302827

# UNIVERSIDAD MOTOLINIA

## FACULTAD DE QUIMICA

# "RELACION HUESPED-PARASITO EN RATAS DESNUTRIDAS E INMUNOSUPRIMIDAS INOCULADAS CON E. chattoni".

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**FRANCISCO HUMBERTO MOSCOSO SANCHEZ**

MEXICO, D. F. 1986

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

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

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

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

# I N D I C E

CAPITULO I

1.- INTRODUCCION.

CAPITULO II

2.- GENERALIDADES.

CAPITULO III

3.- ABREVIATURAS.

CAPITULO IV

4.- MATERIAL.

4.1.- Instalaciones.
4.1.1.- Unidad de Microscopía Electrónica del Centro Hospitalario 20 de Noviembre. ISSSTE.
4.1.2.- Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina. UNAM.
4.1.3.- Departamento de Inmunoparasitológia del Hospital Infantil de México. SSA.
4.2.- Equipo.
4.3.- Materiales de consumo.
4.4.- Material de cristalería.
4.5.- Material biológico.
4.5.1.- 360 ratas machos Long Evans de 80 y 180 g.
4.5.2.- E. chattoni cepa PM 5.
4.6.- Instrumental de cirugía.

5.- METODO.

5.1.- Cultivo monoxénico de E. chattoni.

5.1.1.- Siembra.

5.1.1.1.- Agar salino.

5.1.1.2.- Eritromicina en solución.

5.1.1.3.- Bactopeptona.

5.1.1.4.- Ftalato de potasio.

5.1.1.5.- Almidón en polvo.

5.1.1.6.- Medio "R".

5.1.1.7.- Solución peptona al 10%.

5.1.1.8.- Medio "B R".

5.1.1.9.- Medio "B R S".

5.1.1.10.- Solución yodoiodurada.

5.1.2.- Cultivo.

5.1.2.1.- Agar salino.

5.1.2.2.- Eritromicina en solución.

5.1.2.3.- Bactopeptona.

5.1.2.4.- Ftalato de potasio.

5.1.2.5.- Almidón en polvo.

5.1.2.6.- Medio "R".

5.1.2.7.- Solución peptona al 10%.

5.1.2.8.- Medio "B R".

5.1.2.9.- Medio "B R S".

5.1.2.10.- Solución yodoiodurada.

5.1.3.- Subcultivo.

5.1.3.1.- Agar salino.

5.1.3.2.- Eritromicina en solución.

5.1.3.3.- Bactopeptona.

5.1.3.4.- Ftalato de potasio.

5.1.3.5.- Almidón en polvo.

5.1.3.6.- Medio "R".

5.1.3.7.- Solución peptona al 10%.

5.1.3.8.- Medio "B R".

5.1.3.9.- Medio "B R S".

5.1.3.10.- Solución yodoiodurada.

5.2.- Investigación del efecto producido por la desnutrición al 50% en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 durante tres periodos de incubación.

5.2.1.- Desnutrición previa (7 días) a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.2.1.1.- Sacrificio de los animales.

5.2.2.- Desnutrición simultánea a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.2.2.1.- Sacrificio de los animales.

5.3.- Determinación del efecto inmunosupresor originado por la inyección de Inmuran (Sigma) e Hidrocortisona (Cilag) en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 durante tres periodos de incubación.

5.3.1.- Inmunosupresión previa (7 días)a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.3.1.1.- Sacrificio de los animales.

5.3.2.- Inmunosupresión simultánea a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.3.2.1.- Sacrificio de los animales.

5.4.- Determinación del efecto inmunosupresor originado por la inyección de suero antilinfocito en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 en tres periodos de incubación.

5.4.1.- Inmunosupresión previa (7 días) a la inoculación intracecal de la ameba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.4.1.1.- Obtención del suero antilinfocito.

5.4.1.2.- Sacrificio de los animales.

5.4.2.- Inmunosupresión simultánea a la inoculación intracecal de la ameba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación.

5.4.2.1.- Obtención del suero antilinfocito.

5.4.2.2.- Sacrificio de los animales.

5.5.- Investigación de la inmunidad humoral en las ratas controles, desnutridas e inmunosuprimidas en forma previa y simultánea a la inoculación de E. chattoni cepa PM 5.

5.5.1.- Hemaglutinación pasiva.

5.5.1.1.- Solución de alsevers.

5.5.1.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.

5.5.1.3.- Preparación del antígeno.

5.5.1.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2.

5.5.1.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.

5.5.1.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.

5.5.1.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos de pH 6.4.

5.5.1.5.1.- Solución de fosfato - de potasio monobásico 0.15 M.

5.5.1.5.2.- Solución de fosfato - de sodio dibásico --- 0.15 M.

5.5.1.6.- Solución de ácido tánico al 1%.

5.5.1.7.- Suero normal de conejo inactivado a 56 °C.

5.5.1.8.- Sueros problemas de todos los lotes de ratas inactivados a 56 °C.

5.5.1.9.- Adsorción de los glóbulos rojos - de carnero.

5.6.- Determinación de las alteraciones histológicas en - cólon, intestino delgado e hígado en las ratas controles, desnutridas e inmunosuprimidas en forma previa y simultánea a la inoculación de amibas vistas al microscopio de luz.

5.6.1.- Conservación de los tejidos.

5.6.1.1.- Solución de formol neutro al 10%

5.6.2.- Preparación del tejido.

5.6.3.- Procesado del tejido.

5.6.3.1.- Deshidratación, aclaramiento e inclusión.

5.6.3.2.- Corte del tejido.

5.6.4.- Tinción con hematoxilina eosina.

5.6.5.- Tinción de PAS.

5.7.- Estudio en microscopía electrónica de las muestras de cólon, intestino delgado e hígado.

5.7.1.- Solución fijadora.

5.7.1.1.- Solución de glutaraldehido al 2%.

5.7.1.2.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1 M.

5.7.1.2.1.- Solución de fosfato - de sodio monobásico - 0.1 M.

5.7.1.2.2.- Solución de fosfato - de sodio dibásico --- 0.1 M.
5.7.1.3.- Solución de cloruro de calcio al 1%.
5.7.2.- Solución lavadora.
5.7.2.1.- Solución amortiguadora de fosfa-- tos salinos 0.1 M.
5.7.2.2.- Solución de cloruro de calcio al 1%.
5.7.3.- Postfijación del tejido.
5.7.4.- Deshidratación e inclusión.
5.7.5.- Polimerización del tejido.
5.7.6.- Corte del tejido.
5.7.7.- Montaje del tejido.
5.7.8.- Observación al microscopio electrónico.

CAPITULO V

6.- RESULTADOS.

CAPITULO VI

7.- DISCUSION.

CAPITULO VII

8.- CONCLUSION.

CAPITULO VIII

9.- BIBLIOGRAFIA.

## 1.- INTRODUCCION.

En la capacidad invasora de E. histolytica se involucran diversos factores, unos relacionados con el parásito y otros con el huésped.

Con respecto a los caracteres propios del parásito, los estudios de Sargeaunt, Jiménez y Kumate (10, 15, 16 y 17) han señalado el grupo isoenzimático II el que pertenece a una amiba invasora, y en relación al huésped se ha informado que la desnutrición o variaciones en la dieta en animales de experimentación favorece la capacidad invasora de este protozoario (6, 8, 14 y 27), lo cual no ocurre cuando los animales se encuentran bien nutridos. Así -- mismo se ha reportado que la inmunosupresión de animales llevada a cabo con esteroides (13, 15, 23, 26 y 28) o bien suero antilinfocito (25) se presenta con un incremento en la invasividad de este protozoario. Esto último se explica porque al suprimirse la inflamación por efecto de los corticoides y el suero antilinfocito la respuesta inmune interfiere con el equilibrio huésped-parásito.

Recientemente se han descrito amibas de primates con capacidad invasora (3 y 5), en éstas se han aislado antígenos que presentan similitud con los obtenidos de E. histolytica de tal forma que la única manera de diferenciar a estos dos protozoarios es -- desde el punto de vista isoenzimático (18).

Los objetivos de este trabajo fueron:

1.- Investigar si E. chattoni cepa PM 5 presenta el mismo -- comportamiento que E. histolytica cuando el huésped se - encuentra inmunosuprimido o desnutrido comparativamente con el control, lo cual nos estaría indicando su potencial de invasividad.

2.- Determinar si la antigenicidad de E. chattoni cepa PM 5 puede modificarse de acuerdo a la capacidad inmunológica del huésped, cuando está desnutrido o inmunosuprimido -- comparativamente con un huésped control señalados por el título de anticuerpos presentes.

3.- Determinar si el fenómeno de inmunosupresión o desnutrición en animales debe ser previo o establecido para favorecer la invasividad potencial de E. chattoni. De ser así el efecto patogénico sería atribuirle al huésped.

4.- O bien si la inmunosupresión o desnutrición simultánea a la inoculación amibiana es suficiente para que se desarrolle la invasividad de E. chattoni, de ser así el efecto patógeno sería atribuirle al parásito.

5.- Investigar si la patogenicidad producida por E. chattoni se encuentra en función de la edad de los animales, es decir, si la falta de desarrollo del sistema inmune facilita la capacidad invasora de esta amiba, o bien éste es un parámetro independiente.

## 2.- GENERALIDADES.

E. histolytica pertenece a la clase Rhizopoda, fue descubierta por Shaudinn (19) y más tarde Kartulis la describe como E. desinteriae (11). Así mismo Lösch (12) al estudiar la disentería crónica la aisla de úlceras intestinales.

El ciclo de vida es complejo y en el se producen algunos cambios morfológicos en el parásito; los más importantes desde el punto de vista médico son el quiste y el trofozoito; las formas intermedias el prequiste y el metaquiste son parte del ciclo biológico.

La semejanza morfológica de E. histolytica con amibas que parasitan otras especies como es el caso de E. invadens (1) en reptiles, sugirió que éstas últimas pudieran dar reacciones cruzadas desde el punto de vista antigénico, sin embargo ésto no ha sido posible.

En el caso de E. chattoni que parasita el intestino de primates se ha reportado que estas amibas tienen capacidad para vivir en el intestino del hombre (18) provocándole patología digestiva.

Esto hace sugerir que en el cuadro nosológico de la amibiasis no siempre E. histolytica sea el agente causal ya que morfológicamente estos dos protozoarios son semejantes.

Si consideramos que una buena parte de nuestra población se encuentra desnutrida (4 y 29) es de suponer que se facilite el instalarse este protozoario en el huésped como se ha reportado experimentalmente en ratas desnutridas (27) e infectadas con E. histolytica, así mismo cuando han inmunosuprimidos los animales y se les inocula con E. histolytica las lesiones producidas se incrementan comparativamente con el control.

La similitud antigénica entre E. histolytica y E. chattoni determinada por reacciones cruzadas planteó la posibilidad de semejanza en su comportamiento frente al huésped. Por lo que este estudio seguramente dará resultados interesantes, en donde los hallazgos obtenidos con una amiba aislada de primates presenta una conducta similar al de una amiba invasora.

3.- ABREVIATURAS.

| | |
|---|---|
| PM 5 | cepa de E. chattoni de primate mexicano |
| mg | miligramo |
| g | gramo |
| kg | kilogramo |
| M | concentración molar |
| N | concentración normal |
| Ml | microlitro |
| ml | mililitro |
| PBS | solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2 |
| $^{o}C$ | grados centígrados |
| $^{o}L-1$ | grados de libertad |
| n | número total de datos |
| "t" | "t" de student |
| Å | angstrom |
| HE | hematoxilina eosina |
| PAS | PA-Schiff |
| sshi | sin alteraciones histológicas de importancia |
| < | menor |
| HLL | hiperplasia linfomatosa ligera |
| HLM | hiperplasia linfomatosa moderada |
| HLA | hiperplasia linfomatosa acentuada |
| int delg | intestino delgado |
| no. | número de animales |

4.- MATERIAL.

4.1.- Instalaciones.

4.1.1.- Unidad de Microscopía Electrónica del Centro --- Hospitalario 20 de Noviembre. ISSSTE.

4.1.2.- Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina. UNAM.

4.1.3.- Departamento de Inmunoparasitología del Hospital Infantil de México. SSA.

4.2.- Equipo.

| | |
|---|---|
| Microscopio de luz | ZEISS |
| Microscopio electrónico | ZEISS M 10 y 9 |
| Ultramicrotomos | |
| Cortador de cuchillas de vidrio | |
| Espectrofotómetro | BECKMAN |
| Potenciómetro | CORNING MEDICAL MOD 5 |
| Estufa para polimerización | |
| Autoclave | PRESTO |
| Agitador magnético | |
| Balanza analítica | BOSCH P 115 |
| Bomba de vacío | VECO |
| Gradilla p/tubos | |
| Homogeneizador | PORTTER-ELVEHJEM |
| Incubadora | MEDI LAB MOD EH-201 |
| Mechero Bunsen | |
| Membrana de | 0.22 mm MILLIPORE |
| Papel filtro cualitativo | WHATMAN No. 1 |
| Micropipetas de | 10, 20, 50 y 100 lambdas |
| Procedador de tejidos | AMERICAN OPTICAL MOD 800 |
| Ultramicrotomo | AMERICAN OPTICAL MOD 820 |
| Baño de flotación | MCA. VOEKEL |
| Estufa a 37 $^{o}$C | MOD HDT-27 |
| Agujas Yale desechables calibre | 18 X 30 mm |
| Baño de hielo | |
| Refrigerador | WHIRLPOOL |
| Ultramicrotomo | PORTTER BLUM MT-2 |

4.3.- Materiales de consumo.

| | |
|---|---|
| Vidrio flotador solar gry o bronce de 6 mm de espesor | |
| Rejillas de cobre de 300 mallas | |
| Epon 812 | MERCK |
| DMP-30 | MERCK |
| Anhidrido dodecinil succinato | MERCK |
| Anhidrido metil nádico | MERCK |
| Oxido de propileno | MERCK |
| Glutaraldehido | MERCK |
| Alcohol absoluto | MERCK |
| Acetato de sodio | J. T. BAKER |
| Cloruro de sodio | J. T. BAKER |
| Veronal | J. T. BAKER |
| Acido clorhídrico decinormal | MERCK |
| Azul de toluidina | MERCK |
| Acetona | MERCK |
| Citrato de plomo | MERCK |
| Nitrato de uranilo | MERCK |
| Acetato de uranilo | MERCK |
| Acido fofotungstyco | MERCK |
| Papel fotográfico | KODAK |
| Película Kodak | KODAK |
| Revelador Kodak | KODAK |
| Fijador Kodak | KODAK |
| Cloruro de sodio | J. T. BAKER |
| Fosfato de sodio monobásico | J. T. BAKER |
| Fosfato de sodio dibásico | J. T. BAKER |
| Flebocortid | CILAG |
| Inmuran azathioprine | SIGMA |
| L-cisteina | SIGMA |
| Dextrosa | J. T. BAKER |
| Peptona biotriptasa | BIOXON |
| Acido ascórbico | J. T. BAKER |
| Citrato de amonio férrico | J. T. BAKER |
| Hidróxido de sodio | J. T. BAKER |
| Adyuvante completo de Freud | CAPELL |

| | |
|---|---|
| Suero bovino | BIOLAB |
| Mezcla de vitaminas | BIOLAB |
| Fenol | J. T. BAKER |
| Formol | J. T. BAKER |
| Extran | MERCK |
| Alcohol etílico absoluto | MERCK |

4.4.- Material de cristalería.

Cajas Petri de 60 X 15 mm
Cámara de Newbauer (cuenta glóbulos)
Embudo tallo largo
Embudo de porcelana de 10 cm. de diámetro
Matraz kitasato de 500 ml.
Frascos ámbar de 200 ml.
Matraces Erlenmeyer pyrex de 125 y 250 ml.
Pipetas para glóbulos blancos
Pipetas serológicas graduadas de 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 ml.
Pipetas Pasteur de 20 cm. de largo
Probetas pyrex de 100, 500 y 1000 ml.
Termómetro con escala hasta 100 °C
Tubos para centrífugar de 50 ml. con tapón de rosca
Tubos de ensaye pyrex de 15 X 125 mm con tapón de rosca
Vasos de precipitado pyrex de 10, 50, 100, 250 y 500 ml.
Jeringas estériles de 1, 5 y 10 ml.
Placas para hemaglutinación limbro con 96 orificios
Frascos de capacidad de 125 ml.

4.5.- Material biológico.

4.5.1.- Animales de experimentación.

4.5.1.1.- 180 ratas LOng Evans de 1 mes de edad con peso promedio de 80 g.

4.5.1.2.- 180 ratas Long Evans de 6 meses de --- edad con peso promedio de 180 g.

4.5.2.- E. chattoni cepa PM 5.

4.6.- Instrumental de cirugía.

Tijera Mayo

Pinzas de disección con dientes
Pinzas de disección sin dientes
Bisturí
Porta aguja
Hilo de sutura CATGUT 000
Violeta de genciana
Gasa
Algodón
Navaja de rasurar
Tijera recta.

5.- METODO.

5.1.- Cultivo monoaxénico de E. chattoni.

5.1.1.- Siembra:

5.1.1.1.- Agar salino.

Se preparó agar al 1.5% con NaCl al -- 0.7% el cual fue distribuido en fras-- cos de vidrio con tapón de rosca en -- alícuotas de 2.5 ml. cada uno, se esterilizó a 15 libras durante 15 minutos para después dejarlos enfriar en forma inclinada.

5.1.1.2.- Eritromicina en solución.

Se preparó una solución de eritromicina a una concentración de 5 ug/ml con agua estéril, posteriormente se colocó en frascos de vidrio con tapón de rosca.

5.1.1.3.- Bactopeptona.

Se preparó una solución de peptona al 20% y se esterilizó a 15 libras por 15 minutos colocándose también en alícuotas de 2.5 ml.

5.1.1.4.- Ftalato de potasio.

Se pesaron 204 g de ftalato de potasio,

se disolvió con 100 ml. de NaOH al 40%, se ajustó el pH a 6.3 y se llevó a un volumen de 2 000 ml., posteriormente - se esterilizó a 15 libras por 15 minutos, la solución de trabajo se utilizó llevando a cabo una dilución de 1:10 - con agua estéril.

5.1.1.5.- Almidón en polvo.

El almidón es surtido por la casa Drug Houses de Inglaterra.

5.1.1.6.- Medio "R".

Se preparó una solución concentrada de la siguiente manera: 125 g de NaCl, -- 50 g de ácido cítrico monohidratado, - 12.5 g de fosfato monobásico, 25 g de sulfato de amonio, 1.25 g de sulfato - de magnesio heptahidratado, 100 ml. de ácido láctico, todo esto se disolvió y se llevó a 2 500 ml. con agua destilada. De esta solución se tomaron 100 ml. y se adicionaron 7.5 ml. de NaOH al 40% y 2.5 ml. de azul de bromotimol al --- 0.04%, previamente se ajustó el pH a - 7.3, y se aforó a 1 000 ml. con agua - destilada. Se esterilizó en autoclave a 15 libras por 15 minutos.

5.1.1.7.- Solución peptona al 10%.

Este es el medio de cultivo que se utilizó para hacer crecer la cepa "B" de E. coli, la cual fue donada por el Dr. Sargeaunt (College of Tropical Medicine, Londres, Inglaterra).

5.1.1.8.- Medio "B R".

100 ml de medio "R" se utilizaron para cultivar una gota de cultivo de E. coli cepa "B" a 37 $^{o}$C durante 48 horas, pos

teriormente se pudo guardar a temperatura ambiente durante dos meses.

5.1.1.9.- Medio "B R S".

Se utilizó el medio "B R" mas el mismo volumen de suero bovino, se filtró y - calentó a 56 °C.

5.1.1.10.-Solución yodoiodurada.

Se preparó mezclando 1 g de yodo, 2 g de yoduro de potasio y 300 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO.-

Aproximadamente 50 mg de materia fecal de un primate en donde se demostró la presencia de E. chattoni fue sembrada en un frasco que contenía --- agar salino en forma inclinada, a éste se le adicionó 4 gotas de eritromicina preparada como se indica en el inciso 5.1.1.2; 5 mg de almidón en polvo y 2 ml de medio "B R" preparado de acuerdo al inciso 5.1.1.8 y se le dejó cultivar durante 24 horas a 37 °C.

5.1.2.- Cultivo.

5.1.2.1.- Agar salino.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.1.

5.1.2.2.- Eritromicina en solución.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.2.

5.1.2.3.- Bactopeptona.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.3.

5.1.2.4.- Ftalato de potasio.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.4.

5.1.2.5.- Almidón en polvo.

Ver el inciso 5.1.1.5.

5.1.2.6.- Medio "R".

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.6.

5.1.2.7.- Solución peptona al 10%.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.7.

5.1.2.8.- Medio "B R".

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.8.

5.1.2.9.- Medio "B R S".

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.9.

5.1.2.10.-Solución yodoiodurada.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.10.

PROCEDIMIENTO.-

Al frasco con la siembra de la amiba se le descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur y se le adicionó 2 gotas de eritromicina preparada como se indica en el inciso 5.1.1.2, 5 mg de almidón en polvo, 2 gotas de peptona al 20% preparada de acuerdo al inciso 5.1.1.3, 1.5 ml de la solución diluida de ftalato de potasio preparado de acuerdo al inciso 5.1.1.4, 2 ml de medio "B R S" preparado como se indica en el inciso 5.1.1.9 y se le dejó cultivar por otras 24 horas.

5.1.3.- Subcultivo.

5.1.3.1.- Agar salino.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.1.

5.1.3.2.- Eritromicina en solución.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.2.

5.1.3.3.- Bactopeptona.

La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.3.

5.1.3.4.- Ftalato de potasio.
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.4.

5.1.3.5.- Almidón en polvo.
Ver el inciso 5.1.1.5.

5.1.3.6.- Medio "R".
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.6.

5.1.3.7.- Solución peptona al 10%.
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.7.

5.1.3.8.- Medio "B R".
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.8.

5.1.3.9.- Medio "B R S".
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.9.

5.1.3.10.-Solución yodoiodurada.
La solución fue preparada de acuerdo - al inciso 5.1.1.10.

PROCEDIMIENTO.-

Con mucho cuidado del fondo del frasco que contenía el cultivo de las amibas, se tomó con pipeta Pasteur 1 gota que se colocó en un portaobjetos, se le adicionó 1 gota de lugol preparado de acuerdo al inciso 5.1.1.10, se cubrió con un cubreobjetos y se hizo la observación al microscopio del crecimiento del cultivo, las amibas viables se mostraron teñidas por el lugol. Tambien del fondo del frasco se tomó una gota como inóculo para hacer el segundo subcultivo que se preparó en la misma forma como se describió para el - primero.

5.2.- Investigación del efecto producido por la desnutrición - al 50% en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa -- PM 5 durante tres periodos de incubación.

5.2.1.- Desnutrición previa (7 días) a la inoculación intracecal de la ameba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g). Estos fueron desnutridos restringiendo su alimentación al 50% con respecto al grupo control durante 7 días. Después de este periodo se inocularon intracecalmente con 100 000 trofozoitos de - E. chattoni cepa PM 5. El procedimiento de desnutrición al 50% fue continuado durante 7, 15 y 30 días, se anotó el peso de los animales. Otros 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se tomaron como grupo control y fueron alimentados ad libitum e inoculados con - 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 en igual forma que el grupo experimental.

5.2.1.1.- Sacrificio de los animales.

Los animales se anestesiaron con éter etílico anhidro y por punción cardíaca se tomó sangre para la determinación - de anticuerpos antiameba. Se resuró la cavidad abdominal y se colocó un antiséptico cutáneo para llevar a cabo la laparatomía en la cual se abrió la cavidad abdominal con el objeto de determinar alteraciones macroscópicas y se tomó tejido del cólon, intestino delgado e hígado para su estudio histopatológico al microscopio de luz y electrónico.

5.2.2.- Desnutrición simultánea a la inoculación intracecal de la ameba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g).

Estos fueron inoculados intracecalmente con ---- 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5'y + simultáneamente se inició su desnutrición alimentándolas al 50% con respecto al control durante 7, 15 y 30 días, se anotó el peso de los animales. Otros 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se consideraron como grupo control los cuales fueron alimentados - ad libitum e inoculados intracecalmente con ---- 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 en igual forma que el grupo experimental.

5.2.2.1.- Sacrificio de los animales.

El procedimiento utilizado se indica - en el inciso 5.2.1.1.

5.3.- Determinación del efecto inmunosupresor originado por la inyección de Inmuran (Sigma) e Hidrocortisona (Cilag) en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) -- inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 durante tres periodos de incubación.

5.3.1.- Inmunosupresión previa (7 días) a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g). Estos fueron inyectados subcutáneamente con Inmuran a 80 mg $kg^{-1}$ y a las 24 horas con Hidrocortisona a 125 mg $kg^{-1}$, se les dejó en reposo 7 días y posteriormente se inocularon intracecalmente - con 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5. Ocho días después se inyectó subcutáneamente de nuevo Inmuran a la dosis antes mencionada, a las 24 horas se inyectó Hidrocortisona a la dosis antes descrita. El esquema de inmunosupresión se - repitió 7, 15 y 30 días como periodos de incubación despues de la inoculación de la amiba, se - anotó el peso de los animales. Otros 6 lotes de

10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se tomaron como el grupo control a los -- que se inyectó 0.5 ml de solución salina y se -- inoculó con 100 000 trofozoitos siguiendo el mismo esquema experimental.

5.3.1.1.- Sacrificio de los animales.

El procedimiento utilizado se indica - en el inciso 5.2.1.1.

5.3.2.- Inmunosupresión simultánea a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g). La inyección subcutánea con Inmuran a 80 mg $kg^{-1}$ fue simultánea a la inoculación intracecal con - 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5, a las 24 horas se inyectó Hidrocortisona a 125 mg $kg^{-1}$, ocho días después se inyectó nuevamente Inmuran y a las 24 horas Hidrocortisona, el esquema se repitió concediendo 7, 15 y 30 días como - periodos de incubación despues de la inoculación de la amiba, se anotó el peso de los animales. - Otros 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se tomaron como el grupo control a los que se les inyectó 0.5 ml de solución salina y se inoculó intracecalmente con - 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 en igual forma que al grupo experimental.

5.3.2.1.- Sacrificio de los animales.

El procedimiento utilizado se indica - en el inciso 5.2.1.1.

5.4.- Determinación del efecto inmunosupresor originado por la inyección de suero antilinfocito en ratas Long Evans de dos pesos diferentes (80 y 180 g) inoculados con trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5 en tres periodos de incubación.

5.4.1.- Inmunosupresión previa (7 días) a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g). Estos fueron inyectados subcutáneamente con ---- 0.5 ml de suero antilinfocito, se les dejó en reposo 7 días y posteriormente se inocularon intracecalmente con 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5. Ocho días después se inyectó nuevamente en forma subcutánea 0.5 ml de suero antilinfocito. El esquema de inmunosupresión se repitió durante 7, 15 y 30 días que fueron considerados como periodos de incubación posteriores a la inoculación de la amiba, se anotó el peso de los animales. Otros 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se tomaron como el grupo control a los que se les inyectó --- 0.5 ml de suero normal de conejo y se inoculó -- con 100 000 trofozoitos siguiendo el mismo esquema experimental.

5.4.1.1.- Obtención del suero antilinfocito.

En forma estéril se extrajo el timo de ratas jóvenes (8 días), se homogenizó y se adicionó igual volumen de cloruro de amonio 0.85% frío. Se lavó 3 veces con PBS preparado de acuerdo al inciso 5.5.1.4 y subincisos, aproximadamente $8 \times 10^7$ células con adyuvante completo de Freund fueron inyectadas en la vena de la oreja de un conejo y cada 7 días subcutáneamente. Este esquema se repitió durante 1 mes. El conejo se dejó - en reposo durante 7 días y posteriormente se sangró del corazón y se guardó el suero a -20 $^{o}$C. Se comprobó la -

presencia de anticuerpos antilinfocitos por la prueba de inmunodifusión de Ouchterlonii (21).

5.4.1.2.- Sacrificio de los animales.

El procedimiento utilizado se indica en el inciso 5.2.1.1.

5.4.2.- Inmunosupresión simultánea a la inoculación intracecal de la amiba y posteriormente llevada a cabo durante 7, 15 y 30 días de incubación. Aleatoriamente se obtuvieron 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g). La inyección subcutánea con 0.5 ml de suero antilinfocito fue simultánea a la inoculación intracecal con 100 000 trofozoitos de E. chattoni cepa PM 5. Ocho días después se inyectó subcutáneamente 0.5 ml de suero antilinfocito. El esquema de inmunosupresión se repitió a los 7, 15 y 30 días constituyendo los tres periodos de incubación después a la inoculación de la amiba, se anotó el peso de los animales. Otros 6 lotes de 10 ratas cada uno, de dos diferentes pesos (80 y 180 g) se tomaron como el grupo control a los que se les inyectó 0.5 ml de suero normal de conejo y se inoculó con 100 000 trofozoitos siguiendo el mismo esquema experimental.

5.4.2.1.- Obtención del suero antilinfocito.

Se preparó de acuerdo al inciso 5.4.1.1.

5.4.2.2.- Sacrificio de los animales.

El procedimiento utilizado se indica en el inciso 5.2.1.1.

5.5.- Investigación de la inmunidad humoral en las ratas controles, desnutridas e inmunosuprimidas en forma previa y simultánea a la inoculación de amibas.

5.5.1.- Hemaglutinación pasiva.

Después del periodo de incubación a todos los lotes se les extrajo sangre y se determinó el títu

lo de anticuerpos antiamibianos por hemaglutinación pasiva.

5.5.1.1.- Solución de alsevers.

Se pesaron 2.05 g de glucosa, 0.8 g de citrato de sodio, 0.085 g de ácido cítrico y 0.42 g de cloruro de sodio, -- los cuales fueron disueltos y se llevaron a un volumen de 100 ml con agua - destilada. Se esterilizó por 10 minutos a 121 °C.

5.5.1.2.- Suspensión de glóbulos rojos de carnero.

Se tomó un volumen igual de glóbulos - rojos de carnero y la solución de alsevers ya preparada y se guardó en refrigeración a 4 °C durante 10 días para - su maduración.

5.5.1.3.- Preparación del antígeno.

Se tomó 1 ml de la cepa E. chattoni -- PM 5 y se homogenizó.

5.5.1.4.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2 (22).

5.5.1.4.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.

Se pesaron 10.20 g de fosfato de potasio monobásico y se disolvieron en 500 ml de agua destilada.

5.5.1.4.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.

Se pesaron 20.15 g de fosfato de sodio dibásico y - se disolvieron en 500 ml - de agua destilada.

PROCEDIMIENTO.-

Se mezclaron 24 ml de la solución de - fosfato de potasio monobásico con 76 ml

de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de solución salina isotónica al 0.085%.

5.5.1.5.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos de pH 6.4.

5.5.1.5.1.- Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M. Solución preparada de acuerdo al inciso 5.5.1.4.1.

5.5.1.5.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M. Solución preparada de acuerdo al inciso 5.5.1.4.2.

PROCEDIMIENTO.-

Se mezclaron 67.8 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 32.2 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de solución salina - isotónica al 0.085%.

5.5.1.6.- Solución de ácido tánico al 1%.

Se peso 1 g de ácido tánico y se le adicionaron 99 ml de la solución salina isotónica al 0.085%, se guardo en refrigeración a 4 $^{o}$C. De esta solución - se hizo una dilución 1:200, para tener la solución de trabajo de ácido tánico a una dilución 1:20 000.

5.5.1.7.- Suero normal de conejo inactivado a -- 56 $^{o}$C.

Por punción cardiaca se extrajo sangre de un conejo de la raza Nueva Zelanda con un peso aproximado de 3 kg y se -- centrifugó a 500 X G durante 15 minutos y se separó el suero almacenándolo en un frasco para ser inactivado a --- 56 $^{o}$C durante 30 minutos.

5.5.1.8.- Sueros problemas de todos los lotes de ratas inactivados a 56 °C.

Por punción cardiaca se extrajo sangre de todos los lotes de ratas y se centrifugó a 500 X G durante 15 minutos y se separó el suero almacenándolo en tubos de ensaye para ser inactivados a 56 °C durante 30 minutos.

5.5.1.9.- Adsorción de los glóbulos rojos de carnero.

Se tomaron 3 ml de los glóbulos rojos de carnero almacenados en solución de alsevers estéril, se lavaron 3 veces - con solución salina isotónica y se preparó una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero.

Después se les añadió 3 ml de suero normal de conejo inactivado y se les dejó reposar durante toda la noche en refrigeración a 4 °C. Al día siguiente se - centrifugó a 500 X G durante 15 minutos y se le separó el suero de conejo adsorbido y se hizo una dilución 1:100.

Se tomó el paquete de glóbulos rojos - de carnero y se les añadió 3 ml de ácido tánico diluido 1:20 000 y se incubó a 37 °C en la estufa durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a -- 500 X G durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante, se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2 y se centrifugó a 500 X G por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en solución a-- mortiguadora de fosfatos salinos ----- pH 6.4, se centrifugó a 500 X G por 15 minutos decantando sobrenadante.

Los glóbulos rojos de carnero tanizados se les adicionó 4 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1 ml de antígeno, se centrifugó y se decantó el sobrenadante y se añadió -- 2 ml de suero normal de conejo adsorbido diluido 1:100.

Se centrifugó a 500 X G y al sedimento se le añadió nuevamente suero normal de conejo adsorbido diluido 1:100.

Se preparó el control positivo con 1 ml de glóbulos rojos de carnero tanizados al 2% con 4 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1 ml del homogeneizado de la cepa E. chattoni. El control negativo fue preparado con 1 ml de glóbulos rojos de carnero tanizados al 2% y 4 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4, en ausencia de antígeno amibiano.

PROCEDIMIENTO.-

Utilizando placas de Limbro se llevaron a cabo diluciones de los sueros obtenidos de las ratas en proporción logarítmica, es decir: 1:2; 1:4; 1:8; -- 1:16; 1:32; 1:64; etc. teniendo como - diluyente el suero normal de conejo adsorbido diluido 1:100, para lo cual se emplearon 100 lambdas de cada suero.

Posteriormente se le añadió 20 lambdas de glóbulos rojos de carnero tanizados al 2% forrados con el antígeno de la - cepa E. chattoni y se les dejó reposar por 24 horas, después se procedió a -- realizar las lecturas de los títulos - de anticuerpos presentes en el suero de

las ratas.

5.6.- Determinación de las alteraciones histológicas en cólon, intestino delgado e hígado en las ratas controles, desnutridas e inmunosuprimidas en forma previa y simultánea a la inoculación de amibas.

5.6.1.- Conservación de los tejidos.

Los tejidos extraídos se sumergieron en una solución de formol neutro al 10%.

5.6.1.1.- Solución de formol neutro al 10%.

Se tomó la densidad del formol y de acuerdo a ésta se calculan las cantidades requeridas de formol y agua para tener una solución al10%, se tomaron 100 ml de ella y se le añadieron 4 g de fosfato de sodio dibásico y se llevó a un volumen total de 1 000 ml con agua destilada.

5.6.2.- Preparación del tejido.

Se hicieron cortes seleccionados del cólon, intestino e hígado con ayuda de un bisturí, éstos fueron encapsulados y lavados con agua corriente por 24 horas.

5.6.3.- Procesado del tejido.

Las porciones de tejido seleccionadas fueron sometidas a deshidratación en un procesador de tejidos "American Optical" No. 8 000.

5.6.3.1.- Deshidratación, aclaramiento e inclusión.

Los cortes de tejido fueron deshidratados con 3 alcoholes etílicos al 96% y 3 alcoholes absolutos, el aclaramiento se llevó a cabo con una mezcla de xilol-xileno y se incluyeron con 3 parafinas utilizando una más fina para hacer la inclusión del tejido y formar el cubo para su corte.

5.6.3.2.- Corte del tejido.

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo Mod. 820 "American Optical" -- con un espesor de 3 micras. Posteriormente se colocaron los cortes en un baño de flotación marca Voekel, a una -- temperatura de 46 °C, de ahí se pasaron los cortes en un portaobjetos y se llevaron a una estufa Mod HDT-27, a -- una temperatura de 50 °C.

5.6.4.- Tinción con hematoxilina eosina.

Después de realizar el proceso de desparafinización y deshidratación se tiñó con hematoxilina - eosina, que consiste en:

1.- lavar con agua destilada.
2.- meter en hematoxilina de Ferres -- por 15 minutos.
3.- pasar por agua destilada.
4.- pasar por una solución alcohol-ácido 1:1.
5.- lavar con agua destilada.
6.- pasar por agua amoniacal.
7.- lavar con agua destilada.
8.- pasar por eosina por 1 minuto.
9.- pasar por alcohol al 95%.
10.-pasar por alcohol absoluto.
11.-pasar por alcohol absoluto.
12.-pasar por xilol.
13.-pasar por xilol.
14.-se realizó el montaje con resina.
15.-se le coloca un cubreobjetos de -- 24 X 40 mm para su estudio en el - microscopio de luz.

La observación al microscopio de luz.

Después de haber teñido los tejidos fueron observados al microscopio para buscar la presencia de:

a.- absceso
b.- amibas
c.- necrosis
d.- hiperplasia linfomatosa

5.6.5.- Tinción de PAS.

Después de realizar el proceso de desparafinización e hidratación se tiñó con PAS que consiste en los pasos siguientes:

1.- pasar las laminillas por solución de ácido peryodico por 5 minutos.
2.- lavar con agua destilada.
3.- pasar por fuscina básica por 5 minutos.
4.- lavar con agua destilada por 10 minutos.
5.- pasar por hematoxilina por 6 minutos.
6.- lavar con agua destilada.
7.- pasar por una solución de alcohol-ácido 1:1.
8.- lavar con agua destilada.
9.- pasar por agua amoniacal.
10.-lavar con agua destilada por 10 minutos.
11.-pasar por alcohol al 95%.
12.-pasar por alcohol absoluto.
13.- pasar por alcohol absoluto.
14.-pasar por xilol.
15.-pasar por xilol.
16.-se realizó el montaje con resina sintética.
17.-se le colocó un cubreobjetos de 24 X 40 mm para su estudio en el microscopio de luz.

La observación al microscopio de luz.

Después de haber teñido los tejidos fueron observados al microscopio para buscar la presencia de:

a.- absceso
b.- amibas
c.- necrosis
d.- hiperplasia linfometosa

5.7.- Estudio en microscopía electrónica de las muestras de cólon, intestino delgado e hígado.
Un fragmento pequeño de tejido de aproximadamente 0.2 cm fue colocado en 5 ml de una solución fijadora por un lapso de 2 horas.

5.7.1.- Solución fijadora.

5.7.1.1.- Solución de glutaraldehido al 2%.
Se tomaron 2 ml de glutaraldehido y se le adicionaron 98 ml de agua destilada.

5.7.1.2.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1 M.

5.7.1.2.1.- Solución de fosfato de sodio monobásico 0.1 M.
Se pesaron 2.84 g de fosfato de sodio monobásico y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

5.7.1.2.2.- Solución de fosfato de sodio dibásico 0.1 M.
Se pesaron 2.76 g de fosfato dibásico y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO.-
Se mezclaron 40.5 ml de la solución preparada en el inciso 5.7.1.2.1 y 9.5 ml de la solución preparada en el inciso 5.7.1.2.2 y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada.

5.7.1.3.- Solución de cloruro de calcio al 1%.
Se pesó 1 g de cloruro de calcio y se le añadió aforaron 99 ml de agua - destilada.

PROCEDIMIENTO.-

Se tomaron 12 ml de la solución de glutaraldehido al 2% y se le adicionaron 88 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1 M, más 10 gotas de la solución de cloruro de calcio al 1%.
Después de cumplido el tiempo en la solución fijadora el fragmento del tejido fué pasado a una solución lavadora, en la cual puede dejarse hasta una semana en refrigeración.

5.7.2.- Solución lavadora.

5.7.2.1.- Solución amortiguadora de fosfatos salinos 0.1 M.
Esta solución se preparó de acuerdo al inciso 5.7.1.2 y subincisos.

5.7.2.2.- Solución de cloruro de calcio al 1%.
Esta solución se preparó de acuerdo al inciso 5.7.1.3.

PROCEDIMIENTO.-

Se mezclaron 100 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos - 0.1 M con 10 g de sacarosa y 10 gotas de cloruro de calcio al 1%.

5.7.3.- Postfijación del tejido.
Una vez que el tejido estuvo en una solución lavadora se procede a una postfijación con tetraóxido de osmio a un pH de 7.4.

5.7.4.- Deshidratación e inclusión.
La deshidratación del tejido se realizó con - alcoholes a diferentes porcentajes de dilución

desde 50% hasta 100%.

La inclusión se hizo en cápsulas de gelatina -- mezcladas con DMP-30: anhidrido dodecenil succi nico; anhidrido metil nádico.

5.7.5.- Polimerización del tejido.

Esta se realizó en una estufa a 70 °C constan-- tes por un lapso de 5 a 10 días.

5.7.6.- Corte del tejido.

Se talla una pirámide de la cápsula por el polo donde se encuentra el tejido. En seguida se pre paran las cuchillas de vidrio esmerilado, se co locan en un ultramicrotomo Portter Blum MT-2, y se hacen cortes de 600 a 900 Å de espesor.

Antes de pasar al ultramicrotomo se hacen cor-- tes semifinos y se tiñen con azul de toluidina, esto es para elegir el mejor corte y pasarlo al ultramicrotomo.

5.7.7.- Montaje del tejido.

En rejillas de cobre, las cuales llevan una sus tancia de contraste que generalmente son meta-- les pesados, como citrato de plomo y acetato de uranilo, que es para cuando se va a tomar la -- placa, pues en microscopía electrónica no hay - color.

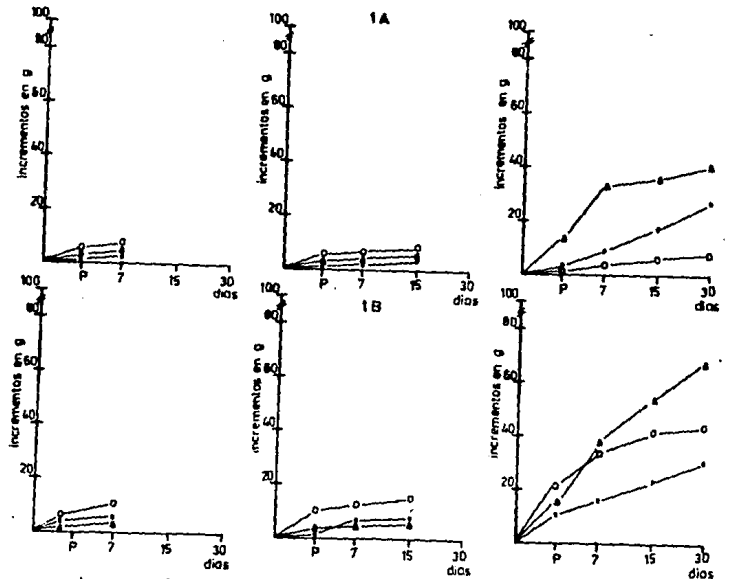
5.7.8.- Observación al microscopio electrónico.

Las estructuras del cólon, intestino delgado e hígado fueron observadas en un microscopio elec trónico Carl Zeiss EM9S-2.

6.- RESULTADOS.

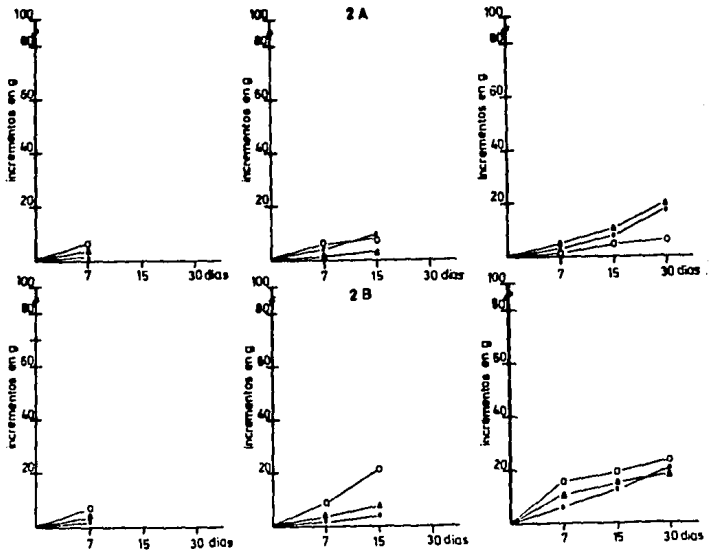
Los incrementos producidos en el peso corporal de las ratas -- jóvenes (80 g) que fueron sometidas a una desnutrición al 50% así - como el efecto inmunosupresor originado por la inyección de inmuran-hidrocortisona y suero antilinfocito en forma Previa (7 días) a la inoculación de E. chattoni cepa PM 5 y en los que éstos esquemas de desnutrición e inmunosupresión fueron continuados durante 7, 15 y - 30 días se presentan en la figura 1 A.

Cuando esta investigación se llevó a cabo con las ratas Adul-- tas (180 g) sin variar las condiciones antes mencionadas, los resul tados se presentan en la figura 1 B.



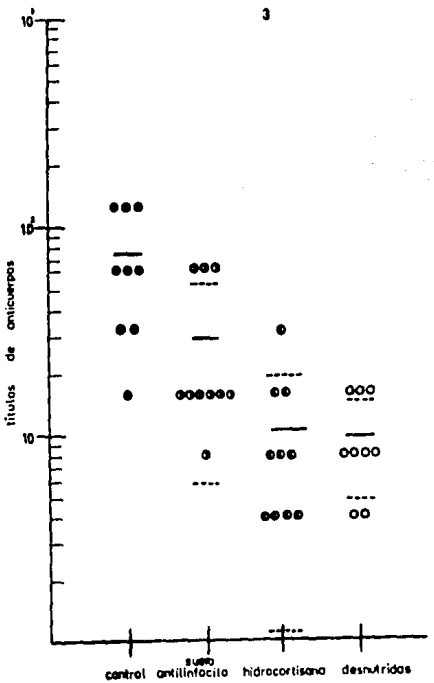

Incrementos en el peso de las ratas jóvenes 1 A y adultas 1 B tra tadas con inmuran-hidrocortisona (▲), suero antilinfocito (•) y desnutridas (o) en forma previa 7 días a la inoculación de ami-- bas y continuado el tratamiento durante 7, 15 y 30 días.

En relación a los resultados obtenidos con respecto a los incrementos en el peso de las ratas inoculadas con E. chattoni PM 5 en forma Simultánea en las restricciones de alimentación así como al efecto inmunosupresor siguiendo el esquema antes citado, se presentan en la figura 2 A cuando se trabajó con las ratas Jóvenes (80 g) y la figura 2 B muestra los resultados cuando se utilizaron ratas Adultas (180 g).

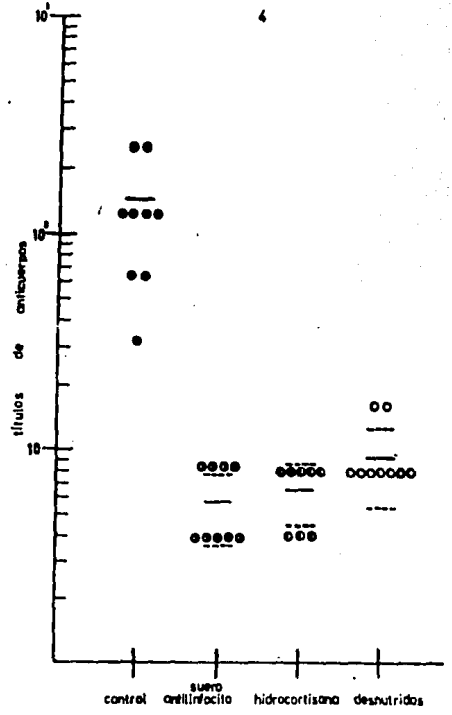



Incrementos en el peso de las ratas jóvenes 2 A y adultas 1 B tratadas con inmuran-hidrocortisona ( ▲ ), suero antilinfocito ( • ) y desnutridas ( o ) en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuado el tratamiento durante 7, 15 y 30 días.

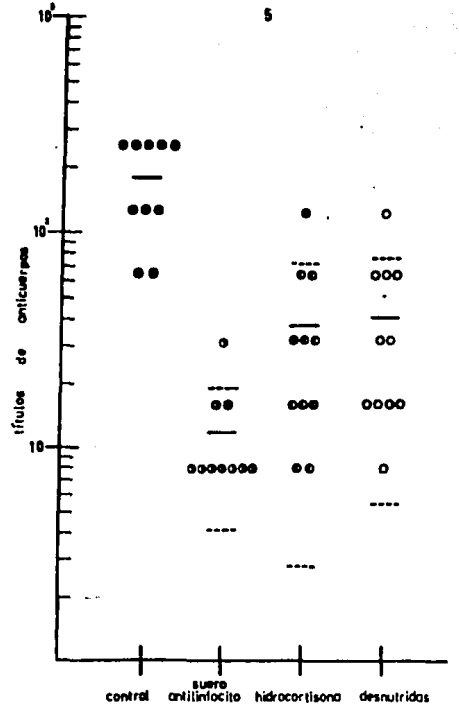
Los títulos de anticuerpos determinados en las ratas Adultas controles así como en las ratas en las que se llevaron a cabo los esquemas de inmunosupresión con suero antilinfocito e inmuran-hidrocortisona y una restricción alimentaria al 50% Previa (7 días) a la inoculación intracecal de amibas y en las que fueron continuados durante tres periodos de evolución 7, 15 y 30 días, se presentan en las figuras 3, 4 y 5.




Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 7 días.

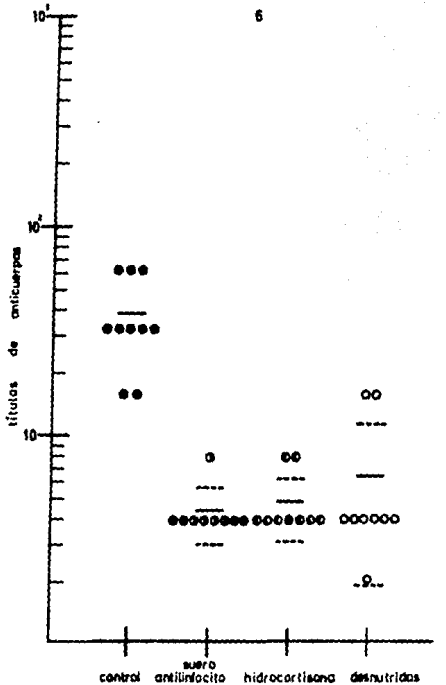



Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 15 días.

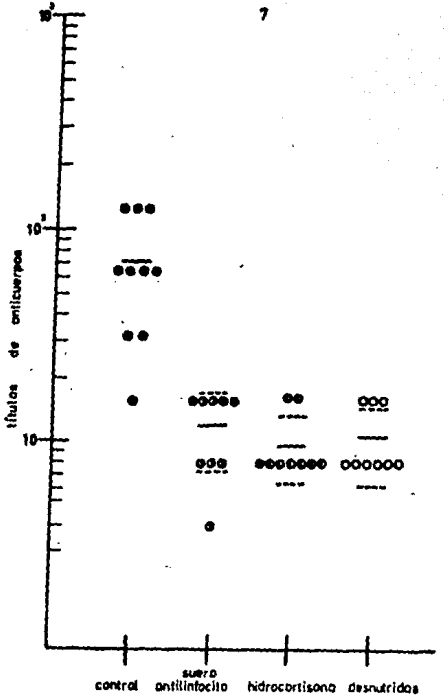



Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 30 días.

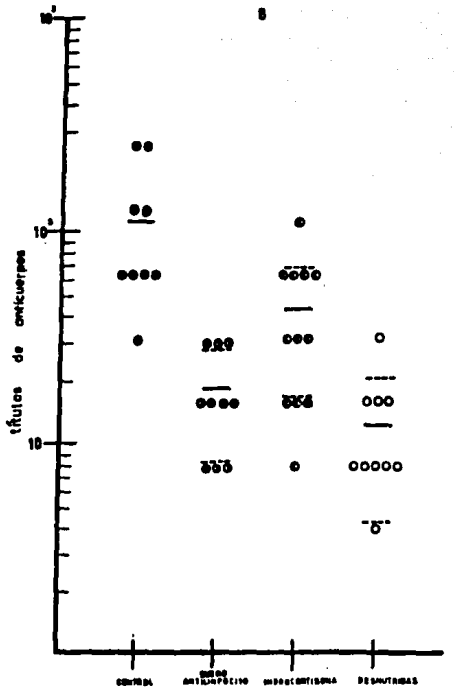
Los resultados de los títulos de anticuerpos logrados cuando se utilizaron ratas Jóvenes en iguales condiciones a las arriba - mencionadas se presentan en las figuras 6, 7 y 8.




Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 7 días.

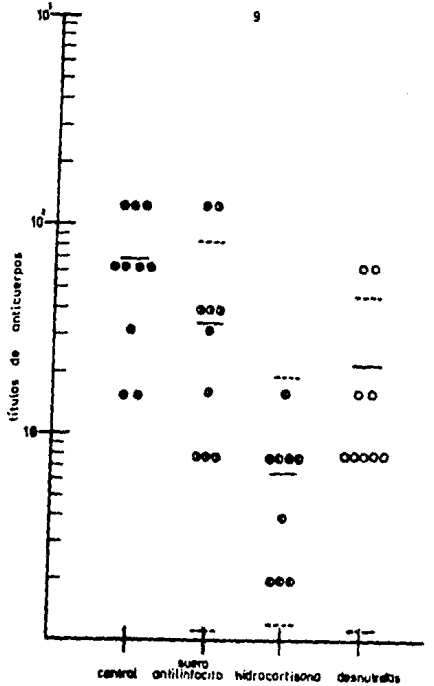



Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 15 días.

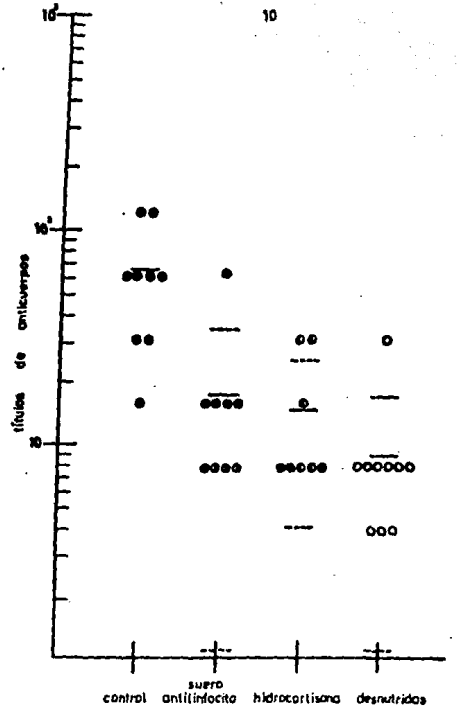



Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma previa (7 días) a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 30 días.

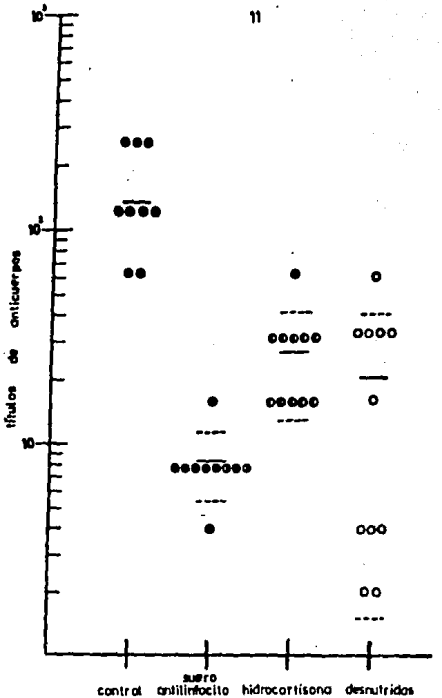
La inoculación intracecal en ratas Adultas con E. chattoni - PM 5 en forma Simultánea seguido de los tres esquemas experimentales ya mencionados así como de su control con respecto al título de anticuerpos del suero se presentan en la figura 9 cuando el periodo de incubación fue de 7 días, la figura 10 nos muestra los - resultados obtenidos cuando el periodo de incubación fue de 15 -- días, así como la figura 11 presenta los resultados obtenidos después de 30 días de incubación.




Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, imuran-hidrocortisona y desnutridas en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuadas los tratamientos durante 7 días.

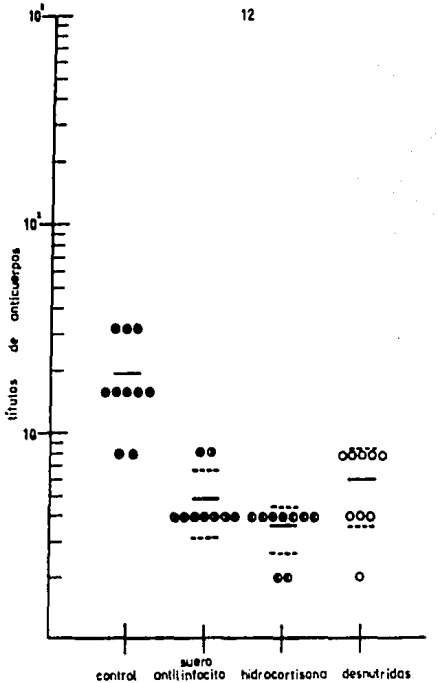



Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 15 días.

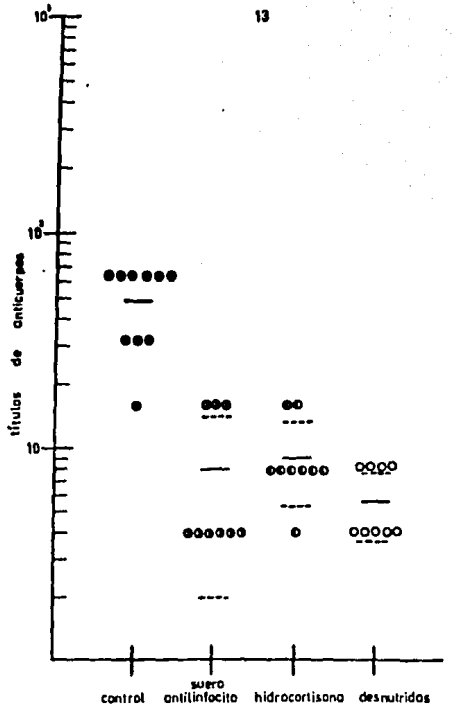



Títulos de anticuerpos en ratas adultas tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas; en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 30 días.

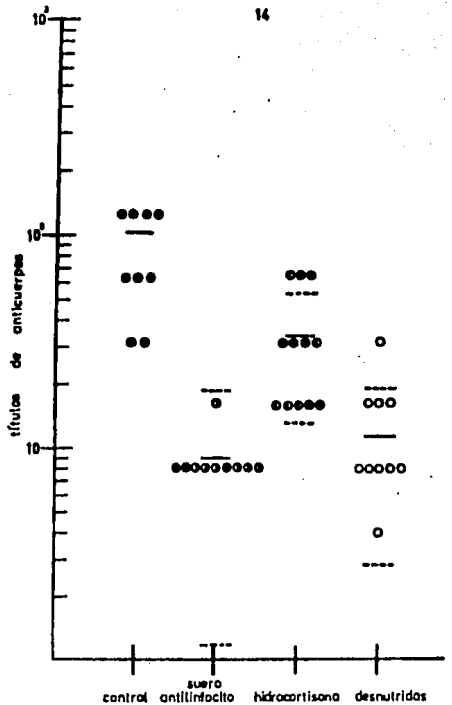
Las figuras 12, 13 y 14 presentan los resultados obtenidos - de los títulos de anticuerpos del suero en las ratas controles y en las ratas experimentales Jóvenes en las que los esquemas de -- restricción antes mencionados fueron Simultáneos a la inoculación de E. chattoni e igualmente continuados durante tres periodos de evolución.




Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuren-hidrocortisona y desnutridas en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuadas los tratamientos durante 7 días.




Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuren-hidrocortisona y desnutridas en forma simultánea a la inoculación de amibas. y continuados los tratamientos durante 15 días.




Títulos de anticuerpos en ratas jóvenes tratadas con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutridas en forma simultánea a la inoculación de amibas y continuados los tratamientos durante 30 días.

Con el objeto de investigar si hubo diferencias en títulos de anticuerpos obtenidos entre y dentro de los grupos experimentales y así como sus controles, se llevó a cabo un análisis de varianza con ellos, ésto es mostrado en el cuadro 1 cuando se manejó el tratamiento Previo en las ratas Adultas, y el cuadro 2 muestra los resultados obtenidos cuando se utilizaron las ratas Jóvenes determinados durante los tres periodos de evolución.

cuadro 1

| | | |
|---|---|---|
| | 7 días | |
| $V_A$ = 16 558 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 5 186 |
| | $^{\circ}F$ = 8.48 | |
| $V_B$ = 20 766 | $^{\circ}L_B$ = 34 | $MV_B$ = 610,76 |
| | | $^{\circ}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 36 325 | $^{\circ}L_T$ = 37 | $p <$ 0.05 |
| | 15 días | |
| $V_A$ = 104 346 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 34 782 |
| | $^{\circ}F$ = 22.14 | |
| $V_B$ = 50 257 | $^{\circ}L_B$ = 32 | $MV_B$ = 1 570 |
| | | $^{\circ}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 154 604 | $^{\circ}L_T$ = 35 | $p <$ 0.05 |
| | 30 días | |
| $V_A$ = 172 662 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 57 554 |
| | $^{\circ}F$ = 24.25 | |
| $V_B$ = 90 157 | $^{\circ}L_B$ = 38 | $MV_B$ = 2 372 |
| | | $^{\circ}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 262 820 | $^{\circ}L_T$ = 41 | $p <$ 0.05 |

$V_A$ = Varianza entre grupos.
$V_B$ = varianza dentro de grupos.
$V_T$ = varianza total.
$F = V_A/V_B$

$MV_A$ = Media de la varianza entre grupos.
$MV_B$ = Media de la varianza dentro de grupos.
$^{\circ}L_A$ = Grados de libertad entre grupos.
$^{\circ}L_B$ = Grados de libertad dentro de grupos.
$^{\circ}L_T$ = Grados de libertad totales.

**Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos del suero en ratas adultas obtenidos entre y dentro de los grupos experimentales así como sus controles con tratamiento previo (7 días) a la inoculación de amibas.**

cuadro 2

| | | |
|---|---|---|
| | 7 días | |
| $V_A$ = 8 588 | $^{*}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 2 862 |
| | $^{*}F$ = 31.65 | |
| $V_R$ = 2894 | $^{*}L_R$ = 32 | $MV_R$ = 90 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 11 483 | $^{*}L_T$ = 35 | $p <$ 0.05 |
| | 15 días | |
| $V_A$ = 30 692 | $^{*}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 10 230 |
| | $^{*}F$ = 25.31 | |
| $V_R$ = 12 935 | $^{*}L_R$ = 32 | $MV_R$ = 404 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 43 628 | $^{*}L_T$ = 35 | $p <$ 0.05 |
| | 30 días | |
| $V_A$ = 64 719 | $^{*}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 21 573 |
| | $^{*}F$ = 11.15 | |
| $V_R$ = 71 567 | $^{*}L_R$ = 37 | $MV_R$ = 1 934 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 136 287 | $^{*}L_T$ = 40 | $p <$ 0.05 |

$V_A$= Varianza entre grupos.
$V_R$= Varianza centro de grupos.
$V_T$= Varianza total.
$F = V_A/V_R$

$MV_A$= Media de la varianza entre grupos.
$MV_R$= Media de la varianza dentro de grupos.
$^{*}L_A$= Grados de libertad entre grupos.
$^{*}L_R$= Grados de libertad dentro de grupos.
$^{*}L_T$= Grados de libertad totales.

Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos del suero en ratas jóvenes obtenidos entre y dentro de los grupos experimentales así como sus controles con tratamiento previo (7días) a la inoculación de amibas.

Cuando el tratamiento experimental fue Simultáneo a la inoculación de E. chattoni en ratas ADultas, el análisis de varianza - llevado a cabo con los títulos de anticuerpos se presenta en el - cuadro 3. Igualmente este análisis de varianza fue determinado -- con los títulos de anticuerpos de las ratas Jóvenes durante los - tres periodos de evolución ya mencionados los cuales se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 3

| | | |
|---|---|---|
| | 7 días | |
| $V_A$ = 24 969 | $^oL_A$ = 3<br>$^oF$ = 6.78 | $MV_A$ = 8 323 |
| $V_R$ = 41 688 | $^oL_R$ = 34 | $MV_R$ = 1 226<br>$^op$ < 0.01 |
| $V_T$ = 66 657 | $^oL_T$ = 37 | p < 0.05 |
| | 15 días | |
| $V_A$ = 18617 | $^oL_A$ = 3<br>$^oF$ = 12.04 | $MV_A$ = 6205 |
| $V_R$ = 16480 | $^oL_R$ = 32 | $MV_R$ = 515.02<br>$^op$ < 0.01 |
| $V_T$ = 35098 | $^oL_T$ = 35 | p < 0.05 |
| | 30 días | |
| $V_A$ = 92 278 | $^oL_A$ = 3<br>$^oF$ = 21.14 | $MV_A$ = 30759 |
| $V_R$ = 55 257 | $^oL_R$ = 38 | $MV_R$ = 1454<br>$^op$ < 0.01 |
| $V_T$ = 147 545 | $^oL_T$ = 41 | p < 0.05 |

$V_A$ = Varianza entre grupos.
$V_R$ = Varianza centro de grupos.
$V_T$ = Varianza total.
$F = V_A/V_R$

$MV_A$ = Media de la varianza entre grupos.
$MV_R$ = Media de la varianza centro de grupos.
$^oL_A$ = Grados de libertad entre grupos.
$^oL_R$ = Grados de libertad centro de grupos.
$^oL_T$ = Grados de libertad totales.

Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos del suero en ratas adultas obtenidos entre y dentro de los grupos experimentales así como sus controles con tratamiento simultáneo a la inoculación de amibas.

cuadro 4

| | | |
|---|---|---|
| | 7 días | |
| $V_A$ = 1 161 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 387 |
| | $^{*}F$ = 17 93 | |
| $V_R$ = 690 | $^{\circ}L_R$ = 32 | $MV_R$ = 21 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 1 851 | $^{\circ}L_T$ = 35 | $p <$ 0.05 |
| | 15 días | |
| $V_A$ = 14 112 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 4 704 |
| | $^{*}F$ = 60,22 | |
| $V_R$ = 2 499 | $^{\circ}L_R$ = 32 | $MV_R$ = 78 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 16 611 | $^{\circ}L_T$ = 35 | $p <$ 0.05 |
| | 30 días | |
| $V_A$ = 62 886 | $^{\circ}L_A$ = 3 | $MV_A$ = 20 962 |
| | $^{*}F$ = 19.35 | |
| $V_R$ = 40 065 | $^{\circ}L_R$ = 37 | $MV_R$ = 1 082 |
| | | $^{*}p <$ 0.01 |
| $V_T$ = 102 951 | $^{\circ}L_T$ = 40 | $p <$ 0.05 |

$V_A$= Varianza entre grupos.
$V_R$= Varianza dentro de grupos.
$V_T$= Varianza total.
$F = V_A/V_R$

$MV_A$= Media de la varianza entre grupos.
$MV_R$= Media de la varianza dentro de grupos.
$^{\circ}L_A$= Grados de libertad entre grupos.
$^{\circ}L_R$= Grados de libertad dentro de grupos.
$^{\circ}L_T$= Grados de libertad totales.

Análisis de varianza de los títulos de anticuerpos del suero en ratas jóvenes obtenidos entre y dentro de los grupos experimentales así como sus controles con tratamiento simultáneo a la inoculación de amibas.

Se investigó si había influido la edad de los animales sometidos a los tres tratamientos experimentales antes descritos llevados a cabo en forma Previa a la inoculación de E. chattoni PM 5 con respecto al título de anticuerpos del suero mediante el análisis estadístico de la "t" de student en los tres periodos de evolución, los resultados que presenta el cuadro 5 incluye a ratas - Adultas y Jóvenes y el cuadro 6 muestra los resultados obtenidos cuando la inoculación de E. chattoni fue llevada a cabo en forma Simultánea con las ratas Jóvenes y Adultas.

cuadro 5

| | suero antilinfocito | hidrocortisona | desnutridas |
|---|---|---|---|
| **7 días** | | | |
| t = | 3.14 | 1.82 | 1.35 |
| °l = | 17 | 17 | 16 |
| p = | <0.01 | NS | NS |
| **15 días** | | | |
| t = | 3.50 | 2.29 | 0.82 |
| °l = | 16 | 15 | 17 |
| p = | <0.05 | <0.05 | NS |
| **30 días** | | | |
| t = | 1.59 | 0.47 | 2.49 |
| °l = | 18 | 21 | 19 |
| p = | NS | NS | <0.025 |

**Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero entre ratas adultas y jóvenes durante los tres periodos de evolución con - restricción previa (7 días) a la inoculación de amibas de los tratamientos experimentales.**

cuadro 6

| | suero antilinfocito | hidrocortisona | desnutridas |
|---|---|---|---|
| **7 días** | | | |
| t = | 1.73 | 2.06 | 2.02 |
| °l = | 17 | 17 | 16 |
| p = | NS | NS | NS |
| **15 días** | | | |
| t = | 1.56 | 1.46 | 1.20 |
| °l = | 16 | 15 | 17 |
| p = | NS | NS | NS |
| **30 días** | | | |
| t = | 0.32 | 0.78 | 1.42 |
| °l = | 18 | 21 | 19 |
| p = | NS | NS | NS |

**Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero entre ratas adultas y jóvenes durante los tres periodos de evolución con - restricción simultánea a la inoculación de amibas de - los tratamientos experimentales.**

De la misma forma tratando de determinar el grado de patogenicidad de E. chattoni se llevó a cabo el análisis estadístico de la "t" de student en lasratas Adultas que recibieron la restricción Previa y Simultánea a la inoculación de E. chattoni determinado en los tres periodos de evolución. Los resultados se presentan en el cuadro 7. El cuadro 8 presenta este mismo análisis estadístico pero ahora llevado a cabo con ratas Jóvenes a las que se sometió a los esquemas ya mencionados.

cuadro 7

| | suero antilinfocito | hidrocortisona | desnutridas |
|---|---|---|---|
| **7 días** | | | |
| t = | 0.25 | 1.14 | 1.52 |
| °l = | 18 | 18 | 16 |
| p = | NS | NS | NS |
| **15 días** | | | |
| t = | 2.00 | 2.17 | 0.01 |
| °l = | 16 | 14 | 18 |
| p = | 0.05 | 0.05 | NS |
| **30 días** | | | |
| t = | 1.36 | 0.87 | 1.70 |
| °l = | 18 | 20 | 20 |
| p = | NS | NS | NS |

**Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero en las ratas adultas con tratamiento experimental previo (7 días) y simultáneo a la inoculación de amibas determinado en los tres periodos de evolución.**

cuadro 8

| | suero antilinfocito | hidrocortisona | desnutridos |
|---|---|---|---|
| **7 días** | | | |
| t = | 0.60 | 2.02 | 0.22 |
| °l = | 16 | 16 | 16 |
| p = | NS | NS | NS |
| **15 días** | | | |
| t = | 1.54 | 0.025 | 3.24 |
| °l = | 16 | 16 | 16 |
| p = | NS | NS | <0.005 |
| **30 días** | | | |
| t = | 2,71 | 0,99 | 0,32 |
| °l = | 10 | 22 | 18 |
| p = | 0.02 | NS | NS |

Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero en las ratas jóvenes con tratamiento experimental previo (7 días) y simultáneo a la inoculación de amibas determinado en los tres periodos de evolución.

Con el propósito de investigar si los esquemas experimentales Previo y Simultáneo habían producido diferencias significativas de los títulos de anticuerpos del suero en los animales control y a -- los tratados con suero antilinfocito, el cuadro 9 nos muestra los - resultados obtenidos. Asimismo el cuadro 10 presenta estos paráme-- tros estudiados con los tratamientos Previo y Simultáneo en las ratas con inmuran-hidrocortisona y finalmente el cuadro 11 presenta - estos resultados cuando la restricción fue desnutrición al 50% si-- guiendo la metodología antes mencionada.

cuadro 9

| suero antilinfocito | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ratas adultas | | | ratas jóvenes | |
| previo | | simultáneo | previo | simultáneo |
| 7 días | | | | |
| t = | 3.85 | 1.72 | 2.13 | 4.48 |
| °l = | 18 | 18 | 17 | 17 |
| p = | < 0.005 | NS | < 0.05 | < 0.001 |
| 15 días | | | | |
| t = | 4.76 | 3.32 | 4.23 | 3.72 |
| °l = | 16 | 18 | 17 | 17 |
| p = | < 0.001 | < 0.005 | < 0.001 | < 0.005 |
| 30 días | | | | |
| t = | 6.24 | 5.47 | 3.67 | 4.85 |
| °l = | 18 | 18 | 17 | 17 |
| p = | < 0.001 | < 0.001 | < 0.005 | 0.001 |

Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero en los animales con trol y los tratados con suero antilinfocito con tratamiento previo (7 días) y simultáneo a la inoculación - de amiba.

cuadro 10

| hidrocortisona | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ratas adultas | | ratas jóvenes | |
| | previo | simultáneo | previo | simultáneo |
| | 7 días | | | |
| t = | 3.85 | 2.17 | 5.39 | 4.98 |
| °l = | 18 | 18 | 17 | 17 |
| p = | < 0.005 | < 0.05 | < 0.001 | < 0.001 |
| | 15 días | | | |
| t = | 4.45 | 3.50 | 5.17 | 8.00 |
| °l = | 15 | 15 | 16 | 16 |
| p = | < 0.001 | < 0.005 | < 0.001 | < 0.001 |
| | 30 días | | | |
| t = | 5.09 | 4.87 | 2.71 | 3.83 |
| °l = | 19 | 19 | 18 | 18 |
| p = | < 0.001 | < 0.001 | < 0.02 | < 0.005 |

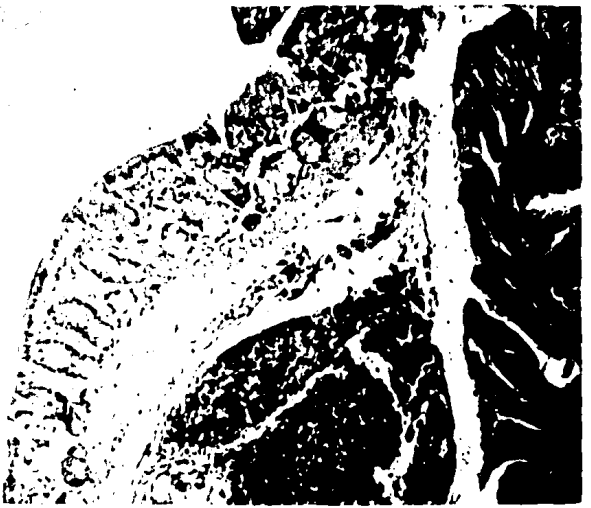
Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero en los animales control y las tratadas con hidrocortisona-inmunes con tratamiento previo (7 días) y simultáneo a la inoculación de amibas.

cuadro 11

| desnutridas | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ratas adultas | | ratas jóvenes | |
| | previo | simultáneo | previo | simultáneo |
| | 7 días | | | |
| t = | 1.83 | 4.18 | 4.90 | 4.044 |
| °l = | 17 | 17 | 17 | 17 |
| p = | < 0.10 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | 15 días | | | |
| t = | 4.90 | 4.43 | 5.09 | 8.84 |
| °l = | 17 | 17 | 16 | 16 |
| p = | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |
| | 30 días | | | |
| t = | 4.95 | 5.10 | 3.91 | 4.70 |
| °l = | 19 | 19 | 17 | 17 |
| p = | < 0.001 | < 0.001 | < 0.005 | < 0.001 |

Análisis estadístico de la "t" de student con respecto al título de anticuerpos del suero en los animales control y las desnutridas al 50% con tratamiento previo (7 días) y simultáneo a la inoculación de amibas.

15



Microfotografía de cólon.
Se observa hiperplasia linfomatosa ligera con extensión a la lámina propia y muscularis mucosae; además mucosa y epitelio sin alteraciones. H. E. (10 X).

16

Microfotografía de cólon.
Se observa hiperplasia linfomatosa moderada con extensión a la lamina propia, muscularis mucosae y submucosa; además algunas glándulas de la mucosa sin alteraciones. H. E. (160 X).

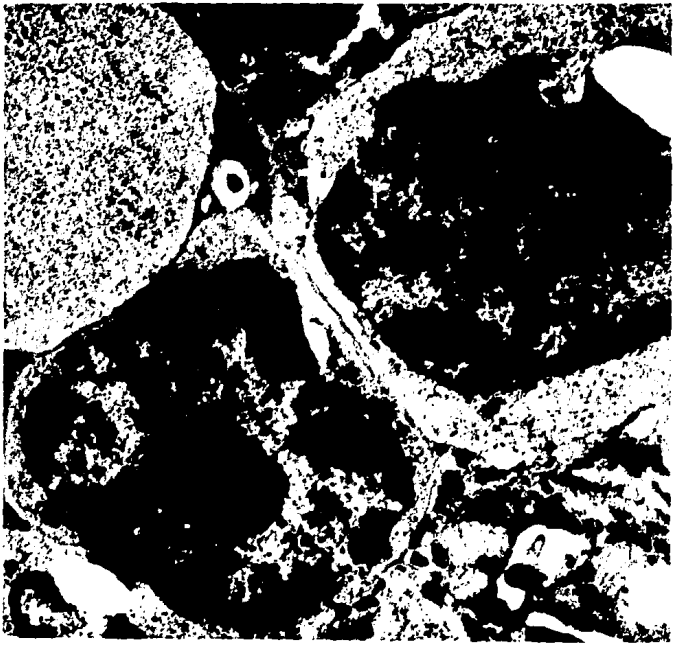
17

Microfotografía de cólon.
Se observa hiperplasia linfomatosa acentuada con compresión del epitelio, lámina propia, muscularis mucosae, submucosa y capa muscular. H. E. (160 X).

18

Microelectrofotografía de mucosa intestinal.
Se observan dos porciones de células epiteliales sin alteraciones limitadas por las membranas plasmáticas en el citoplasma y organitos como mitocondrias, en - su porción apical se encuentran numerosas microvellosidades sin alteraciones.
(5 000 X).

19



Microelectrofotografía de hiperplasia linfomatosa. Se observan dos linfocitos en donde el núcleo ocupa la mayor parte del citoplasma. (5 000 X).

Las alteraciones histopatológicas encontradas en las ratas -- adultas y que recibieron los tratamientos con suero antilinfocito, inmuran-hidrocortisona y desnutrición previas y simultáneas a la - inoculación de amibas se muestran en el cuadro 12, y los resulta-- dos obtenidos en las ratas jóvenes se presentan en el cuadro 13.

CUADRO 12

ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS EN RATAS ADULTAS (180 g)

| | | | HISTOLOGIA DE ILEO | | | | HISTOLOGIA ELECTRONICA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamiento | Inoculación | ho. | Int. delg. | ho. | Cólon | |
| 7 días. | suero antilinfocito | previo | 1/10<br>1/10 | H L L<br>H L B | 2/10<br>2/10 | H L L<br>H L B | La superficie de las células epiteliales cilíndricas estaban microvellosidades regulares, las uniones se caracterizaron por tener núcleo grande y ovoide; citoplasma, las células plasmáticas por tener núcleo excéntrico y abundante retículo endoplásmico. |
| | | simultáneo | 10/10 | sahi | 10/10 | sahi | |
| | hidrocortisona | previo | 1/10 | H L B | 10/10 | sahi | |
| | | simultáneo | 1/10<br>1/10 | H L L<br>H L B | 10/10 | sahi | |
| | desnutrición | previo | 1/9 | H L B | 9/9 | sahi | |
| | | simultáneo | 1/9<br>1/9 | H L L<br>H L B | 9/9 | sahi | |
| 15 días | suero antilinfocito | previo | 1/9 | H L A | 9/9 | sahi | |
| | | simultáneo | 1/9<br>1/9 | H L B<br>H L A | 1/9<br>1/9 | H L L<br>H L A | |
| | hidrocortisona | previo | 8/8 | sahi | 1/8 | H L L | |
| | | simultáneo | 2/8 | H L L | 8/8 | sahi | |
| | desnutrición | previo | 1/10<br>1/10 | H L L<br>H L B | 10/10 | sahi | |
| | | simultáneo | 1/10 | H L B | 10/10 | sahi | |
| 30 días. | suero antilinfocito | previo | 1/10<br>1/10 | H L L<br>H L B | 10/10 | sahi | |
| | | simultáneo | 10/10 | sahi | 1/10 | H L L | |
| | hidrocortisona | previo | 1/11<br>1/11 | H L L<br>H L B | 1/11 | H L B | |
| | | simultáneo | 11/11 | sahi | 1/11 | H L B | |
| | desnutrición | previo | 4/11 | H L L | 1/11 | H L L | |
| | | simultáneo | 11/11 | sahi | 11/11 | sahi | |

HLL.- Hiperplasia linfomatosa ligera.
HLB.- Hiperplasia linfomatosa moderada.
HLA.- Hiperplasia linfomatosa acentuada.

HLL.- Con extensión a la lámina propia y muscularis mucosae.
HLB.- Con extensión a la lámina propia, muscularis mucosae y submucosa.
HLA en intestino delgado.- Con extensión a la lámina propia, muscularis mucosae, submucosa, capa muscular y compresión de las vellosidades de la mucosa.
HLA en cólon.- Con compresión del epitelio, lámina propia, muscularis mucosae, submucosa y capa muscular.

sahi.- sin alteraciones histológicas de importancia.

CUADRO 13

ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS EN RATAS JOVENES (80 g)

| | | | MICROSCOPIA DE LUZ | | | | MICROSCOPIA ELECTRONICA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tratamiento | Inoculación | Ap. | Int. delg. | Ne. | Cólon | |
| 7 días. | suero antilinfocito | previa | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | La superficie de las células epiteliales cilíndricas mostraron microvellosidades normales, los linfocitos se caracterizaron por tener núcleo grande y escaso citoplasma, las células plasmáticas por tener núcleo excentrico y abundante retículo endoplásmico. |
| | | simultánea | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | hidrocortisona | previa | 9/9 | sahi | 1/9 | H L L | |
| | | simultánea | 9/9 | sahi | 1/9<br>2/9 | H L L<br>H L B | |
| | desnutrición | previa | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | | simultánea | 1/9 | H L L | 9/9 | sahi | |
| 15 días. | suero antilinfocito | previa | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | | simultánea | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | hidrocortisona | previa | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | | simultánea | 9/9 | sahi | 9/9 | sahi | |
| | desnutrición | previa | 1/9 | H L L | 9/9 | sahi | |
| | | simultánea | 9/9 | sahi | 1/9 | H L L | |
| 30 días. | suero antilinfocito | previa | 1/10 | H L L | 1/10 | H L L | |
| | | simultánea | 3/10 | H L L | 10/10 | sahi | |
| | hidrocortisona | previa | 12/12 | sahi | 12/12 | sahi | |
| | | simultánea | 1/12 | H L L | 12/12 | sahi | |
| | desnutrición | previa | 1/10<br>2/10 | H L L<br>H L B | 10/10 | sahi | |
| | | simultánea | 1/10 | H L B | 10/10 | sahi | |

HLL.- Hiperplasia linfomatosa ligera.
HLB.- Hiperplasia linfomatosa moderada.
HLA.- Hiperplasia linfomatosa acentuada.

HLL.- Con extensión a la lámina propia y muscularis mucosae.
HLB.- Con extensión a la lámina propia, muscularis mucosae y submucosa.
HLA en intestino delgado.- Con extensión a la lámina propia, muscularis mucosae, submucosa, capa muscular y compresión de las vellosidades de la mucosa.
HLA en cólon.- Con compresión del epitelio, lámina propia, muscularis mucosae, submucosa y capa muscular.

sahi.- sin alteraciones histológicas de importancia.

## 7.- DISCUSION.

El efecto que produce una dieta baja en proteinas así como la inmunosupresión por suero antilinfocito y corticoides en ratas inoculadas experimentalmente con amibas, a nuestro juicio tiene especial interés porque evoca una relación huésped parásito para dar una explicación al diferente comportamiento que tiene E. histolytica frente al huésped (2, 7, 20 y 29).

Fue por ello que uno de los objetivos de este estudio consistió en investigar si la restricción previa en el huésped era determinante en la capacidad invasora de una amiba, o bien si no tenía ninguna trascendencia, pues al inocularla simultáneamente en un huésped sin restricción previa era capaz de lesionar igualmente los tejidos independientemente de que los esquemas de restricción experimentales continuaran.

TRATAMIENTO DE RESTRICCION PREVIA.

El estudio se planteó llevarlo a cabo longitudinalmente durante un mes. La figura 1 A muestra los resultados obtenidos en relación a los incrementos en peso que tuvieron las ratas jóvenes y los resultados de las ratas adultas se presentan en la figura 1 B. En éstos pudimos observar que tuvieron un comportamiento semejante en los tres esquemas de restricción, aparentemente la edad de los animales no influyó cuantitativamente en ellas ya que durante los tres periodos de estudio el comportamiento fue semejante, sin embargo aparentemente la desnutrición temprana tuvo un efecto más importante que en las ratas adultas.

Por otro lado dio la impresión que este estudio llevado a cabo en periodos prolongados (30 días) los incrementos en el peso de las ratas fueron mayores que cuando el estudio se llevó a cabo durante periodos cortos (7 días) o medios (15 días).

TRATAMIENTO DE RESTRICCION SIMULTANEA.

Cuando a los animales se les inoculó amibas en forma simultánea a la restricción experimental ya mencionada de acuerdo a las figuras 2 A para las ratas jóvenes y en las adultas la 2 B.

Los incrementos en el peso de las ratas jóvenes mostraron que

a los 7 días de evolución se mantuvieron en forma semejante a las ratas adultas no así a los 15 días en donde las ratas desnutridas presentaron un decremento importante en el peso de las ratas jóvenes lo cual no se observó en las ratas adultas. Finalmente en relación a el último periodo de estudio (30 días) observamos igualmente que en las ratas jóvenes la desnutrición las afectó en forma importante comparativamente con las ratas adultas. Esto no sucedió con las ratas tratadas con inmuran-hidrocortisona y suero antilinfocito.

REACCION SEROLOGICA DE ANIMALES ADULTOS CON RESTRICCION PREVIA.

Otro de los parámetros estudiados consistió en determinar si la respuesta serológica que presentaron las ratas adultas era igual cuando se establecía un periodo de restricción previa a la inoculación de amibas si éste era independiente comparativamente a ratas consideradas como controles. Los resultados obtenidos después de 7 días de incubación se presentan en la figura 3 donde se muestra que los valores promedios en el título de anticuerpos fueron diferentes con respecto a los obtenidos en el control haciéndose notar valores semejantes en las ratas sometidas a las restricciones con inmuran-hidrocortisona y desnutridas.

El análisis de varianza llevado a cabo con los resultados antes obtenidos se muestra en el cuadro 1, éste dió un valor de $F=8.49$ con $p<0.01$ lo cual nos indica que estadísticamente fueron diferentes, es decir, las ratas respondieron serológicamente en forma diferente a los tres tratamientos con respecto al control.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos en ratas adultas después de un periodo de incubación de 15 días donde observamos un total abatimiento del título de anticuerpos del suero de las ratas sometidas a los trea tratamientos experimentales y los resultados del análisis de varianza en ellos, mostrado en el cuadro 1, presenta valores muy significativos $F=22.14$ y $p<0.01$.

En forma semejante cuando el estudio se llevó a cabo en las ratas después de 30 días de incubación la figura 5 presenta el análisis de varianza de los títulos de anticuerpos del suero de los animales bajo los tres tratamientos el cual fue de $F=24.25$ y $p<0.01$, sin embargo debemos señalar que los títulos de anticuerpos tuvieron un incremento importante comparativamente con el periodo de incuba-

ción de 15 días lo cual coincide con lo mencionado anteriormente en relación àl incremento de los pesos, éstos resùltados nos sugieren que la restricción alimentaria así como inmunosupresiva en este lote de animales la respuesta inmunológica juzgada por el título de anticuerpos comparativamente con los controles no fue muy importante, la explicación que podemos dar es que el lote de animales respondió en forma muy particular lo cual coincide con los resultados obtenidos en el incremento del peso de la gráfica 1 B.

REACCION SEROLOGICA DE ANIMALES JOVENES CON RESTRICCION PREVIA.

Aparentemente la edad de los animales tuvo una repercusión importante en relación a su respuesta inmunológica pues éstos después de 7 días de incubación comparativamente con el control presentaron los valores más bajos en el título de anticuerpos del suero, el análisis de varianza que se presenta en èl cuadro 2 muestra valores de $F=31.65$ y $p<0.01$. Los resultados analizados en el periodo de evolución de 15 días de acuerdo a la figura 7 así como los obtenidos con el control presentaron diferencias estadísticamente significativas juzgado además por el análisis de varianza que se presenta en el cuadro 2 y cuyos valores fueron de $F=25.31$ y $p<0.01$.

Sin embargo estos valores fueron muy semejantes entre si como podrá observarse en la figura correspondiente, lo que interpretamos es que las restricciones repercutieron en forma semejante en estos animales.

En relación al último periodo estudiado 30 días se observó que los títulos de anticuerpos del suero de los animales con respecto al control fueron diferentes con respecto al los tres tratamientos corroborándose por el análisis de varianza del cuadro 2 donde se muestra que estadísticamente fueron diferentes con $F=11.15$ y $p<0.01$.

De acuerdo a lo antes mencionado el cuadro 5 resume estos resultados de restricción previa a la inoculación de la amiba en donde se evaluaron estadísticamente en forma independiente las tres restricciones llevadas a cabo en las ratas adultas y jóvenes. Dió la impresión que la edad de éstos influyó importantemente en la respuesta serológica pues los valores encontrados fueron estadísticamente significativos durante el periodo de incubación de 7 días cuando se sometieron las ratas a una restricción con suero antilin-

focito, lo cual no se observó cuando recibieron un tratamiento con cortisona y una restricción alimentaria.

Sin embargo con respecto al control las ratas sometidas a los tres esquemas de restricción presentaron diferencias estadísticamente significativas como se muestra en el cuadro 9.

En relación a las ratas estudiadas en el periodo de incubación de 15 días los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$ cuando se utilizó suero antilinfocito e inmuran-hidrocortisona como esquema de restricción lo cual no se observó en las ratas desnutridas.

En este mismo periodo de incubación cuando las ratas sujetadas a los tres tratamientos antes mencionados se compararon con el control el título de anticuerpos del suero de estas ratas estadísticamente sí lo hicieron como se observa en el cuadro 11.

En relación a las ratas estudiadas en el último periodo 30 días de evolución observamos que no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad de los animales a excepción de las ratas desnutridas en donde se obtuvo un valor de $p < 0.025$ con las tres restricciones. Cuando estos valores se compararon con el control de acuerdo a los cuadros 9, 10 y 11 todos presentaron diferencias estadísticamente significativas.

REACCION SEROLOGICA DE ANIMALES ADULTOS CON RESTRICCION SIMULTANEA.

La inoculación de amibas en forma simultánea a las tres restricciones antes mencionadas en ratas adultas dió como resultado la respuesta serológica que se presenta en la figura 9 después de un periodo de incubación de 7 días como podrá observarse los promedios en los títulos de anticuerpos fueron diferentes, en donde los valores más bajos correspondieron a las ratas tratadas con hidrocortisona. El análisis de varianza llevado a cabo con estos resultados se presenta en el cuadro 3, éste nos muestra un valor de $F=6.78$ y $p = 0.01$ lo cual nos indicó que los tratamientos fueron estadísticamente diferentes y al comparar los resultados anteriormente obtenidos por separado con respecto a los determinados en el control en los cuadros 9, 10 y 11 observamos que las ratas con suero tratadas con suero antilinfocito no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el título de anticuerpos del suero, no así

las ratas sometidas a restricciones con hidrocortisona y desnutri-- ción donde los valores de probabilidad correspondieron a p 0.05 y $p < 0.001$ respectivamente.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos de los títulos - de anticuerpos del suero de las ratas estudiadas en el periodo de - incubación de 15 días, encontrándose el valor más bajo en las desnutridas, el análisis estadístico de varianza dió un valor de F=12.04 y $p < 0.01$ lo que interpretamos como diferencias entre los tres tratamientos.

El estudio llevado a cabo independientemente de cada tratamiento con respecto al control mostró diferencias estadísticamente significativas con los tres pues los valores fueron de $p < 0.005$ en dos de ellos y $p < 0.001$ en el otro.

Finalmente en las ratas sometidas a un periodo de incubación - de 30 días con suero antilinfocito se observó que los valores en -- los títulos de anticuerpos fueron los más bajos nuevamente, al llevar a cabo un análisis de varianza con éstos, cuadro 3, éste correspondió a F=21.14 y $p < 0.01$ siendo el valor de F el más alto de los tres periodos de evolución estudiados. El análisis independiente de la "t" de student mostró que hubo diferencias en la respuesta serológica de los animales con respecto al control así como cuando se analizaron separadamente estos resultados que se presentan en los - cuadros 9, 10 y 11 en donde los tres fueron estadísticamente significativos con valor de $p < 0.001$.

RESPUESTA SEROLOGICA DE ANIMALES JOVENES CON RESTRICCION SIMULTANEA.

Al inocular las ratas jóvenes en forma simultánea los resultados obtenidos en relación al título de anticuerpos del suero en las ratas sometidas a las tres restricciones mostraron que durante el - periodo de incubación de 7 días, figura 12, mostraron los resultados más bajos con hidrocortisona aunque al llevar a cabo un análisis de varianza incluyendo al control se obtuvo un valor de F=17.93 y ---- $p < 0.01$ lo cual nos indicó diferencias estadísticamente significativas, éste se corroboró cuando se compararon las restricciones de cada tratamiento separada y comparativamente con el control como se - presenta en los cuadros 9, 10 y 11 en donde la "t" de studen dió una $p < 0.001$.

Durante el periodo de incubación de 15 días figura 13, los valores promedio del título de anticuerpos del suero fueron muy semejantes entre sí, nuevamente el valor más bajo se obtuvo en las ratas desnutridas. El análisis de varianza dió como resultado F=60.22 y $p < 0.01$ y al comparar estos resultados en forma independiente con el control el análisis estadístico de la "t" de student mostró una $p < 0.001$ y $p < 0.005$.

Finalmente el periodo de incubación de 30 días en las ratas jóvenes figura 14 y cuyo análisis de varianza fue de F=19.35 y $p < 0.01$ con respecto a su respuesta serológica, al llevar a cabo el análisis estadístico y comparándolo con el contro en forma independiente los resultados mostraron que los tres tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.001$.

Estos resultados se resumen en el cuadro 6 tratando de determinar si hubo diferencias con respecto a la edad de los animales sometidos a las tres restricciones en donde pudimos observar que no dieron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente con el objeto de determinar cual de los tratamientos producía una mayor predisposición a la virulencia de las amibas de acuerdo al cuadro 7 observamos que las ratas adultas durante el periodo de 15 días las restricciones a las que fueron sometidos fueron determinantes cuando se utilizó suero antilinfocito e inmuran-- hidrocortisona y en ratas jóvenes en este mismo periodo de incubación, 15 días, la desnutrición fue muy importante lo cual se observó en el cuadro 8 así mismo en el periodo de incubación de 30 días en donde los valores fueron estadísticamente significativos.

ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS.

La alteración histopatológica que se presentó con más frecuencia en los tres tratamientos de restricción llevados a cabo fue la hiperplasia linfomatosa teniendo tres modalidades: ligera, moderada y acentuada, mostradas en las figuras 15, 16 y 17 respectivamente, comparativamente con los animales control éstos últimos presentaron menos alteraciones que los animales tratados con las restricciones experimentales, como podrá observarse en el cuadro 12 hubo algunos animales que no presentaron alteraciones histológicas de importan--

cia durante periodos de evolución cortos, sin embargo esta conducta no fue seguida en forma semejante por las ratas jóvenes en donde observamos que en los animales con periodos de evolución prolongados las alteraciones en el cólon se presentaron en menor proporción, no así en el intestino delgado en donde las alteraciones más importantes correspondieron a los periodos de incubación prolongados.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 8.- CONCLUSION.

1.- Se llevó a cabo un estudio experimental en ratas Long -- Evans en donde se consideraron dos esquemas de inoculación en forma previa y simultánea. En lo que se relaciona a los pesos de las ratas sometidas a las tres restricciones estudiadas tuvieron un - comportamiento semejante los tres esquemas de restricción, aparentemente la edad no influyó en ellas sin embargo la desnutrición - tuvo un efecto más importante en la edad temprana. En el tratamiento simultáneo los incrementos en las ratas jóvenes no presentaron diferencias sin embargo en las ratas desnutridas les afectó en forma importante ya que los dos esquemas de inoculación presentaron diferencias con respecto al testigo.

2.- La antigenicidad de E. chattoni fue determinada de acuerdo a los títulos de anticuerpos comparativamente con el testigo - de acuerdo a los resultados obtenidos pudimos observar que hubo - diferencias estadísticamente significativas con los tres tratamientos de acuerdo a los análisis de varianza.

3.- Cuando se determinó si el fenómeno de inmunosupresión o desnutrición en animales debe ser previo o establecido en relación a los títulos de anticuerpos pudimos observar que de acuerdo al análisis de varianza sí presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo las alteraciones histopatológicas presentaron diferencias específicas para cada caso por lo que pensamos que la invasividad de E. chattoni no puede ser atribuida exclusivamente al parásito.

4.- Cuando se investigó si la patogenicidad de E. chattoni - se encontraba en función de la edad de los animales pudimos observar que las tres restricciones se presentaron en forma diferente, al evaluar el título de anticuerpos por medio de la "t" de student mostraron diferencias estadísticamente significativas, sin - embargo las alteraciones histopatológicas en las ratas jóvenes aparentemente fueron menores aunque sí tuvieron relación con periodos de incubación prolongados.

9.- BIBLIOGRAFIA.

1.- ARROYO-BEGOVICH, A., CARABEZ-TREJO, A., RUIZ-HERRERA, J. (1978)
Composición de la pared celular de quistes de Entamoeba invadens.
Arch. Invest. Med. (Méx.); 9 supl. 1:99.

2.- BECERRA, E., MINVIELLE, L., COLORADO, F. (1952)
Consideraciones sobre mil casos de enfermos con amibiasis intestinal.
Rev. Invest. Med. ; 4:193.

3.- BERNAL, Ma. del J. (1986)
Diferencias antigénicas de tres cepas de Entamoeba histolytica y dos de Entamoeba chattoni en hámsters.
Tesis Profesional. U. M. (Méx.) D. F.

4.- ELSDON-DEW, R. & FREEDMAN, L. (1952)
Intestinal parasites in the Natal Bantu.
South American Journal of Clinical Science; 3:59.

5.- ESTRADA, L. (1985)
Investigación de los antígenos en diferentes cepas de Entamoeba histolytica.
Tesis Profesional. U. M. (Méx.) D. F.

6.- GOPAL, R. V. & PADMA, M. C. (1975)
Effect of host nutrition on inmune responses to amoebic antigen and on susceptibility to infection with E. histolytica.
Indian Journal of Experimental Biology; 13:168.

7.- GUTIERREZ, G. (1978)
Manual de Infectología.
Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 6ª edición - pág. 56.

8.- HEGNER, R. & ESKRIDGE, L. (1937)
Elimination of amoebae from rats with a high protein diet.
Journal of Parasitology; 23:105.

9.- JAMES, K. & ANDERSON, N. F. (1967)
Effect of anti rat lymphocyte antibody and humoral antibody formation.
Nature (London); 213:1195.

10.-JIMENEZ C., E., KUMATE, J. (1982)
Correlación clínica de zimodemos de E. histolytica.
Arch. Invest. Med. (Méx.); 13 supl. 3:77.

11.-KARTULIS, S. (1904)
Gehirne abscesse nach dysenterischen leberabscessen.
Zentralbl f. bakt; 3:527.

12.-LÖSCH, F. (1875)
Massenhafte emtwichelring von Amöben in Dickdarm.
Virchow's Archiv. f. Path. anat.

13.-NEAL, R. A. (1951)
Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of E. histolytica in rats.
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 44:439.

14.-ROSS, G. E. & KNIGHT, R. (1973)
Dietary factors affecting the pathogenicity of E. histolytica - in rats.
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 67:560.

15.-SARGEAUNT, P. G. & WILLIAMS, E. J. (1982)
A study of intestinal protozoa including non-pathogenic, Entamoeba histolytica from patients in a group of mental hospitals.
Am. J. Public Health; 72:178.

16.-SARGEAUNT, P. G. & WILLIAMS, J. E. (1982)
The morphology in culture of the intestinal amoebae of man.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 76:4.

17.-SARGEAUNT, P. G., WILLIAMS, J. E., KUMATE, J. & JIMENEZ, E. (1980)
The epidemiology of Entamoeba histolytica in México City.
A pilot survey I. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 74, 5:653.

18.-SARGEAUNT, P. G. (1982)
Electrophoretic isoenzyme Patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba chattoni in a primate survey.
J. Protozool; 29, 1:136.

19.-SCHAUDINN, F. (1903)
Untersuchunger uber die fortpflanzung e iniger Rhizopoden.
Arb. a. d. k. Gandhtamt; 19:547.

20.-SEPULVEDA, B. (1970)
La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica.
Gaceta médica de México; 100:101.

21.-STITES, D. P., STOBO, J. D., FUDENBERG, H. H. y WELLS, J. V.
Inmunología básica y clínica.
El Manual Moderno, S. A. de C. V. 4ª edición. 1983. pág. 336.

22.-Ibid. pág. 367.

23.-STUIVER, R. C. & GOUD, L. M. (1978)
Corticosteroid and liver amoebiasis.
British Medical Journal; 2:394.

24.-TANIMOTO-WEKI, M., GALDERON, P., de la HOZ, R. & AGUIRRE-GARCIA, J. (1974)
Inoculation of Entamoeba histolytica trophozoites in hamsters on immunosuppressive therapy.
Arch. Invest. Med.; 5 supl. 2:441.

25.-TURK, J. L. & WILLOUGHBY, D. A. (1967)
Central and peripheral effects of antilymphocyte sera.
Lam cet, I, 249.

26.-VILLAREJOS, S. V. M. (1962)
Corticosteroid and experimental amoebiasis in rats.
Journal of Parasitology; 48:194.

27.-VINAYAK, V. K., CHUGH, S., NAIK, S. R. & KULLER, G. K. (1981)
Effect of a low protein diet on rats experimentally infected with Entamoeba histolytica.
Annals of Tropical Medicine and Parasitology; 75, 4:397.

28.-VINAYAK, V. K., SAWHNEY, S., JAIN, P., CHUGH, S. & CHAKRAVARTI, R. N. (1982)
Immunosuppression and experimental amoebiasis in guinea-pigs.
Annals of Tropical Medicine and Parasitology; 76, 3:309.

29.-LAS CONDICIONES DE SALUD EN LAS AMERICAS. 1977-1980
Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la -- Salud. Washington, D. D.