. 2693-2699.

157. Taga, K., Yamauchi, A., Kabashima, K., Bloom, E., T., Muller, J., Tosato, G. Target-induced death by apoptosis in human lymphokine-activated Natural Killer cells. *Blood*. 1996; 87 (6): 2411-2418.
158. Ahmad, A., Menezes, J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB*. 1996; 10: 258-266.
159. Jewett, A., Cavalcanti, M., Giorgi, J., Bonavida, B. Concomitant killing *in vitro* of both gp 120-coated CD4⁺ peripheral T lymphocytes and Natural Killer cells in the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) system. *J. Immunol.* 1997; 158: 5492-5500.
160. Bright, R., K., Shearer, M., H., Kennedy, R., C. Immunization of BALB/c mice with recombinant simian virus 40 large tumor antigen induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against simian virus 40-transformed cells. *J. Immunol.* 1994; 153: 2064-2071.
161. Sung, M-W., Nagashima, S., Johnson, J., T., Van dongen, G., A., M., S., Whiteside, T., L. The role of apoptosis in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against monolayers of human squamous cell carcinoma of the head and neck targets. *Cell. Immunol.* 1996; 171: 20-29.
162. Dickler, H., B. Lymphocyte receptors for immunoglobulin. *Adv. Immunol.* 1976; 24: 167.
163. Berman, M., y Weigle, W., O. B-lymphocyte activation by the Fc region of IgG. *J. Exp. Med.* 1977; 146: 241.
164. Ryan, J., L., Arbeit, R., D., Dickler, H., B., y Henkart, P., A. Inhibition of lymphocyte mitogenesis by immobilized antigen-antibody complexes. *J. Exp. Med.* 1975; 142: 814.
165. Warren, S., Hague, N., E., Lawrence, K., G., y Henkart, P., A. IgA -Fc receptors on mouse lymphoid cells. *J. Immun.* 1978; 121 (6): 2440-2445.
166. Chevalier, A., Monteiro, R., C., Kubagawa, H., y Cooper, M., D. Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear cells in blood and lymphoid tissue. *J. Immunol.* 1989; 142: 2244.

167. Yeaman, G., R., y Kerr, M., A. Opsonization of yeast by serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. Clin. Exp. Immunol. 1987; 68: 200.
168. Shen, L., y Fanger, M., W. Secretory IgA antibodies synergize with IgG in promoting ADCC by human polymorphonuclear cells, monocytes and lymphocytes. Cell. Immunol. 1981; 59: 75.
169. Lambert, P., H., Perrin, L., y Auderset, M., J. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 1973; 32: 960.
170. Eddie, D., S., Schulkind, M., L., y Robbins, J., B. J. Immunol. 1971; 106: 181.
171. Smith, P., D., Keister, D., B., y Elson, C., O. Human host response to *Giardia lamblia* II. Antibody-dependent killing *in vitro*. Cell. Immunol. 1983; 82: 308.
172. Radulescu, S., y Meyers, E., A. Opsonization *in vitro* of *Giardia lamblia* trophozoites. Infect. Immun. 1981; 32: 852.
173. Fanger, M., W., Shen, L., Pugh, J., y Bernier, G., M. Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980; 77 (6): 3640-3644.
174. Stafford, H., A., y Fanger, M., W. Receptors for IgA on rabbit lymphocytes. I. Distribution, specificity, and modulation. J. Immunol. 1980; 125 (6): 2461-2466.
175. Lamm, M., E. Cellular aspects of immunoglobulin A. Adv. Immunol. 1976; 22: 223.
176. Walker, W., A., Isselbacher, K., J. Intestinal antibodies. N. England. J. Med. 1977; 297: 767.
177. Monteiro, R., C., Kubagawa, H., y Cooper, M., D. Cellular distribution, regulation and biochemical nature of an Fc α receptor in humans. J. Exp. Med. 1990; 171: 597.
178. Williams, A., I., y Barclay, A., N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. Annu. Rev. Immunol. 1988; 6: 381.

179. Malizewski, C., R., March, C., J., Shoenborn, M., A., Gimpel, S., y Shen, Li. Expression and cloning of a human Fc receptor for IgA. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 1665-1672.
180. Ferguson, M., A., J., y Williams, A., F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57: 285.
181. Grezel, D., Capron, M., Grzych, J., M., Fontaine, J., Lecocq, J., P., y Capron, A. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm 28G ST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 454-460.
182. Lowell, G., H., McDermit, R., P., Summers, P., L., Reeder, A., A., Bertovich, M., J., y Formal, S., B. Antibody – dependent cell mediated antibacterial activity. K lymphocytes, monocytes and granulocytes are effective against *Shigella*. *J. Immunol.* 1980; 125: 2778.
183. Waldman, R., H., y Ganguly, R. Immunity to infection on secretory surfaces. *J. Infect. Dis.* 1974; 130: 419.
184. Tagliabue, A., Nencione, L., Villa, L., Keren, D., F., Lowell, G., H., y Boraschi. Antibody dependent cell mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA. *Nature.* 1983; 306: 184.
185. Chug, S., Saxena, A., Vinayak, V., K. Interactions between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and cells of the immune system. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1985; 63 (pt1): 1.
186. Vinayak, V., K., Purnima, y Saxena, A. Immunoprotective behavior of plasma membrane associated antigens of axenic *Entamoeba histolytica*. *J. Med. Microbiol.* 1987; 24: 287-302.
187. Tse, S-K., y Chadee, K. The interaction between intestinal mucus glycoproteins and enteric infections, *Parasitology Today.* 1991; 7: 7.
188. Belosevic, M., Faubert, G., M. *Giardia muris*: Correlation between oral dosage, course of infection, and trophozoite distribution in the mouse small intestine. *Exp. Parasitol.* 1983; 56: 93.

189. Koneman, Dowell, A., Sommers. Diagnóstico microbiológico. Ed. Méd. Panamericana. S.A. Buenos Aires, Argentina. 1983; 471.
190. Diamond, L., S., Harlow, D., R., Cunnick, C., C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Transc. Roy. Soc. Med. Hyg. 1978; 72 (4): 431.
191. Hudson. L. Practical Immunology. Third edition. Blackwell Scientific Publications. Ed. 1989; 312.
192. Laemmly, U., K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680.
193. Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., Enriquez-Rincón, F. 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. 1992; 23(2): 165.
194. Elson, Che, O., Ealding, W., Ufkowitz, J., A. Lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretory. J. Immunol. Meth. 1984; 67: 101.
195. Tagliabue, A., Boraschi, D., Villa, L., Keren, D., F., Lowell, G., H., Rappuoli, R., Nencione, L. IgA-dependent cell-mediated activity against enteropatogenic bacteria: distribution, specificity, and characterization of the effector cells. J. Immunol. 1984; 133:988.
196. Murray R. Spiegel. Teoría y problemas.: Estadística. McGraw Hill eds. Serie de compendios Shawm. 1969.
197. Saxena, A., Chugh, S., Vinayak, V., K. Elucitation of cellular polpulation and nature of anti-amoebic antibodies in cytotoxicity to *Entamoeba histolytica* (NIH:200). J. Parasit. 1986; 72(3): 434.
198. Saxena, A., Vinayak, V., K. Low susceptibility of trofozoites of virulent *Entamoeba histolytica* to cellular and antibody-dependent cellular cytotoxicity by guinea-pig effector cells. Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg. 1987; 81: 933.

199. Moreno-Fierros, L., Domínguez-Robles, Ma. C., Enríquez-Rincón, F. *Entamoeba histolytica*: Induction and isotype analysis of antibody producing cell responses in Peyer's patches and spleen after local and systemic immunization in male and female mice. *Exp. Parasitol.* 1995; 80: 541.
200. Kanwar, S., S., Ganguly, N., K., Walia, B., N., S., Mahajan, R., C. Direct and antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Giardia lamblia* by splenic and intestinal lymphoid cells in mice. *Gut* 1986; 27: 73.
201. Saxena, A., Chugh, S., Vinayak, V., K. Antibody dependent macrophage mediated cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*. *J. Med. Microbiol.* 1986; 22:17-21.
202. Tagliabue, A., Villa, L., Boraschi, D., Nencioni, L. IgA-dependent cell-mediated activity against entero pathogenic bacteria. En: *Mucosal Immunity. IgA and polymorphonuclear neutrophils*. N. Wierzbicki and J. P. Revillard, Eds.
203. Tagliabue, A., Villa, L., Boraschi, D., Peri, G., de Gori, V., Nencioni, L. Natural anti-bacterial activity against *Salmonella typhi* by human T4⁺ lymphocytes armed with IgA antibodies. *J. Immunol.* 1985; 135 (6): 4178.
204. Gale, R., P., Zigelboim, J. Polymorphonuclear leukocytes in antibody dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol.* 1975; 114 (3): 1047.
205. Kassis, A., I., Aikawa, M., Mahmoud, A., A., F. Mouse antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 1979; 122 (2): 398.
206. Sell, S. Studies on rabbit lymphocytes *in vitro*. V. The induction of blast transformation with sheep antisera to rabbit IgG subunits. *J. Exp. Med.* 1967; 125: 289.
207. Birch, R., E., Bernier, G., M., Fanger, M., W. Rabbit lymphocytes with receptors for IgM. I. The development of receptors on lymphocytes following intravenous injection of antigen. *Cell. Immunol.* 1979; 46: 348.
208. Lydyard, P., M., Fanger, M., W. Receptors for IgM on human lymphocytes. II. Mitogen modulation of receptor expression. *Clin. Exp. Immunol.* 1979; 37: 488.

209. Moretta, L., Mingari, M., C., Romanzi, C., A. Loss of the receptors for IgG from human T lymphocytes exposed to IgG immune complexes. *Nature* 1978; 272: 618.
210. Birch, R., E., Fanger, M., W., Bernier, G., M. B₂-macroglobulin enhances human lymphocyte surface receptor expression for IgG. *J. Immunol.* 1979; 122:997.
211. Yodoi, J., Ishizaka, K. Induction of Fcε-receptor bearing cells *in vitro* in human peripheral lymphocytes. *J. Immunol.* 1980; 124:934.
212. Yodoi, J., Ishizaka, T., Ishizaka, K. Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. II. Induction of Fcε-receptors bearing rat lymphocytes by IgE. *J. Immunol.* 1979; 123: 455.
213. Belosevic, M., Faubert, G., M. Comparative studies of inflammatory responses in susceptible and resistant mice infected with *Giardia muris*. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 65: 622.
214. Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A. Early invasive intestinal amebiasis in *Mongolian gerbils*. *Arch. Med. Res.* 1992; 23 (2): 187.