



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"Iztaeala"**

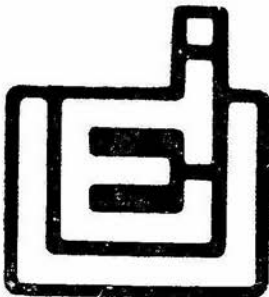
**"EL PAPEL DE LA IGA POLIMERICA EN LA  
ELIMINACION DE ANTIGENO AMIBIANO A  
TRAVES DE LA BILIS".**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
B I O L O G O**

**p r e s e n t a**

**OCTAVIO DIAZ GUERRA**



**Director de Tesis  
Dr. Rafael Campos Rodríguez**

**Los Reyes Tlalnepantla, Edo. de México.**

**1986**



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.

A tí que me exhortas que viva.

A mis padres

Rosaura Guerra e Ismael Díaz

A mis hermanos

Orlando, Sandra, Adriana, Demetrio, Roxana, Lucre y Frida.

A mi amigo

Gerardo González V.

Al Dr. Rafael Campos Rodríguez

A la Q.B.P. Claudia Barranco T.

A Aracely, Rafa y Claus.

A mis amigos.

Agradezco especialmente al  
Dr. Juan Somolinos P. su -  
colaboración y apoyo.

Mi más sincero agradecimiento a lo que fuera la División de Inmunoquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social. En especial al Dr. Jesús Kumate R. y al Dr. Armando Isibasi A. por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

	Pág.
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCION .....	2
Características de la IgA .....	2
El Componente secretorio y la cadena J .....	4
III. ANTECEDENTES .....	7
Amibiasis .....	10
Taxonomía de <u>Entamoeba histolytica</u> .....	11
Actividad patógena de <u>E. histolytica</u> .....	12
IV. OBJETIVOS .....	14
V. MATERIAL Y METODOS .....	16
Animales .....	16
Preparación del antígeno amibiano .....	16
Inmunización .....	16
Canalización del conducto biliar en ratas .....	16
Dobleinmunodifusión .....	22
Marca del antígeno amibiano .....	22
Cuantificación de proteínas .....	24
Ensayo de transporte del antígeno amibiano .....	24
VI. RESULTADOS .....	26
VII. DISCUSION .....	35
VIII. CONCLUSIONES .....	37
BIBLIOGRAFIA .....	38



## I. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de observar si los anticuerpos IgA específicos participan en la remoción a través de la bilis de antígenos amibianos circulantes.

Ratas de la cepa Long-Evans se inmunizaron con -- trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 - cultivados en medio axénico. A partir de un sonicado - de trofozoítos de E. histolytica por filtración en una columna de Ultrogel AcA 34 se separaron cinco fracciones. La fracción IV se marcó con  $^{125}\text{I}$  por el método de la Cloramina T. El antígeno marcado se inyectó por vía intravenosa en ratas no inmunes o previamente inmuniza-- das con E. histolytica y cada 30 min se obtuvieron -- muestras de sangre y bilis. La radioactividad se midió en un contador Gamma.

Los resultados muestran que la IgA-anti-E. histolytica remueve en forma activa y rápidamente a los antígenos amibianos presentes en la circulación general.

Los anticuerpos IgA poliméricos inducidos por la E. histolytica al eliminar por la bilis a los antígenos amibianos, disminuyen la posibilidad de que éstos -- formen complejos con otras inmunoglobulinas y por lo -- tanto daño tisular.

## II. INTRODUCCION

Las inmunoglobulinas no se limitan a ser moléculas capaces de combinarse con los antígenos a manera de "llave-cerradura", se trata de proteínas muy complejas; en organismos como los mamíferos existen cinco clases que son la IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, cada una con una función y características que las diferencian de las otras. Por ejemplo, en la especie humana, un anticuerpo contra el virus de la influenza sólo será eficaz si muestra ciertas características estructurales: 1) una parte de la molécula debe combinarse en forma específica con el virus de la influenza inhibiéndolo; 2) otra porción de la molécula debe permitir el paso de anticuerpos a las vías respiratorias en el lugar donde ocurre la multiplicación del virus, para lograr una fuerte concentración de estas moléculas en la región mencionada, y 3) debe existir un mecanismo que proteja la molécula contra la destrucción por las abundantes enzimas proteolíticas de las vías respiratorias. Durante la evolución el sistema inmunitario del hombre consiguió crear el tipo de especialización compleja que conjuga esta notable combinación de propiedades en una variedad única, llamada inmunoglobulina A secretoria (IgA<sub>s</sub>) (1).

### Características de la IgA.

La IgA por lo general existe en el suero de los seres humanos como una unidad de cuatro cadenas (fig.1) con un peso molecular de 160 000 D (75). Esta unidad puede presentarse en forma polimerizada dando polímeros de 8 y 12 cadenas o estructuras mayores ligadas por enlaces disulfuro. Es la inmunoglobulina predominante en las secreciones corporales (2).

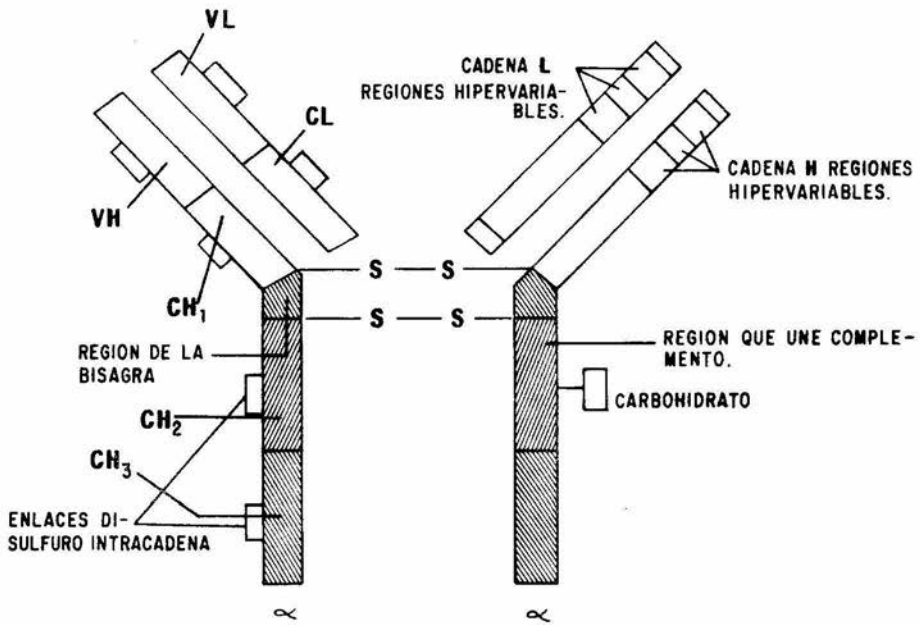


FIG. 1 Molécula de IgA sérica mostrando las partes más importantes.

Cada molécula de IgA secretoria se compone de dos unidades básicas de cuatro cadenas y una molécula de componente secretorio y de cadena J (fig.2). En un dímero de IgA, ambos monómeros tienen el mismo tipo de cadenas ligeras. El peso molecular de la IgA secretoria es aproximadamente de 400 000D (3). La IgA secretoria proporciona el mecanismo de defensa primaria contra la infección local debido a su abundancia en la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales, la mucosa nasal, el líquido protáctico, las secreciones vaginales y las secreciones mucosas del intestino delgado. El predominio de la IgA secretoria en las secreciones de las membranas ha conducido a la especulación de que su principal función puede no ser la destrucción de los antígenos, sino más bien la de impedir el acceso de estas sustancias extrañas al sistema inmune general. La IgA normalmente existe en el suero en forma monomérica, constituyendo aproximadamente 15 % del total de las inmunoglobulinas séricas (4).

El componente secretorio y la cadena J.

El componente secretorio está asociado sólo con la IgA y se encuentra casi exclusivamente en las secreciones corporales. La cadena J está asociada con todas las formas poliméricas de las inmunoglobulinas que contienen dos o más unidades básicas. La evidencia sugiere que el enlace de la IgA al componente secretorio, a la cadena J o a los dos, puede promover la polimerización de las unidades básicas monoméricas adicionales de cuatro cadenas.

El componente secretorio puede existir en forma libre o ligado a las moléculas de IgA por fuertes acciones recíprocas no covalentes, aunque se han hecho intervenir enlaces disulfuro en una pequeña fracción de las moléculas secretorias humanas de IgA. El componente secretorio es sintetizado por las células epiteliales inmóviles cercanas a la mucosa donde ocurre la secreción. Su función puede ser la de permitir que los anticuerpos IgA sean transportados a través de los tejidos de la mucosa a las secreciones (5).

El componente secretorio es una sola cadena polipeptídica con un peso molecular aproximado de 70 000D. El contenido de carbohidratos es alto, pero no se sabe con precisión. Su composición de aminoácidos difiere apreciablemente de la de todas las demás cadenas polipeptídicas, incluyendo la la cadena J. No existe ninguna relación estructural entre el componente secretorio y cualquier cadena polipeptídica de las inmunoglobulinas. Además, el componente secretorio se puede hallar libre en las secreciones de los individuos que carecen de IgA mensurable en su suero o en sus secreciones (6).

La cadena J es un pequeño glucopéptido con un alto contenido de ácidos aspártico y glutámico; tiene una rápida movilidad electroforética en geles alcalinos, a causa de su elevada naturaleza ácida, y está ligada por covalencia al penúltimo residuo de cisteína de la cadena  $\alpha$  (7).

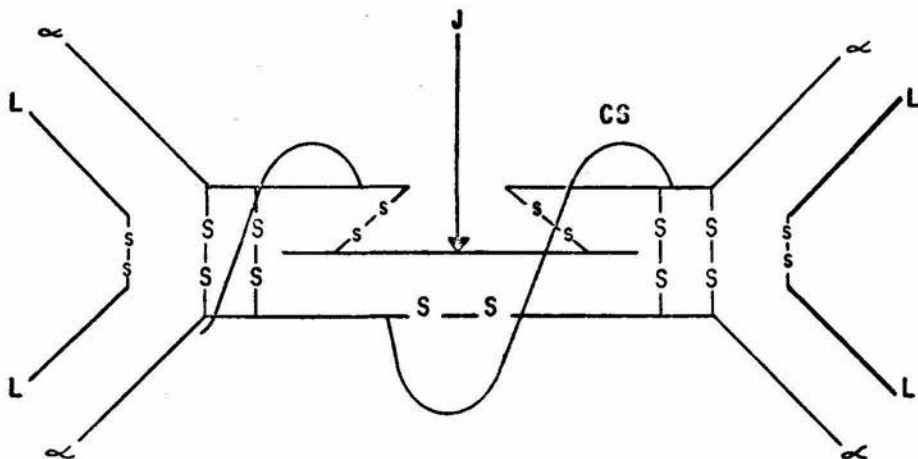


FIG. 2 Dímero de IgA en donde se observan los dos monómeros unidos por la proteína J y rodeándoles el componente secretorio (CS) — el cual tiene un peso molecular de 71000 aproximadamente, mientras que la cadena J tiene 15000. (46)

Aunque la IgA sérica es la inmunoglobulina que ocupa el segundo lugar en cuanto a abundancia, su papel -- fundamental (aunque no bien establecido) en las funciones inmunitarias del individuo corresponden al sistema -- secretor externo. Esta importante inmunoglobulina secre -- toria es producida en gran cantidad. por los tejidos -- linfoides que revisten el tubo digestivo así como las -- vías respiratorias y genitourinarias. Las moléculas de -- IgA no activan el complemento por la vía clásica, pero -- pueden activarlo a través del sistema de la properdina -- (8). Aunque la IgA no atraviesa la placenta, contribuye a las defensas inmunitarias del recién nacido por su al -- ta concentración en el calostro (1).

### III. ANTECEDENTES

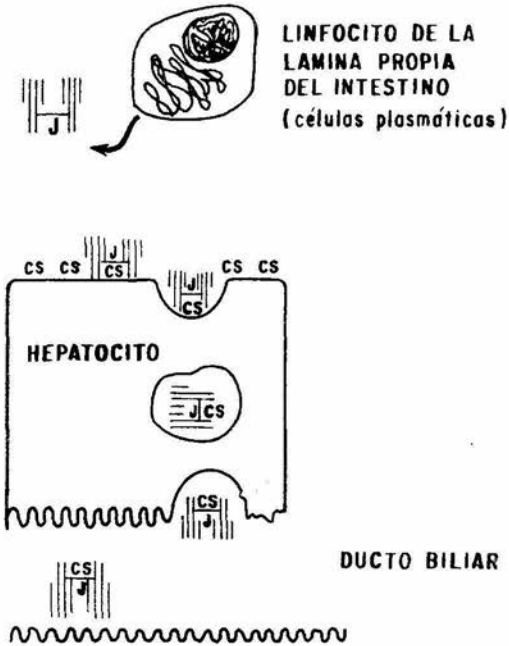
Aunque se ha mencionado cuál es la posible función de la IgA en circulación ésta no se conoce con preci -- sión incluyendo a la IgA polimérica. Esta IgA poliméri -- ca circulante procede principalmente de los linfocitos -- de la lámina propia del intestino(9,10). Recientemente -- se ha establecido que la IgA polimérica circulante se -- remueve activamente por un mecanismo de transporte hepa -- tobiliar, lo cual explica la presencia de la IgA secre -- toria en la bilis (5,11,12,13) (fig.3). Después de la -- inmunización sistémica o local (gástrica o placas de Pe -- yer) es posible detectar en la bilis de ratas anticuer -- pos específicos contra eritrocitos de carnero o DNP/ -- neumococo (14,15). También en la bilis de las ratas se -- han encontrado anticuerpos específicos contra bacterias -- y protozoarios (16,17). Por otro lado la administración

de IgA de mieloma MOPC-315 con especificidad para el DNP, acelera la eliminación de DNP-Ovoalbumina de la circulación (18). Complejos inmunes formados con el suero de conejos marcado anti-idiotipo e IgA de mieloma humano se transportan rápidamente de la sangre a la bilis de las ratas (8).

Además anticuerpos IgA específicos anti-DNP son los responsables del transporte hepatobiliar de antígenos como DNP-albúmina humana en ratones. El antígeno transportado se conserva en su mayoría intacto y formando complejos con la IgA secretoria (19). Lo mismo ocurre en el hígado perfundido en donde se encuentra que el antígeno para ser transportado debe ser de menos de 960 000 D de peso molecular (20).

De lo anterior resulta que el posible papel de la IgA circulante (en su mayoría polimérica) parece ser la de eliminar macromoléculas de la circulación evitando así la posibilidad de una respuesta sistémica y daño tisular. En apoyo a lo anterior se tiene que los sujetos con deficiencia selectiva de IgA tienen anticuerpos circulantes contra proteínas de la leche formando complejos inmunes circulantes y daño en los tejidos (21,22). Por otra parte, se sabe que la deficiencia selectiva de IgA es el transtorno más común de inmunodeficiencias humorales. Los estudios de un gran número de enfermos sugieren que la ausencia de IgA predispone a numerosas enfermedades entre las cuales se encuentran: Enfermedades pulmonares recurrentes, alergia, enfermedades de sistema digestivo, enfermedades autoinmunitarias, deficiencias selectivas de IgA debidas a factores genéticos así como su asociación con neoplasias malignas y niños con antecedentes de infecciones intrauterinas (23).





**FIG. 3** Representación del transporte de IgA a través de hepatocitos. La IgA polimérica es sintetizada en los linfocitos de la lámina propia del intestino y se une al componente secretorio que funciona como receptor en la superficie de las células hepáticas formándose una vesícula endocítica y vertiendo su contenido en el ducto biliar.

## Amibiasis

La condición de hospedar a Entamoeba histolytica - se denomina amibiasis, haya o no manifestaciones clínicas. La infección causada por E. histolytica ocurre en todo el mundo. No es una parasitosis tropical exclusivamente, ya que se ha encontrado en todos los climas, incluyendo regiones subpolares. Es una infección que afecta principalmente poblaciones de escasos recursos que viven en condiciones sanitarias pobres y carecen de una educación adecuada en higiene (24).

La mayoría de los individuos infectados con E. histolytica son portadores asintomáticos de este protozoario. La proporción entre portadores y pacientes con evidencia clínica de amibiasis invasora es difícil de estimar y varía en diferentes poblaciones. Se estima que en México esta proporción es de un paciente con amibiasis invasora por cada 4-5 portadores asintomáticos (25).

Algunos estudios recientes han mostrado que la defensa del hospedero contra la amibiasis invasora tiene participación de reacciones de inmunidad celular y humoral. En lo que respecta a la primera se ha visto que actúa en etapas posteriores a la respuesta humoral, como un mecanismo de resistencia a la reinfección. Los mecanismos de defensa de leucocitos y macrófagos no han sido caracterizados completamente. (26).

Por otra parte, en la respuesta inmune humoral se ha identificado la presencia de anticuerpos circulantes específicos, que son detectados en los pacientes una semana después de mostrar los síntomas (26). Se ha visto que son principalmente de la clase IgG (subclase 2), así como de la clase IgA cuya proporción con respecto a las otras inmunoglobulinas, así como su efecto protector contra la amibiasis, no han sido determinados. (27).

#### Taxonomía de Entamoeba histolytica.

Es un protozoario del subfilum Sarcomastigophora, de la superclase Sarcodina, clase Rhizopodea, subclase Lobosia, orden amoebida, familia Entamoebida cuyas características se enlistan a continuación (28,29).

Las formas adultas poseen prolongaciones ondulantes que parten de su cuerpo denominadas pseudópodos, y que utilizan todos los individuos para capturar sus presas. Son asimétricos o tienen simetría esférica, poseen relativamente pocos organelos. El citoplasma está netamente dividido en un ectoplasma, externo y un endoplasma, interno. El microscopio electrónico ha revelado un borde filamentosos con flecos sobre la membrana plasmática externa móvil de algunas especies. Estos flecos quizá estén constituidos por mucoproteínas que faciliten la adherencia al sustrato. El movimiento se lleva a cabo mediante la emisión de pseudópodos en donde el flujo citoplásmico depende de cambios en el estado coloidal del protoplasma (28).

En cuanto a la nutrición los seudópodos se extienden alrededor de la presa formando una copa para finalmente envolverla por completo con citoplasma. La inclusión del organismo capturado en citoplasma da origen a la formación de una vacuola alimenticia en el interior de la amiba. El ciclo de vida de E. histolytica es relativamente simple en relación al de otros organismos, no se ha demostrado la existencia de estadios sexuales, ni huéspedes intermediarios en él. La forma vegetativa, el trofozoíto, se aloja en el contenido intestinal y se reproduce por fisión binaria. Bajo condiciones apropiadas las cuales se desconocen, se diferencia en la fase infectiva llamada quiste, la cual se excreta y puede infectar nuevos huéspedes por vía oral (29).

#### Actividad patógena de Entamoeba histolytica.

El mecanismo citopatógeno no está aún bien entendido, sin embargo, ha sido estudiado por algunos investigadores "in vitro" e "in vivo". Sepúlveda (1982) observó que se pueden producir abscesos hepáticos amibianos en hamsters por inoculaciones con cultivos axénicos de E. histolytica, demostrando así que este parásito tiene actividad patógena intrínseca. Por otra parte, vió la rápida movilidad de los trofozoítos, su afinidad obvia por las células epiteliales, y la resistencia del tejido conectivo para el ataque amibiano.

Existen dos mecanismos que tienen un papel importante en la acción patógena de la E. histolytica:

- a) Efecto citocida causado por los trofozoítos vivos adheridos a las células blanco.
- b) Fagocitosis activa por la amiba.

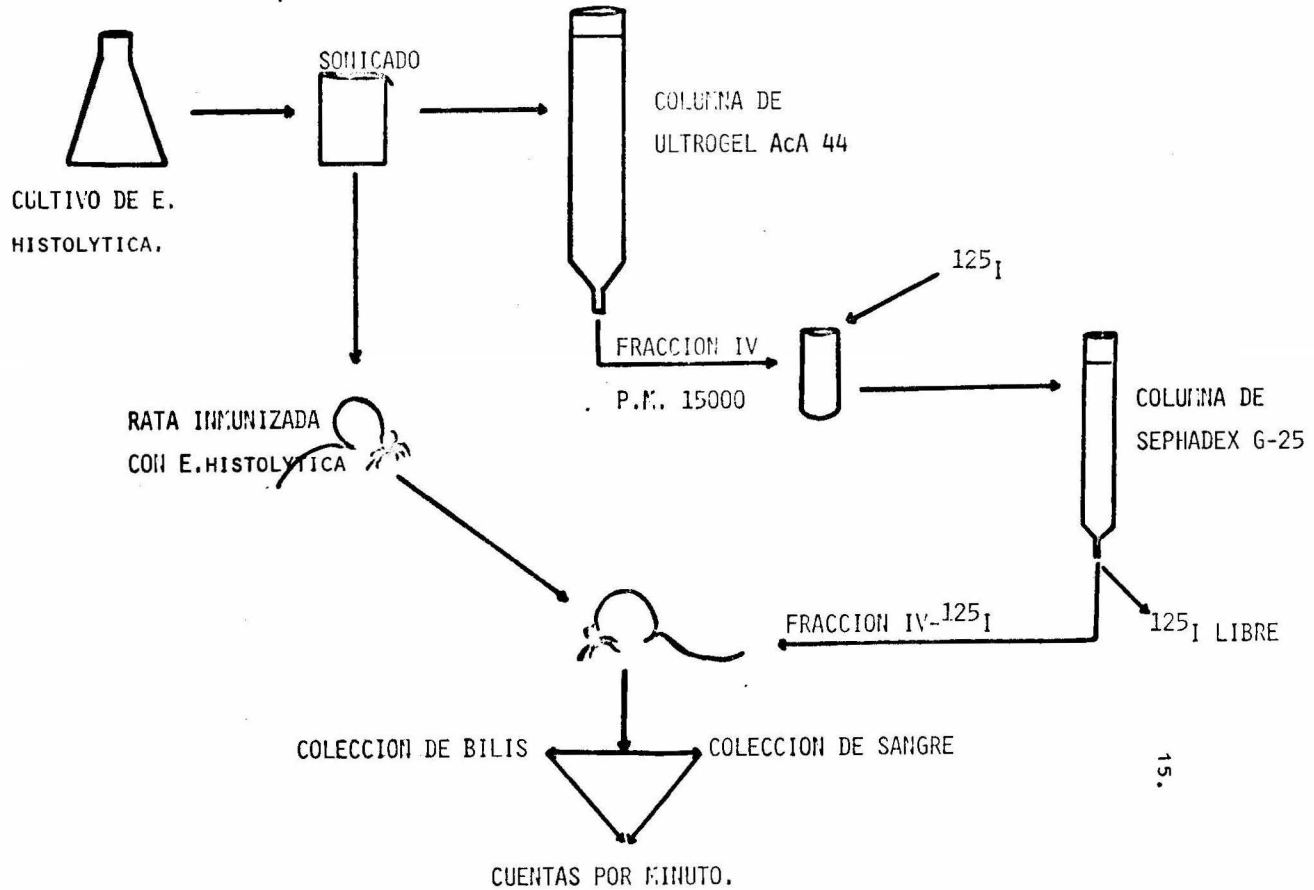
Los extractos de la mayoría de las cepas amebianas virulentas muestran un mayor efecto citopatológico (ECP), que los extractos de las cepas menos virulentas.(47).

La Entamoeba histolytica induce la producción de anticuerpos circulantes IgM, IgG, IgA (30,31,32) y de coproanticuerpos (33,34). En las ratas inmunizadas localmente con trofozoítos de E. histolytica, hay producción de anticuerpos IgA secretorios anti-amiba los cuales interactúan físicamente con ella (17,35). Por otro lado, aún cuando es posible detectar antígeno amebiano en la circulación (36,37) no hay evidencia definitiva de enfermedad producida por complejos inmunes circulantes (32). Por tanto, si la ameba induce respuesta inmune local IgA, es posible que la IgA circulante de tipo polimérico elimine el antígeno amebiano de la circulación, evitando así, la formación de complejos inmunes con otras inmunoglobulinas circulantes IgM e IgG y por lo mismo daño tisular.

## IV. O B J E T I V O S

- A) Obtención de un antígeno homogéneo a partir del sonificado de amibas.
  
- B) Observar si los anticuerpos IgA específicos contra Entamoeba histolytica, participan en la eliminación a través de la bilis de los\_ antígenos amibianos circulantes.

MATERIAL Y METODOS



## V. MATERIAL Y METODOS

Animales. Se emplearon ratas macho de la cepa Long-Evans de 4-8 meses de edad, de 250-300 g. de peso.

Preparación del antígeno amibiano. Trofozoítos de Entamoeba histolytica de la cepa HK-9 se cultivaron en medio axénico por el método de Diamond (38). Las amibas se cosecharon a las 72 h. de cultivo, se lavaron 6 veces en solución de fosfato-salina 0.15 M, pH-7.2 y posteriormente se resuspendieron a una concentración de  $20 \times 10^6$ / ml.

10 ml de la suspensión de amibas ( $20 \times 10^6$ / ml) se sonicaron durante 1 min a 100 watts con un sonicador Lab line Ultratip Labsonic-system. El sonicado de E. histolytica se centrifugó a 20 000 x g durante 20 min, el sobrenadante se dializó contra el amortiguador Tris-HCl-NaCl 0.2 M, pH-7.6; una vez terminada la diálisis se filtró en una columna de Ultrogel AcA 34 de 2.5 x 60 cm, equilibrada previamente con el mismo amortiguador y se colectaron alicuotas de 2.5 ml a una velocidad de flujo de 10ml por hora.

Inmunización. Las ratas recibieron cinco dosis de 0.2 ml de sonicado de amibas ( $20 \times 10^6$ / ml concentración inicial) cada semana por vía intraperitoneal.

Canalización del conducto biliar en ratas.

Material:

Ratas jóvenes de 250-300 g Long-Evans.

Equipo de cirugía (Fotografía Nº 1).

Nembutal como anestesia, 3-4 mg/100 g de peso.

Eter dietílico.



## Desarrollo:

Las ratas jóvenes de 250-300 g Long-Evans se anestesiaron con nenbutal vía intraperitoneal.

Se rasuró la región abdominal.

Se hizo asepsia y antisepsia de la misma región.

Se fijaron las ratas a la tabla de operación, proporcionando pequeñas dosis de éter dietílico por vía respiratoria.

Se efectuó incisión media de 5 cm de longitud.

Se descubrió la capa muscular y se efectuó una segunda incisión.

Se observó la cavidad abdominal y se identificaron los elementos anatómicos.

Se rechazó y protegió el hígado para evitar cualquier traumatismo.

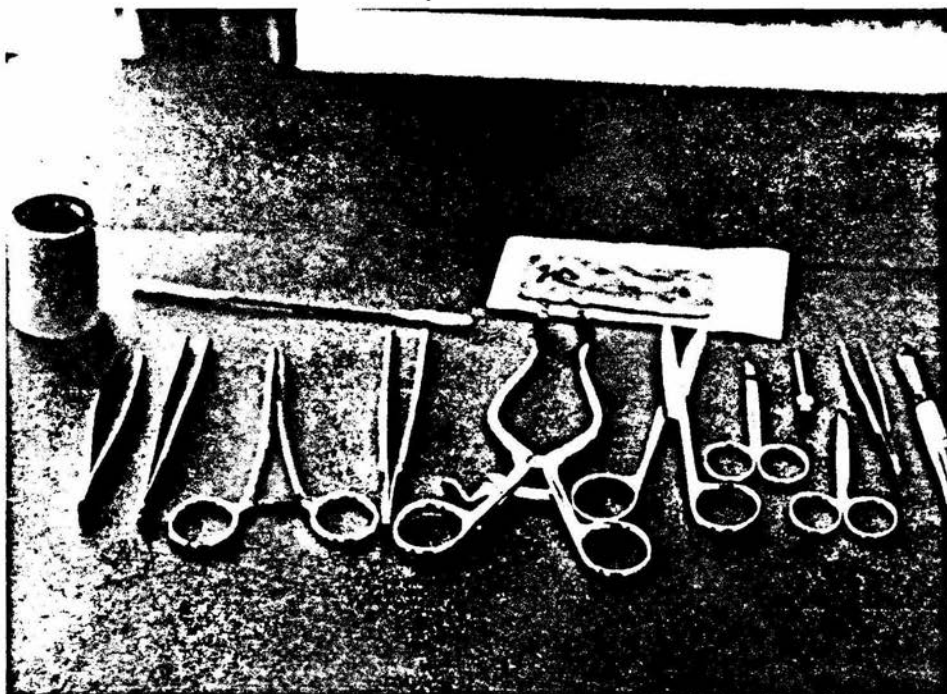
Se procedió a identificar el canalículo biliar al cual se le colocaron dos puntos de referencia. (Fotografía 2). Posteriormente a éste se le hizo una incisión en forma de V para poder introducir el catéter de polietileno de 0.5-1.0 cm de longitud a través de esta abertura (Fotografías 3 y 4).

Se observó la posición entre el catéter y el canalículo biliar la cual fue apropiada para la buena circulación de la bilis.

Se procedió a fijar totalmente el catéter en el canalículo, observando desplazamiento de la bilis a través del mismo (Fotografías 5, 6 y 7).

Se colocaron los elementos anatómicos en su posición anterior y se terminó suturando por planos.

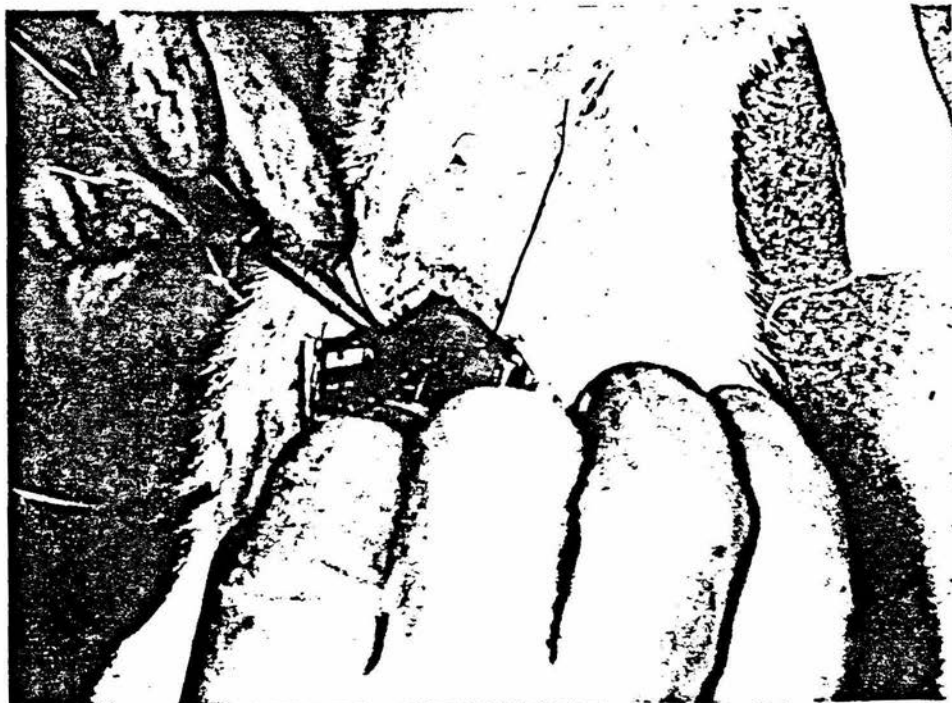
Se mantuvieron las ratas en unas cajas especiales para la colección de la bilis.



Fotografía Nº 1 MATERIAL DE CIRUGIA



Fotografía Nº 2 IDENTIFICACION DEL  
CONDUCTO BILIAR.



Fotografía Nº 3 INTRODUCCION DEL CATETER  
DE POLIETILENO EN EL CA-  
NALICULO BILIAR.



Fotografía Nº 4 PRIMER PUNTO DE FIJACION.



Fotografía Nº 5 SEGUNDO PUNTO DE FIJACION  
DEL CATETER EN EL CANALICU  
LO BILIAR.



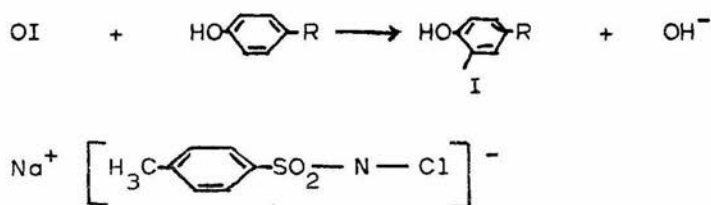
Fotografía Nº 6 CIERRE DEL SEGUNDO PUNTO  
DE FIJACION



Fotografía Nº 7 CIERRE TOTAL DEL CANALICULO BILIAR QUE RE--  
FUERZA LA FIJACION DEL  
CATETER.

Doble inmunodifusión (Método de Ouchterlony). En este método se pusieron soluciones de antígeno y anticuerpo en pozos separados dispuestos en una placa de agarosa (agarosa al 1.5 % en solución salina 0.15 M). Los reactivos difundieron y formaron bandas de precipitación en los lugares donde se encontraron en proporciones equivalentes. (39).

Marcaje del antígeno amibiano con  $^{125}\text{I}$  (Método de la cloramina T). La técnica del marcaje por Cloramina T es un método directo. El marcaje con  $^{125}\text{I}$  es de uso común; es más apropiado para estudios "in vitro" debido a su vida media que es de 60 días, por lo que respecta a este trabajo sólo se hicieron los ensayos durante 180 min. La Cloramina T es un agente oxidante y es la sal sódica del N-monocloruro derivado del p-tolueno sulfonamida. El  $^{125}\text{I}$  es oxidado e incorporado en la molécula proteínica principalmente con residuos de tirosina a un pH ligeramente alcalino (43,44).



Material y equipo:

Todos los reactivos se prepararon antes del marcaje.

Proteína para la yodación 500  $\mu\text{g/ml}$  en 0.1 M Tris-HCl - pH-7.4.

Cloramina T 1 mg/ml en Tris-HCl.

Metabisulfito de sodio 2 mg/ml en Tris-HCl  $5 \times 10^{-5}$  M.

Ioduro de potasio en Tris 1 mg/ml en Tris-HCl.

Amortiguador de fosfato-salina (PBS) con gelatina 2.5% p/v

Sephadex G-25.  
Contador Gamma.  
 $^{125}\text{I}$ -Sodio 0.5 mCi.

Método:

- 1- Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de proteína (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentración inicial) con 0.5 mCi  $^{125}\text{I}$  y 10  $\mu\text{l}$  de Cloramina T (1 mg/ml concentración inicial).
- 2- Se incubaron de 2-4 min a temperatura ambiente.
- 3- Se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de solución de metabisulfito de so  
o (2 mg/ml concentración inicial) y se mezclaron fuerte  
mente.
- 4- Después de dos minutos se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de solución de Ioduro de potasio.
- 5- La proteína marcada se separó del Iodo libre usando - una columna de sephadex G-25 equilibrada con PBS que contenía 0.25 % de gelatina.
- 6- La columna se eluyó con PBS que contenía gelatina y - colectaron fracciones de 0.5 ml.
- 7- Se determinaron las cuentas por minuto (CPM) de cada fracción usando un contador Gamma.
- 8- Se identificó el primer pico de radioactividad, ésto  
fue la proteína marcada. Se almacenó a 4°C para uso.

Nota de la técnica- Esta técnica puede ser usada para yo  
dar anticuerpos unidos a un antígeno inmuoadsorbente (és  
to protege al sitio activo). El iodo libre es removido --  
por lavado con amortiguador, y el anticuerpo marcado recu  
bierto por elución ácida.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Reactivos:

A-  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N.

B- Diluir v/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.1 %.

C- Tartrato de sodio y potasio al 2 %.

Reactivo alcalino 25 ml de A + 0.5 ml de B.

Reactivo de enol; diluir el reactivo comercial de fenol-Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico fosfotúngstico), de Sigma en agua destilada 1:1.

Procedimiento:

La muestra de 5-100  $\mu\text{g}$  de proteína, en un volumen de cuando mucho 200  $\mu\text{l}$ , se colocó en los tubos adecuados (tubos de borosilicato de 4 ml). Se incluyeron también una serie de muestras de proteína de concentración conocida para la curva estándar.

Se añadió 1 ml del reactivo alcalino a cada tubo, mezclando bien y dejando reposar 15 min a temperatura ambiente.

Se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de fenol, mezclando bien y dejando reposar 30 min a temperatura ambiente.

Se leyó al espectrofotómetro. El pico máximo de absorción fue a 750 nm (40,41).

Nota: Si la muestra es concentrada puede leerse a 500 nm.

Ensayo de transporte de antígeno amibiano. Rutas normales (sin inmunizar y desparasitadas) y ratas previamente inmunizadas con amibas, se canalizaron del conducto biliar, según método descrito previamente (15). Una vez canalizadas se introdujo 0.5 ml de antígeno amibiano marcado, a través de la vena dorsal de la cola de la rata. La colección de bilis y sangre se efectuó cada 30 min (0.5 ml). La radioactividad presente en las muestras se leyó en un contador Gamma Beckman 550.



Nota: Se utilizaron 35 ratas inmunizadas, así como 25 -- normales, para la estandarización de la técnica. Usando - las ratas normales como controles y sólo tomando en cuenta 5 inmunizadas para la prueba final.

## VI. RESULTADOS

Se obtuvieron cinco fracciones (fig.4) en donde se observa que el peso molecular de la fracción IV, utilizando marcadores, es de aproximadamente 15 000 D. La antigenicidad de las cinco fracciones se probó por doble-inmunodifusión con sueros específicos anti-amiba, tanto de ratas inmunizadas con Entamoeba histolytica, como -- con sueros de paciente con absceso hepático amibiano -- (figs. 5 y 6). La fracción IV, que fue reconocida por la mayoría de los sueros, se concentró por liofilización, se le cuantificó la presencia de proteína por el método de Lowry obteniéndose una concentración de 2 mg/ml (fig.7) y se procedió a marcarla (fig.8). La actividad específica del marcaje fue de  $3 \times 10^6$  CPM/mg.

En la figura 9 se muestran los valores promedio de los experimentos y puede observarse que en los 30 min -- posteriores a la inyección del antígeno no se encontró radioactividad en la bilis, entre los 30-60 min ocurrió un rápido incremento, al mismo tiempo que en la sangre -- hubo un descenso marcado. Después de los 60 min no se -- observaron modificaciones en la radioactividad presente en la sangre y bilis.

Por otro lado, en las ratas normales la concentración de radioactividad permaneció constante en la sangre, aunque entre los 30-60 min hubo un incremento en -- bilis éste no fue significativo al compararlo visualmente con los valores de las ratas inmunizadas.

En el cuadro 1 se observan los valores de radioactividad presente en sangre y bilis (ratas inmunizadas) expresados como CPM/ml.

Al cabo de 180 min a una velocidad de flujo de 1.4 ml/h la cantidad de radioactividad fue de 34 692 CPM que corresponden al 4.5 % de la carga antigénica total inyectada.

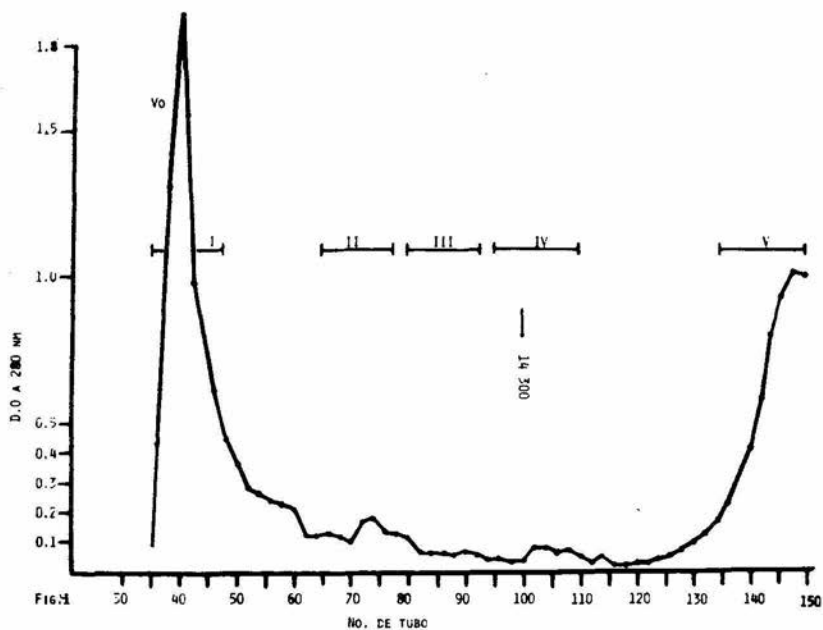


Fig. 4

Perfil de elución de la suspensión de Entamoeba histolytica cepa HK-9 ( $20 \times 10^6$ / ml) cromatografiada en Ultrogel AcA 34, amortiguador Tris HCl pH-7.6, 0.2 M. Donde se observan las cinco fracciones obtenidas, siendo la fracción IV -- con un peso molecular de aproximadamente 15 -- 000 D, reconocida por la mayoría de los anti-- sueros específicos.

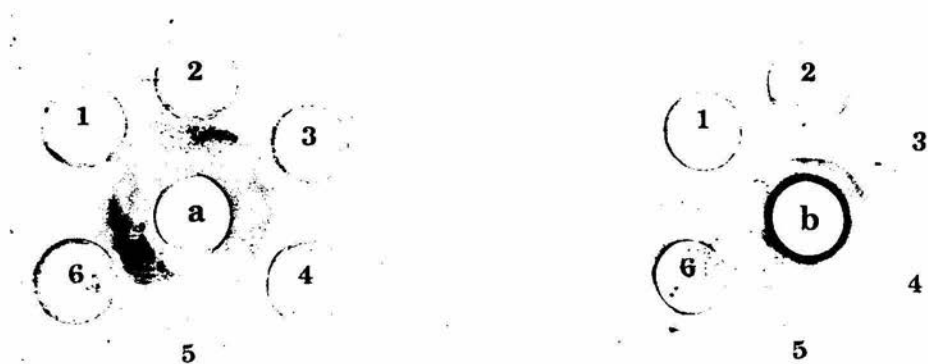


Fig. 5 a Suero de paciente con absceso hepático amibiano.  
 b Suero de rata inmunizada con Entamoeba histolytica.

1 Fracción I  
 2 Fracción II  
 3 Fracción III  
 4 Fracción IV  
 5 Fracción V  
 6 Sonicado de amiba.

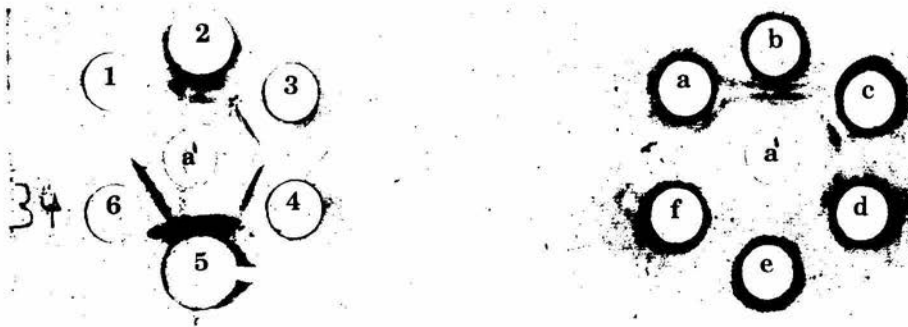


Fig. 6

Dobleimmunodifusión de la fracción IV (a') con sueros de paciente con absceso hepático amibiano (1,2,3,4,5,6) y con suero de ratas inmunizadas con E. histolytica (a,b,c,d,e,f).

Abs. (550 mm)

0.17  
0.16  
0.15  
0.14  
0.13  
0.12  
0.11  
0.1  
0.09  
0.08  
0.07  
0.06  
0.05  
0.04  
0.03  
0.02  
0.01

CURVA ESTANDAR

31 .

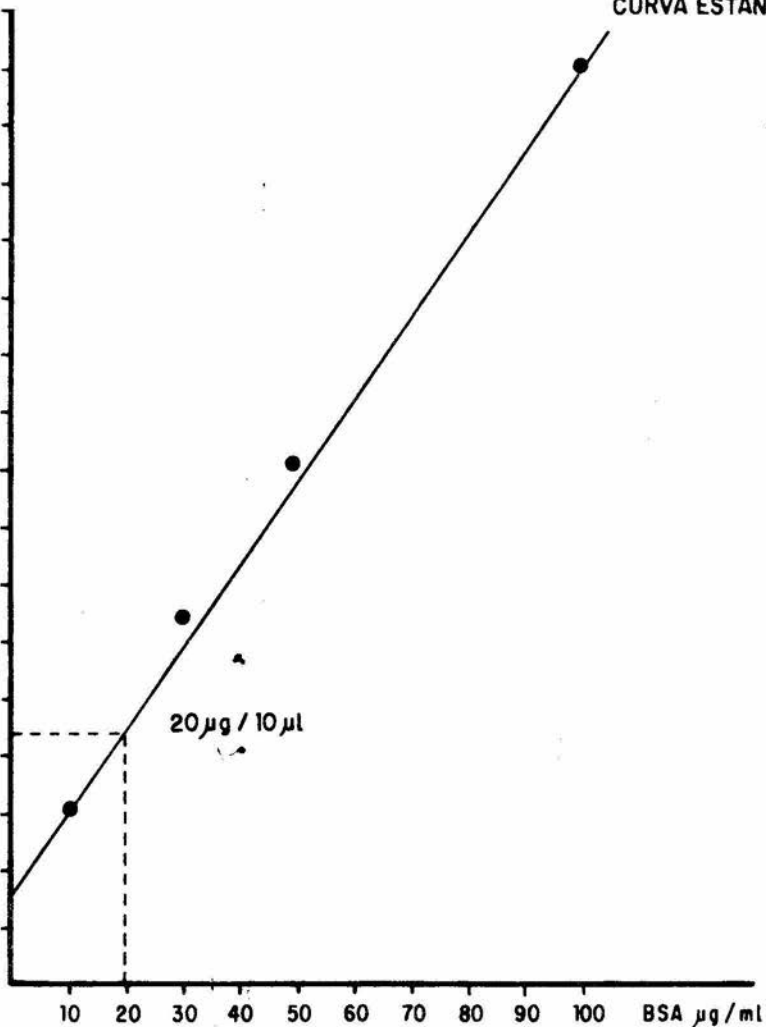


Fig. 7 Curva para la determinación de proteína de la fracción IV, por el método de Lowry.

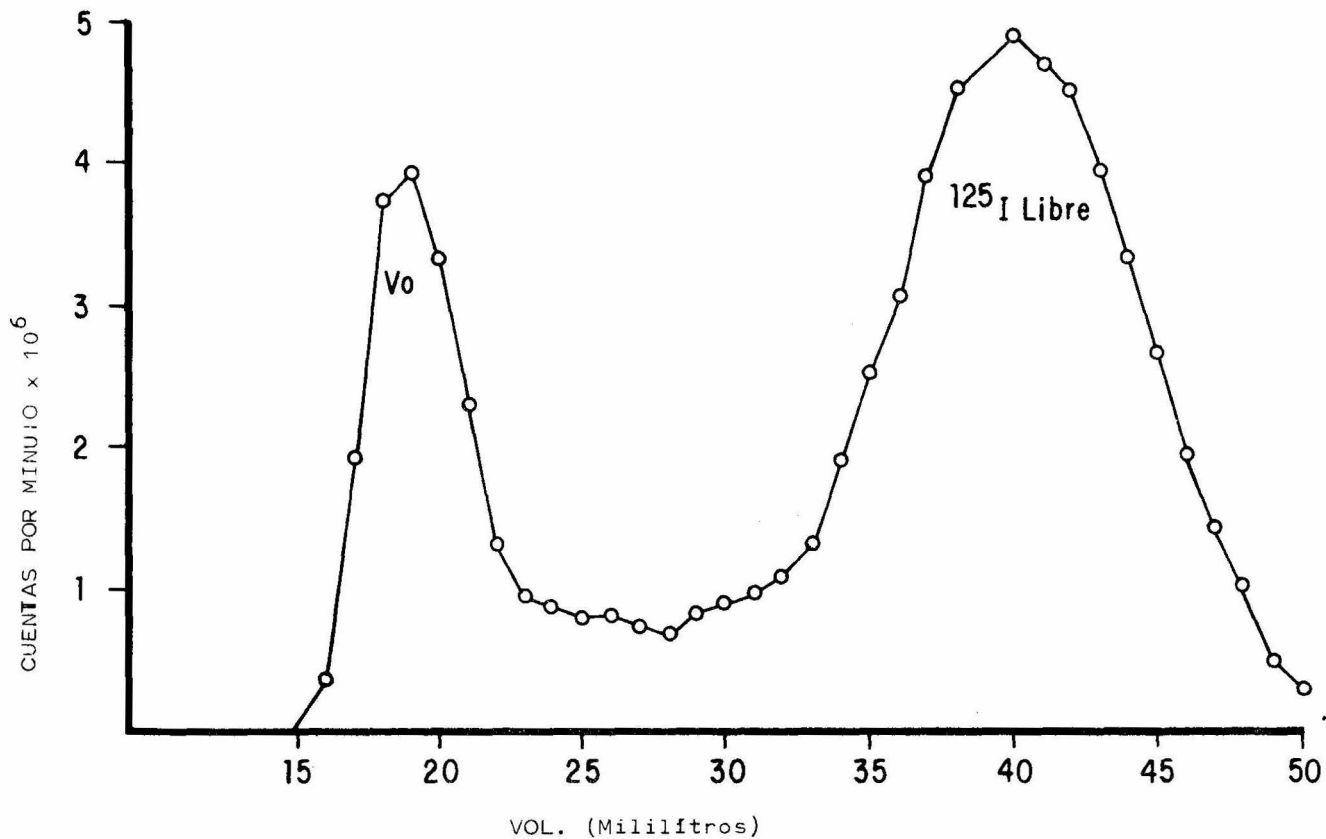


Fig.8. Curva de elución del antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$  en una columna de Sephadex G-25, amortiguador de fosfato-salina pH-7.2, 0.15M, adicionada de 0.25 % de gelatina.



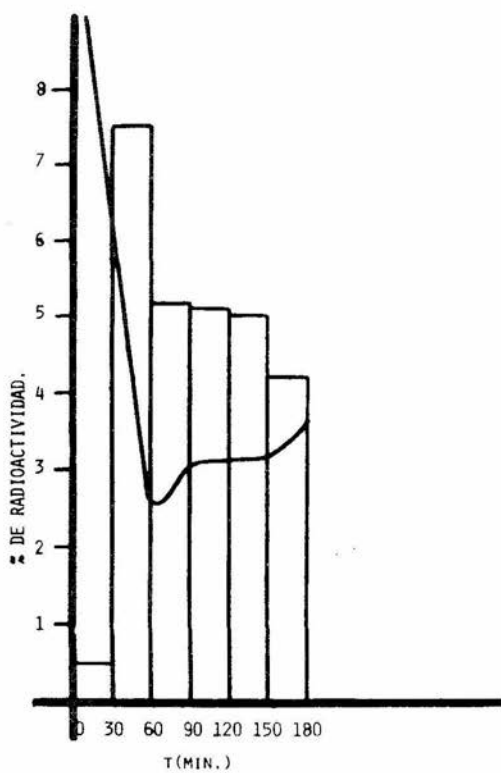


Fig. 9

La radioactividad presente en la sangre (—) y en la bilis (Barras) se expresan como el % de la radioactividad inyectada. El 100 % se obtiene dividiendo el N° de CPM totales entre el volumen de sangre. Los valores representan la media de los ensayos.

CUADRO N° 1. Radioactividad en la sangre y la bilis de ratas inyectadas intravenosamente con antígeno amibiano marcado con  $^{125}\text{I}$ . (700 000 CPM).

TIEMPO DE COLECCION DE LA MUESTRA (min)		CPM/ml.	
SANGRE	BILIS	SANGRE	BILIS
	0 - 30		420
30		22550	
	30 - 60		13780
60		5200	
	60 - 90		7300
90		2250	
	90 -120		4740
120		2480	
	120 -150		4932
150		2560	
	150 -180		3940
180		2680	

## VII. DISCUSION

De acuerdo con los resultados observados, el antígeno administrado intravenosamente se transfiere activamente en la bilis de ratas inmunizadas con Entamoeba histolytica, pero no en ratas normales.

En algunos trabajos previos, se ha visto que en ratas canalizadas por 48 h los niveles de IgA en lavados de intestino son diez veces menores que en ratas control. Esto significa que la IgA de bilis puede tomar un papel importante en el sistema secretorio IgA del intestino. (14).

Sacken y col (1981) demuestran en hígados perfundidos que complejos de IgA-secretoria-antígeno se transfieren de sangre a bilis, mientras que no sucede lo mismo cuando el antígeno está unido a IgG (20).

Por otra parte, se ha visto que complejos IgA secretoria-antígeno de menos de 460 000 D de peso molecular se transportan con mayor efectividad que los que tienen un peso molecular superior; de donde se deduce que es importante el peso molecular del antígeno para que sea transportado (20).

El antígeno marcado se detectó en la bilis 30 min después de su administración y la máxima eliminación ocurrió entre los 30-60 min. Esta cinética de eliminación es muy similar a la observada en otros estudios donde IgA polimérica o complejos de IgA-antígeno (45).

Puesto que los anticuerpos IgG e IgM no se trasladan activamente a través del hepatocito (8), los anticuerpos de IgA polimérica anti-amiba fueron los responsables del transporte del antígeno amibiano de la circulación sistémica a la bilis.

La eliminación del antígeno amibiano ocurrió en forma activa, ya que 30 min después de la inyección del antígeno marcado, la cantidad de radioactividad presente en la bilis siempre fue mayor que en la sangre; ello indica que el transporte del antígeno se realizó en contra de un gradiente de concentración.

Aun cuando está claro que hay eliminación de antígeno amibiano circulante, y por lo tanto, menor posibilidad de que forme complejos inmunes con IgG o IgM que fijan complemento y pueden causar daño tisular, desconocemos qué tan importante sea en situaciones como el absceso hepático amibiano en el cual hay daño importante de los hepatocitos, y por lo tanto menor capacidad de transporte. Sin embargo, puesto que prácticamente toda la IgA polimérica procede de la mucosa intestinal, es posible que esta inmunoglobulina impida la entrada y remueva activamente a los antígenos procedentes de la luz intestinal.

## VIII. CONCLUSIONES

- A) Se obtuvo un antígeno, cuyo peso molecular - fue aproximadamente 15 000 D. Fue reconocido por el suero de ratas inmunizadas con Entamoeba histolytica y por el de pacientes con absceso hepático amibiano.
- B) El antígeno amibiano se transfiere activamente de la sangre a la bilis en ratas inmunizadas con E. histolytica pero no en ratas normales.
- C) El antígeno se transfiere por IgA secretoria ya que se ha visto que IgG e IgM no se transfieren.
- D) Consideramos que este es un trabajo cuyos resultados son preliminares y deben tomarse en cuenta para futuros estudios relacionados -- con el tema.

BIBLIOGRAFIA.

38.

1. Bellanti, . 1981. Inmunología II. Anticuerpos e Immunoglobulinas: Estructura y Función. Interamericana 2a. ed. México. Cap. 5.
2. Tomasi, T.B., Tan, E.M., Solomon, A. y Prendergast, R.A. 1965. Characteristics of immune system common to certain external secretions. J. Exp. Med. 121: 101
3. Heremans, J.F. 1974. Structure and Function of Immunoglobulin IgA. Behring Inst. Mitt. 54: 1
4. Vaerman, J.P. 1973. Structure et propriétés des IgA. Revue Française des maladies respiratoires 1: 871
5. Lemaitre-Coelho, I., Acosta, G., Barranco, C. Meykens, R. y Vaerman, J.P. 1981. In vivo experiments involving secretory component in the rat hepatic transfer of polymeric IgA from blood to bile. Immunology. 43: 261
6. Waldman, R.H., Mach, J.P., Stella, M.M. y Rome, D.S. 1970. Secretory IgA in human serum. J. Immunol. 105: 265
7. Stites, D.P. 1983. Inmunología Básica y Clínica. Inmunoglobulinas I: Estructura y Función. El manual moderno 4a. ed. México.
8. Russell, M.W., Brown, T.A. y Mestecky, J. 1981. Role of serum IgA hepatobiliary transport of circulating antigen. J. Exp. Med. 153: 968
9. Heremans, J.F. 1974. The IgA system in connection with local and systemic immunity. Adv. Exp. Med. Biol. 45: 3

10. Hall, J.E., Orlans, E., Peppard, J. y Reynolds, J. 1978. Lymphatic Physiology and secretory immunity. Adv. Exp. Med. Biol. 107: 29
11. Lemaître-Coelho, I., Jackson, G.D.F. y Vaerman, J.P. 1978. Transfer of MOPC-315-IgA to secretions in MOPC-315 tumor bearing and normal BALB-c mice. Protides Biol. Fluids. Proceedings of the 25th colloquium. Pag. 919
12. Lemaître-Coelho, I., Jackson, G.D.F. y Vaerman, J.P. 1977. Rat bile a convenient source of secretory IgA and free secretory component. Eur. J. Immunol. 8: 588
13. Vaerman, J.P., Lemaître-Coelho, I. y Jackson, G.D.F. 1978. Role of the liver in the rat intestinal s-IgA system. Adv. Exp. Med. Biol. 107: 233
14. Lemaître-Coelho, I., Jackson, G.D.F. y Vaerman, J.P. 1978. Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. Scand. J. Immunol. 8: 459
15. Barranco, C. 1981. Búsqueda de respuesta secundaria de la clase IgA en ratas inmunizadas, Tesis Licenciatura. ENCB. IPN.
16. Acosta, G., Campos, R., Barranco, C., Isibasi, A. y Kumate, J. 1983. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of Entamoeba histolytica. Ann. New York Acad. Sci. 409: 760
17. Stokes, C.R., Swarbrick, E.T. y Soothill, J.F. 1980. Immune elimination and enhanced antibody responses: functions of circulating IgA. Immunology. 40: 455

18. Peppard, J., Orlans, E., Payne, A.W.R. y Andrew, E. 1981. The elimination of circulating complexes containing polymeric IgA by excretion in the bile. *Immunology*. 42: 83
19. Cunningham-Rundles, C., Brandeis, W.E. y Good, R.A. 1978. Milk precipitins immune complexes and IgA deficiency. *proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 3387
20. Socken, J.D., Simms, E.S., Nagy, B.R., Fisher, M.M. y Underdown, B.J. 1981. Secretory component-dependent hepatic transport of IgA antibody-antigen complexes. *J. Immunol.* 127: 316
21. Cunningham-Rundles, C., Brandeis, W.E. y Pudifin, N.K. 1981. Autoimmunity in selective IgA deficiency relationship to anti-bovine protein antibodies, circulating immune complexes and clinical disease. *Clin. Exp. Immunol.* 45: 299
22. Ortiz-Ortiz, L., Gómez, R. y Estrada-Parra, S. 1974. ¿ Existen complejos inmunes en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano ? *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. 5 (supl 2): 491
23. Mc. Murray, D.N. y Rey, H. 1981. Immunological sequelae of intrauterine infection. *Clin. Exp. Immunol.* 44: 389
24. Bos, H.J., Peters, W., y Folmer, H.R. 1981. Amibiasis e infecciones por protozoos. Real Instituto Tropical Amsterdam, Países Bajos. 1-29
25. Ramamurti, D.V. y Stickl, H. 1973. Amoebiasis and the Entamoeba histolytica, *Infection*. 1: 92



26. Catty, D. y Ross, I.N. 1979. Immunological aspects of infection with gastrointestinal parasites (protozoa and nematodes). In Immunology of the gastrointestinal tract. Ed. Peter Asquith. Chap. 13 p. 246-267
27. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. 1976. Memorias sobre la conferencia internacional sobre amibiasis. IMSS. México.
28. Russell-Hunter, W.D. 1979. A life of invertebrates. Mc. Millan Publishing Co. Inc. U.S.A. p. 104
29. Barnes, R.D. 1977. Zoología de los invertebrados. 3a ed. Interamericana. México p. 33
30. Perches, A., Kretschmer, R., Lee, E. y Sepúlveda, B. 1970. Determinación de inmunoglobulinas en el suero de pacientes con amibiasis invasora. Arch. Invest. Méd. (Méx) 1(supl 1): s-97
31. Dasgupta, A. 1974. Immunoglobulin in health and disease. III immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. Clin. Exp. Immunol. 16: 163
32. Trissl, D. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. Infec. Dis. 4: 1154
33. Shaalan, M. y Baker, R.P. 1970. Detection of coproantibodies in amoebiasis of the colon: a preliminary report. Am. J. Clin. Pathol. 54: 615

34. Martínez-Cairo, C.S., Gorab, A. Muñoz, O. y Reyes, M. 1979. Coproanticuerpos en amibiasis intestinal. Arch. Invest. Méd. (Méx) 10: 121
35. Acosta, G., Barranco, C., Campos, R., Isibasi, A. y Kumate, J. 1981. Inducción de anticuerpos IgA en la bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) 12: 63
36. Resano, P.F., Trujillo-Arellano, J., Jiménez-G. y Palacios-Beristain. 1983. Detección de antígeno amibiano por el método de ELISA en el suero de pacientes con absceso hepático. Arch. Invest. Méd. (Méx) 13(supl 3): s-301
37. Kessler, W.S. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein. J. Immunol. 115: 1617
38. Diamond, L.S., Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trp. Med. Hyg. 72: 431
39. Rose, N.R. y Friedman, H. 1980. Manual of clinical Immunology. 2a. ed. American Society For Microbiology. Washington D.C. pag. 573-575
40. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurment with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265

41. Hartree, E.F. 1972. Determination of protein. A modification of the Lowry method gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 122
42. Fahey, J.L. 1967. Chromatographic separation of immunoglobulin. In *Methods in immunology and immunochemistry*. vol. 1: 322
43. Hunter, W.M. 1978. Radioimmunoassay. In *Handbook of Experimental Immunology*. Ed. D.M. Weir. Cap. 14
44. Talmage, D.M. 1967. Labeling of antigen and antibodies. In *Methods in immunology and immunochemistry*. vol. 1: 389
45. Elaine-Rose, M., Orleans, E. y Andrew, W.R. 1981. The origin of IgA chicken bile: its rapid active transport from blood. *Eur. J. Immunol.* 11: 561
46. Benacerraf, B. y Unanue, E. 1979. *Text book of Immunology*. Williams & Wilkins Co. U.S.A. Chap. 3
47. Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: Host-pathogen Biology. *Rew. Intec. Dis.* 4: 1247

## LISTA DE ABREVIATURAS

IgA	Inmunoglobulina A
IgA <sub>s</sub>	Inmunoglobulina A secretoria
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
VL	Región variable de la cadena ligera
CL	Región constante de la cadena ligera
CH <sub>1</sub> , CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	Regiones constantes de las cadenas pesadas
CS	Componente secretorio
S	Azútre de los enlaces disulfuro
J	Cadena J
DNP	Hapteno dinitrophenol
mCi	Milicuries
ul	Microlitros
ug	Microgramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
CPM	Cuentas por minuto
°C	Grados centígrados