

03062  
20j.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACION BIOMEDICA**

**DESARROLLO DE UN METODO INOCUO PARA  
INHIBIR LA DEGRADACION ENZIMATICA DE  
LOS ANTIGENOS AMBIANOS: ANALISIS DE  
ALGUNAS PROPIEDADES INMUNOLOGICAS**

**P o r :**

**JAYA LEA LILIAN PORTNOY GRUNBERG**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA**

**MEXICO, D. F.,**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1988**



## **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.

## RESUMEN

Una de las características más relevantes de los extractos de Entamoeba histolytica es su gran actividad enzimática. Esta peculiaridad trae como consecuencia su capacidad de digerir proteínas no sólo extrínsecas sino también del mismo parásito. Esta propiedad de E. histolytica ocasiona una inestabilidad durante la preparación de sus extractos que dificulta su caracterización y su uso potencial en inmunoprofilaxis. En este reporte se presentan evidencias que indican que el tratamiento de los extractos de E. histolytica por medio de un choque ácido a pH 2, de 30 minutos a 37°C inhibe irreversiblemente la actividad enzimática del extracto sin alterar su estructura antigénica ni su inmunogenicidad, como lo demuestra su reactividad con anticuerpos policlonales anti-E. histolytica, así como su capacidad de inducir anticuerpos y de proteger contra el desafío intra-hepático de trofozoítos de E. histolytica.

Por otra parte, el antígeno enriquecido en carbohidratos del extracto amibiano no presenta todos los determinantes antigénicos que reconocen anticuerpos monoclonales y policlonales anti-E. histolytica.

## INDICE

Introducción.....	1
Material y Metodos.....	8
Animales.....	8
Trofozoitos de <u>E. histolytica</u> de la cepa HM1.....	8
Antigenos de <u>E. histolytica</u> .....	8
Antigenos control recién preparado (AgTto).....	8
Antigenos Deslipidizados.....	8
Antigenos Estabilizados (AgE).....	8
Antigenos Degradados (AgD).....	9
Antigenos enriquecidos en carbohidratos.....	9
Sueros de ratón inmunes anti- <u>E. histolytica</u> .....	9
Titulo de anticuerpos hemaglutinantes.....	10
Inhibición de la hemaglutinación.....	10
Inhibición de la reacción de ELISA.....	10
Determinación de la actividad proteolítica.....	11
Electroforesis en Geles de poliacrilamida-SDS.....	12
Inmunotransferencias.....	12
Tinción de glicoproteínas reconocidas por Con A.....	13
Inmunoplot.....	14
Ensayos de Inmunoprofilaxis.....	14
Resultados:	
Cinetica de la actividad proteolítica del antígeno amibiano.....	15
Determinación de la actividad proteolítica en los antigenos amibianos.....	17
Análisis electroforético comparativo de los antigenos amibianos.....	21
Inmunotransferencia.....	24
Titulo de anticuerpos hemaglutinantes.....	26
Inhibición de la Hemaglutinación con diferentes preparaciones de antígeno.....	28
Persistencia de los carbohidratos presentes en los antigenos amibianos.....	30
Inmunoplot.....	32
Inhibición de la Hemaglutinación en el antígeno amibiano total y el enriquecido en carbohidratos.....	36
Inhibición de la reacción de ELISA con el antígeno enriquecido en carbohidratos.....	38
Inmunoprofilaxis.....	41
Discusión.....	43
Bibliografía.....	50

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Cinética de la actividad proteolítica del antígeno ambiano.....	16
Tabla 1 Determinación de la actividad proteolítica en antígenos ambianos.....	19
Tabla 2 Determinación de la actividad proteolítica del antígeno ambiano en presencia de inhibidores de proteasas y el estabilizado por choque ácido.....	20
Figura 2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %.....	22
Figura 3 Densitometría.....	23
Figura 4 Inmunotransferencia.....	25
Tabla 3 Título de anticuerpos hemaglutinantes.....	27
Tabla 4 Inhibición de la Hemaglutinación con diferentes preparaciones de antígeno.....	29
Figura 5 Persistencia de los Carbohidratos presentes en los antígenos ambianos.....	31
Figura 6 Inmunoplot.....	34
Tabla 5 Inhibición de la hemaglutinación con el AgTto y el enriquecido en carbohidratos.....	37
Tabla 6 Inhibición de la reacción de ELISA con el antígeno enriquecido en carbohidratos y anticuerpos monoclonales anti- <u>E. histolytica</u> .....	39
Tabla 7 Inhibición de la reacción de ELISA con un antígeno enriquecido en carbohidratos y anticuerpos policlonales anti- <u>E. histolytica</u> .....	40
Figura 7 Inmunoprolifaxis.....	42

### ABREVIATURA

AFM:	Acetato de fenilmercurio
AgTto:	Antígeno control recién preparado
AgE:	Antígeno Estabilizado
AgD:	Antígeno Degradado
AHA:	Absceso hepático amibiano
BSA:	Albumina sérica bovina
Con A:	Concanavalina A
IA:	Iodoacetato
kDA:	KiloDalton
NEM:	N-etilmaleimida
PBS:	Amortiguador de fosfatos
PBS-T:	PBS con Tween 20 al 0.3%
PBS-Tw:	PBS con Tween 20 al 0.05%
PHMB:	p-hidroximercurio benzoato
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
UHA:	Unidades de hemaglutinación

## INTRODUCCION

Las infecciones por Entamoeba histolytica representan un problema de salud pública particularmente en países en vías de desarrollo, con una distribución mundial no limitada a la áreas tropicales (Ortiz-Ortiz y Avella, 1984). Aproximadamente un 10 % de la población mundial porta al parásito, aunque los pacientes representan una menor proporción. En algunos países como México, la amibiasis se encuentra entre las primeras diez causas de muerte y a nivel mundial ocupa el tercer lugar después de malaria y esquistosomiasis como causa de muerte por parásitos (Walsh, 1986).

La amibiasis es una parasitosis ocasionada por el protozoario E. histolytica, que se puede dividir en dos grupos: intestinal y extra-intestinal. En el primero se incluyen los casos de portadores asintomáticos y los de disenteria crónica y aguda. La amibiasis intestinal aguda así como la extra-intestinal se consideran amibiasis invasoras. Esta última puede localizarse en cualquier órgano siendo el hígado el más frecuentemente afectado y en algunos casos puede conducir a la muerte (Ortiz-Ortiz y Avella, 1984; Guerrant, 1986).

En el ciclo de vida del parásito se reconocen dos estadios. Uno es el quiste infeccioso no-móvil que tiene de dos a cuatro núcleos y puede sobrevivir fuera del huésped por meses en un ambiente húmedo. Cuando se ingiere, la pared del quiste funciona como una barrera a la acidez gástrica normal, y al llegar al intestino (grueso o delgado) se transforma en metaquistico por otra división nuclear, presentando ahora ocho núcleos. Posteriormente se liberan ocho trofozoitos uninucleados que representan el otro estadio del parásito o forma móvil. Estos trofozoitos se multiplican por fisión binaria y se instalan en el intestino grueso, donde ocurre la invasión tisular y la posible presencia de síntomas como diarrea, disentería y otros más severos. Los individuos infectados pueden excretar hasta 45 millones de quistes por día. Se desconocen las condiciones que inducen al enquistamiento de los trofozoitos, así como las causas del proceso contrario (Chayen y Avron, 1985; Guerrant, 1986; Ravdin, 1986)

Las diferentes especies de Entamoeba se pueden distinguir por la movilidad electroforética de ciertas isoenzimas (Sargeant y col., 1982). Todas las E. histolytica aisladas mostraron tener una migración muy similar a la malato deshidrogenasa. Sin embargo, al analizar la movilidad de la combinación del patrón



isoenzimático, es decir del zimodemo que incluye la movilidad de hexoquinasa, glucosa fosfato isomerasa y fosfoglucomutasa, se encontró que los trofozoitos provenientes de amibas comensales (no patógenas) eran diferentes de los provenientes de individuos enfermos (patógenos). No obstante, las cepas patógenas difieren en la capacidad de inducir absceso hepático cuando los microorganismos cultivados en medio axénico se inoculan directamente en el hígado. Las cepas patógenas presentan diferente grado de virulencia. En general, las amibas virulentas fagocitan más eritrocitos que las cepas no virulentas (Chayen y Avron, 1985; Guerrant, 1986). Asimismo se han reportado diferencias en la superficie de la membrana de las mencionadas cepas en los residuos de glucosa y de manosa (Martínez Palomo y col., 1973; Chayen y Avron, 1985; Gitler y Mirelman, 1986). La cantidad de enzimas proteolíticas que produce E. histolytica, se ha relacionado con la virulencia de varias cepas patógenas al estudiar su efecto sobre el crecimiento de fibroblastos *in vitro* (Bos, 1979; Gadasi y Kobiler, 1983; Pérez-Montfort y col., 1987).

Se han descrito dos mecanismos por medio de los cuales E. histolytica ejerce su actividad citotóxica: Uno de ellos involucra la citólisis por contacto entre la amiba y la célula blanco; esta unión se lleva a cabo por medio

de la adhesina (lectina inhibible por Gal/GalNAc), presente en la superficie del parásito (Ravdin, 1986). Este contacto permite un flujo intracelular de calcio a la amiba, que a su vez induce la liberación de varias proteínas al sitio de contacto, entre ellas la responsable de la formación del ameboporo, que junto con las toxinas amibianas secretadas producen el daño celular en la célula blanco y su desprendimiento (Gitler y Mirelman, 1986; Ravdin, 1987). La lisis amibiana sobre las células inflamatorias del huésped (neutrófilos) liberan enzimas que también causan toxicidad en el tejido (Guerrant, 1986).

El otro mecanismo de citotoxicidad es ocasionado por la liberación de compuestos solubles activos que participan en la penetración del parásito en el tejido del huésped, principalmente enzimas proteolíticas que atacan tanto a las células como a la matriz extracelular del huésped (Keene y col., 1986).

Los extractos y lisados de *E. histolytica* cultivada axenicamente muestran una gran variabilidad en la actividad proteolítica hacia diferentes sustratos (Pérez Montfort y col., 1987). La más importante de estas enzimas es la proteinasa de cisteína (tiol) que es capaz de degradar proteínas de anclaje como fibronectina y la laminina, así como la colágena (Keene y col., 1986).

También se presenta una clase de proteinasa de serina y otra asociada a la membrana de la amiba, la metalocolagenasa; sin embargo, esta última no es soluble y requiere de contacto.

Se puede abatir la actividad de las diferentes clases de proteinasas presentes en el extracto de amibas si se adicionan concentraciones definidas de inhibidores específicos para cada una de ellas. Así, N-etil maleimida (NEM), iodoAcetato (IA), acetato de fenilmercurio (AFM), y p-hidroximercurio benzoato (PHMB) bloquean la actividad de las proteasas de cisteína, mientras que el fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y el inhibidor de tripsina de la soya inactivan a las proteasas, (Avila y col., 1985; Keene y col., 1986 y Pérez-Montfort y col., 1987). De la misma manera se puede inhibir la citotoxicidad de las enzimas proteolíticas por medio de IgG inmune (Bos, 1979; Bos y col., 1980) y por factores presentes en suero inmune y no-inmune de un peso molecular de 50 a 100 kDa (Bos y col., 1980; McGowan y col., 1982), como la fetuina, la  $\alpha$ 2-macroglobulina y la  $\alpha$ 1-antitripsina (McGowan y col., 1982; Pérez-Montfort y col., 1987). La inhibición de la actividad enzimática requiere del contacto entre las proteínas y la membrana del parásito (Bos y col., 1980); esta última presenta una alta afinidad para las proteínas

sericas, incluyendo las gammaglobulinas.

Estas proteasas juegan un papel importante en la proteólisis que se presenta durante el fraccionamiento y purificación de los compuestos amibianos, la digestión de proteínas, los procesos de regulación y la inducción del efecto citopatogénico (Gitler y Mirelman, 1986). A pesar de que su actividad se lleva a cabo en un amplio rango de pH (3 a 10) (Avila y col., 1985), la óptima se encuentra a pH 5.5 (pH de lisosomas secundarios) y entre 6.5 a 7.0 (pH imperante en el citoplasma y el medio que rodea a la amiba) (McGowan y col., 1982; Avila y col., 1985).

Se han caracterizado varios aspectos de la membrana de superficie de *E. histolytica*. Por microscopía electrónica se ha identificado la presencia de carbohidratos en el glicocalix que recubre la membrana del parásito (Martínez Palomo y col., 1973; Gitler y Mirelman, 1986). Aley y colaboradores (1980), utilizando Con A pudieron unirla a la membrana de la amiba y aislar fracciones puras de la membrana. Recobraron 18 péptidos, varios de los cuales se unen a Con A.

Parkhouse y colaboradores (1978) identificaron varias glicoproteínas (20, 30 y 150 kDa) que eran

inmunoprecipitadas por suero inmune y Matheus y colaboradores (1986) confirmaron la presencia de dichas glicoproteínas serológicamente activas en la superficie y en las membranas internas del parásito.

El objetivo de este trabajo fue:

- 1.-Buscar un método que proteja al antígeno amibiano del efecto degradativo de las enzimas proteolíticas que contiene, y que a la vez pueda permitir el uso del mismo con fines de inmunoprolaxis.
- 2.-Comparar las características inmunológicas de los antígenos estabilizado (protegido de la degradación) y degradado con el antígeno control recién preparado.
- 3.-Estudiar la participación de los carbohidratos presentes en el antígeno amibiano en la respuesta inmune humoral.

## MATERIAL Y METODOS

**ANIMALES.** Se usaron hamsters dorados (Mesocricetus auratus) hembras y ratones de la cepa BALB/c hembras, ambos de 4 semanas de edad.

**TROFOZOITOS DE E. HISTOLYTICA** DE LA CEPA HMI. Cultivos axénicos de trofozoitos en fase log de crecimiento, mantenidos en medio TY-1 (Diamond y col., 1978), se lavaron dos veces en amortiguador de fosfatos, 0.15M pH 7.4 (PBS) estéril para los ensayos de inmunoprolifaxis.

**ANTIGENOS DE E. HISTOLYTICA.** Antígenos control recién preparado (AgTtO): Este antígeno fue proporcionado por el Dr. Enders, Behringwerke, Marburg, FRG; y se preparó a partir de cultivos de trofozoitos HMI de 72 h mantenidos en medio TY-1, (Diamond y col., 1970), que se lavaron tres veces con PBS, pH 7.4, posteriormente se liofilizaron y se hidrataron en el momento de ser utilizado.

**Antígenos deslipidizados:** Se obtuvo del AgTtO por extracción de los lípidos con éter etílico en un aparato de Soxhlet a 37°C por 24 h (Oliva y col., 1986).

**Antígenos Estabilizados (AgE):** Se resuspendió el AgTtO en un amortiguador de Glicina-HCl, pH 2, (0.1M Glicina y 0.1M HCl) por 30 minutos a 37°C, posteriormente se neutralizó por la adición de 0.1N NaOH (Bos y col., 1980)

Antígenos Degradados (AgD): El AgTtO se resuspendió en PBS para ser incubado a 37°C por toda la noche.

Antígenos Enriquecidos en Carbohidratos: Se preparó de acuerdo al método descrito por Zamora y col. (1962) con algunas modificaciones. Se resuspendió el antígeno deslipidizado en 0.01M Tris-hidroximetil aminometano pH 7.4 y se centrifugó dos veces a 3020xg por 30 minutos; el sobrenadante se precipitó con 10 volúmenes de metanol a 4°C por toda la noche. El precipitado se resuspendió en PBS, se dializó contra agua corriente por 72 h, se precipitó nuevamente con 10 volúmenes de metanol y se secó al vacío. Para purificar glicoproteínas se adicionó 10% TCA por 30 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en ácido acético 0.1M. Para eliminar el TCA se dializó contra ácido acético 0.1M. Las glicoproteínas fueron tratadas con 1% de pepsina por 24 h en agitación a 4°C. Posteriormente se eliminó la enzima y los restos de péptidos con 10% TCA y se dializó contra agua destilada. Al sobrenadante se le determinó la concentración de carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico y se verificó la ausencia de proteínas por espectrofotometría a 260 nm.

**SUEROS DE RATON INMUNES ANTI-E.HISTOLYTICA.** Se inmunizaron 10 ratones por grupo, con 1 mg de AgTtO, AgE

o AgD en 0.1 ml de PBS estéril, por vía intraperitoneal. Se inyectaron una vez a la semana por tres semanas y a la cuarta se sangraron a blanco; el suero se recuperó de la muestra colectada por centrifugación.

TITULO DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES. Se determinó por hemaglutinación de eritrocitos de carnero al 1 % previamente sensibilizados con el AgTto por medio de glutaraldehído (Larralde y col., 1986).

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION. A las placas de hemaglutinación con fondo en V se les adicionó 25 µl de suero inmune a las concentraciones de 1, 2 y 4 unidades de Hemaglutinación (UHA) y de 25 µl del antígeno inhibidor en estudio. La placa se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente se adicionaron 50 µl de eritrocitos de carnero al 1 % sensibilizados con AgTto.

INHIBICION DE LA REACCION DE ELISA. Cada pozo de la placa de poliestireno se sensibilizó con 20 µg de AgTto en 50 µl de amortiguador de carbonatos, pH 9.6 y las placas se secaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se hidrataron con PBS que contenía Tween 20 al 0.05 % (PBS-Tw) y BSA al 0.05%, y el exceso de proteína no adherida se lavó con PBS-Tw tres veces por tres minutos cada una. Los anticuerpos usados fueron un anticuerpo monoclonal específico anti-E. histolytica (Ortiz-Ortiz y



col., 1986) y sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano (AHA). Los sueros se diluyeron 1:1000 en PBS y se incubaron con 1, 5 y 10  $\mu$ g de AgTtO o del antígeno enriquecido en carbohidratos y se incubaron a 37°C. Los sueros así tratados se añadieron en volúmenes de 100  $\mu$ l a cada pozo por una hora a 37°C; después se lavaron tres veces con PBS-Tw y se procedió a añadir el segundo anticuerpo peroxidado (anti-IgG, IgM e IgA anti-ratón peroxidado de chivo) (CAPPEL), las placas se incubaron por 90 minutos a 37°C y 30 minutos adicionales a temperatura ambiental. La placa se lavó nuevamente y se reveló con 50  $\mu$ l del sustrato (10 mg o-fenilendiamina y 4  $\mu$ l de  $H_2O_2$  en 10 ml de 0.1M amortiguador de citratos, pH 4.5). La reacción se detuvo con 200  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  2.5M y las placas se leyeron a 495 nm en un Elisómetro (Dynatech Laboratories Inc.)

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA. La proteólisis se determinó midiendo la absorbancia del color liberado por el sustrato susceptible Azocoll (Calbiochem) después de incubarlo con cada uno de los antígenos en estudio. Se utilizó 1 mg de antígeno con 10 mg del Azocoll en 1 ml de PBS. Durante el estudio de cinética la incubación varió de 30 a 120 minutos. Una vez determinado el tiempo óptimo que fue de 2 h a 37°C se usó en el resto de los experimentos.

Los inhibidores de proteasas utilizados fueron: N-etilmaleimida (NEM), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y p-hidroximercuriobenzoato (PHMB) a la concentración de 2 mM. La reacción se detuvo por adición de TCA 0.3M y el sobrenadante se leyó a 520 nm.

**ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS:** Las proteínas amibianas se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% por el método descrito por Laemmli, (1970). El amortiguador en el que se disolvió la muestra contenía urea, 10mM; ditiotreitól, 80mM; SDS, 10 %;  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% y azul de bromofenol. Las muestras se hirvieron por 5 minutos. Los geles se tiñieron con una mezcla de azul de Coomassie brillante, al 0.25 %; metanol al 40 % y ácido acético al 10 % . Los geles se sometieron a densitometría (Espectrofotometro Beckman DU-7) para comparar los perfiles de las proteínas amibianas.

**INMUNOTRANSFERENCIAS:** Las proteínas de los AgTto, AgD y AgE separadas por electroforesis se transfirieron a papel de nitrocelulosa en una cámara de transferencia a 2A por 50 minutos. Los sitios libres del papel se bloquearon por incubación con BSA al 3 % en PBS que contenía 0.3 % de Tween 20 (PBS-T), durante 18 h a 4°C. Para el reconocimiento de las proteínas amibianas por el suero inmune anti-Entamoeba histolytica, el papel

de nitrocelulosa bloqueado, se lavó con PBS-T tres veces durante 15 minutos y se utilizó como primer anticuerpo un suero inmune de ratón diluido 1:1000, el cual se incubó con el papel toda la noche a 4°C en agitación. Después de lavar tres veces con PBS-T se adicionó el segundo anticuerpo; para ello se utilizó un anticuerpo en contra de IgG, IgM e IgA de ratón peroxidado (1:1000) (ZYMED) que se incubó por tres horas a 37°C. Se lavó con PBS-T cuatro veces y la última vez con PBS. La actividad enzimática se desarrolló con un sustrato de o-cloronaftol (30 mg) disuelto en 10 ml de metanol, 50 ml de PBS y 50 ul de  $H_2O_2$ .

TINCIÓN DE GLICOPROTEINAS RECONOCIDAS POR CON A. El papel de nitrocelulosa ya bloqueado se lavó dos veces con PBS.

( $Na_2HPO_4$ , 6.46 mM;  $KH_2PO_4$ , 1.47mM; NaCl, 136 mM; KCl, 2.7mM;  $CaCl_2$ , 0.68mM;  $MgCl_2$ , 0.49mM pH 7.4) por 15 minutos cada vez. Posteriormente se incubó por una hora a temperatura ambiente en agitación con 0.1 mg de Con A acoplada a peroxidasa (SIGMA) disuelta en PBS; nuevamente se lavó dos veces con PBS por media hora cada vez y se equilibró por 10 minutos con amortiguador de fosfatos 0.01M, pH 7. El sustrato fue el mismo que el descrito para el suero inmune pero en lugar del PBS se adicionó el amortiguador de fosfatos (Schott y col., 1984).

INMUNOPLOT. Es un método de análisis de inmunotransferencia que permite detectar los antígenos relevantes para inmunodiagnóstico o estudio del total de bandas desarrolladas. Para este trabajo se graficaron las bandas del AgTto que reconoce el suero policlonal anti-E. histolytica contra las bandas de AgE y AgD; las glicoproteínas reconocidas por Con A de los tres antígenos. También se compararon las glicoproteínas contra las bandas reconocidas por el suero policlonal (Larralde y col., 1988).

ENSAYOS DE INMUNOPROFILAXIS: Se inmunizaron hamsters de 4 semanas de edad vía subcutánea con 1 mg del antígeno disuelto en 0.2 ml de PBS estéril, una vez a la semana por tres semanas, a la séptima semana de vida, se realizó una laparotomía para inocular 375,000, 750,000 y 1 500,000 trofozoitos de E. histolytica de la cepa HMI. Diez días después del desafío, los animales se sacrificaron. El hígado y el absceso amibiano presente se pesaron para determinar el porcentaje de daño tisular.

$$\text{Peso del absceso amibiano} / \text{Peso del hígado} \times 100 \text{ es el porcentaje de absceso.}$$

## RESULTADOS

Cinética de la actividad proteolítica del antígeno amibiano. Con el propósito de estudiar la dinámica de la actividad enzimática de los diferentes antígenos amibianos de E. histolytica, se midió su efecto sobre un sustrato de colagenasa denominado Azocoll. La degradación enzimática se midió a diferentes tiempos de incubación. En este estudio se investigó la actividad enzimática del AgTto sobre el sustrato correspondiente. Como control se incluyó un antígeno amibiano sin la actividad enzimática, que se inhibió por la adición de suero normal humano al 2 % (Bos, 1979; Gadasí y Kobiler, 1983).

La Figura 1 muestra la actividad enzimática del antígeno amibiano, la cual aumenta proporcionalmente con el tiempo. Por otra parte, el control negativo enriquecido con suero normal humano presenta escasa actividad.

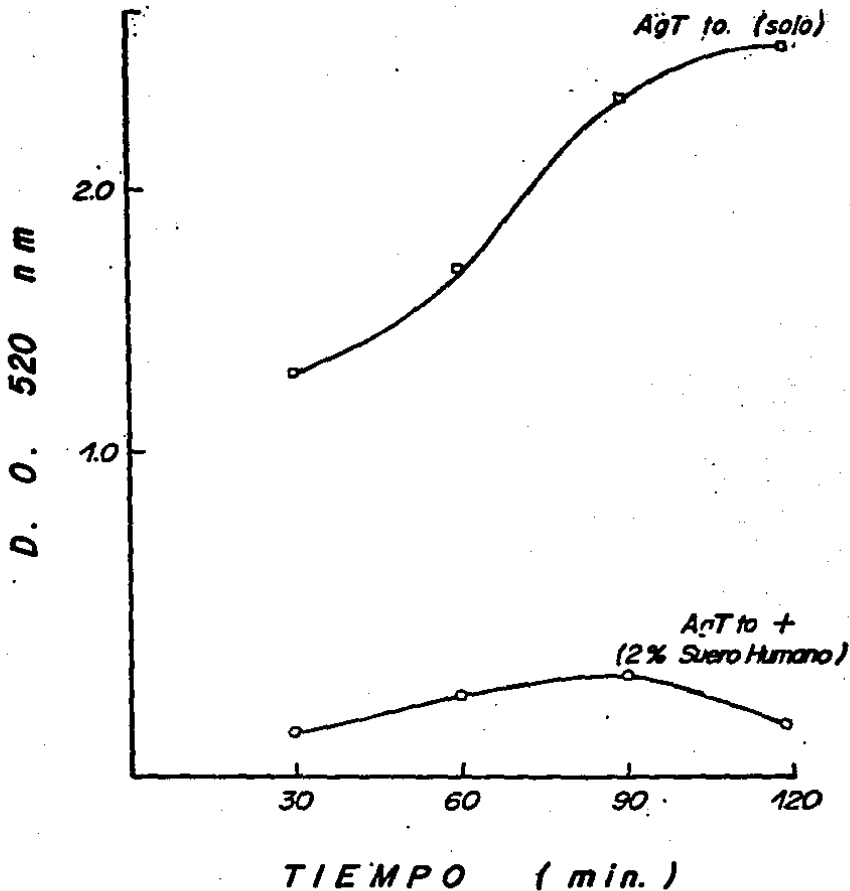


Figura 1: Cinética de la actividad proteolítica del antígeno amibiano. Se realizó una cinética de actividad proteolítica utilizando como sustrato de las enzimas amibianas al Azocoll. Se dejó incubar por 30, 60, 90 y 120 minutos y se determinó la actividad por espectrofotometría a 520 nm. El control negativo consistió de un antígeno amibiano total adicionado con suero normal humano al 2%.

Determinación de la actividad proteolítica en los antígenos amebianos. Los estudios anteriores demuestran que el antígeno de E.histolytica presenta una gran actividad enzimática desde que se reconstituye y que esto ocasiona su degradación con la pérdida de proteínas de alto peso molecular. Con el propósito de abolir esta degradación sin la utilización de inhibidores de proteasas, que tienen actividad tóxica y no pueden ser usados en agentes potencialmente inmunoprolifácticos, se estudió una alternativa consistente en un choque ácido a pH 2 durante 30 minutos, seguidos de la neutralización a pH 7. Con el objeto de determinar si el antígeno así estabilizado no presentaba actividad proteolítica se utilizó nuevamente la prueba de Azocoll. La actividad de este antígeno se comparó con la del AgTto, AgD y la del AgTto que contenía suero normal humano al 2 %. Como podemos ver en la Tabla 1, el AgE no presentó actividad proteolítica y su lectura a 520 nm fue igual o menor a la que mostró el antígeno control enriquecido con el suero normal. Por otra parte, el AgTto muestra gran actividad enzimática y el AgD todavía exhibe actividad proteolítica, aunque menor que la del AgTto.

Se comparó también la capacidad de inhibir la actividad enzimática del antígeno amebiano estabilizado

por choque ácido y del antígeno ambiental adicionado con diferentes inhibidores de proteasas. Los resultados de la Tabla 2 muestran que el choque ácido es el método más efectivo para inhibir la actividad enzimática. De los inhibidores químicos estudiados, el PHMB mostró la mayor capacidad de abatir la actividad enzimática. Tanto el PMSF y el NEM fueron incapaces de inhibir la actividad y sólo combinados lograron reducirla.



TABLA 1

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN ANTIGENOS AMIBIANOS.

T R A T A M I E N T O

Antígeno estudiado	Estabilizado	Adicionado con SNH*	Degradado	Ninguno
AgTto	0.16	0.21	2.45	3.34
Ag. deslipidizado	0.15	0.22	NSD**	2.66

Se incubo 1 mg de antígeno con 10 mg de Azocoll a 37°C por 2 h, posteriormente se determinó la actividad proteolítica en un espectrofotómetro a 520 nm.

\* suero normal humano al 2 %.

\*\* No se determinó.

TABLA 2

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL ANTIGENO AMIBIANO EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS Y ESTABILIZADO POR CHOQUE ACIDO.

Antígeno amibiano Total	DO a 520 nm
solo	3.0
AgE	0.09
+ PMSF	2.75
+ NEM	1.09
+ PHMB	0.11
+ PMSF + NEM	0.77
+ PMSF + PHMB	0.16
+ NEM + PHMB	0.11
+ PMSF + NEM + PHMB	0.11

1 mg de antígeno se incubó por 2 horas a 37°C en presencia del sustrato Azocoll. La reacción se terminó por adición de TCA 0.3M. La actividad proteolítica se determinó por espectrofotometría. Los inhibidores se adicionaron a la concentración de 2mM.

Análisis electroforético comparativo de los antígenos amibianos. Con el objeto de determinar si el antígeno estabilizado por choque ácido no sufría cambios en el tamaño de sus proteínas se realizó un análisis electroforético. La Figura 2 muestra que el AgE (carril C) presenta esencialmente el mismo patrón que el AgTto (carril A). Opuestamente, el antígeno que se ha degradado por incubación a 37°C durante 24 h exhibe un patrón diferente, donde es evidente la ausencia de varias proteínas de peso molecular cercano a 94, 67 y 35 kDa, así como la persistencia de otras menores de 43 kDa. Cuando el gel se sometió a densitometría se confirmaron los hallazgos anteriores. En la Figura 3 se comparan los tres antígenos y se corrobora la ausencia de unas y presencia de otras bandas en el AgD (gráfica B); por otra parte, el AgE (gráfica C) muestra un perfil similar al del AgTto (gráfica A). Las pequeñas diferencias en las curvas se deben a las concentraciones de los antígenos que se utilizaron en el gel.

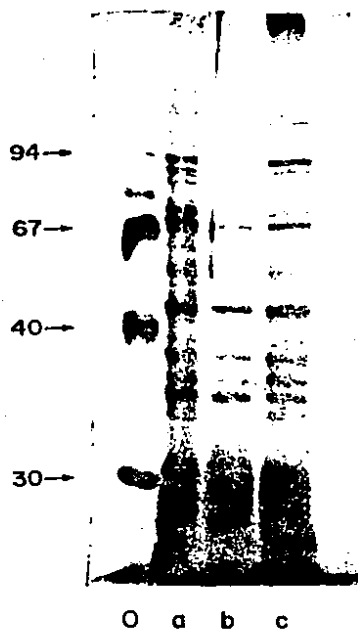


Figura 2: Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas ambientales se sometieron a electroforesis como se especifica en Material y Metodos. Marcadores de Pesos Moleculares, Carril 0; AgTo, carril A; AgD, carril B, y AgE, carril C.

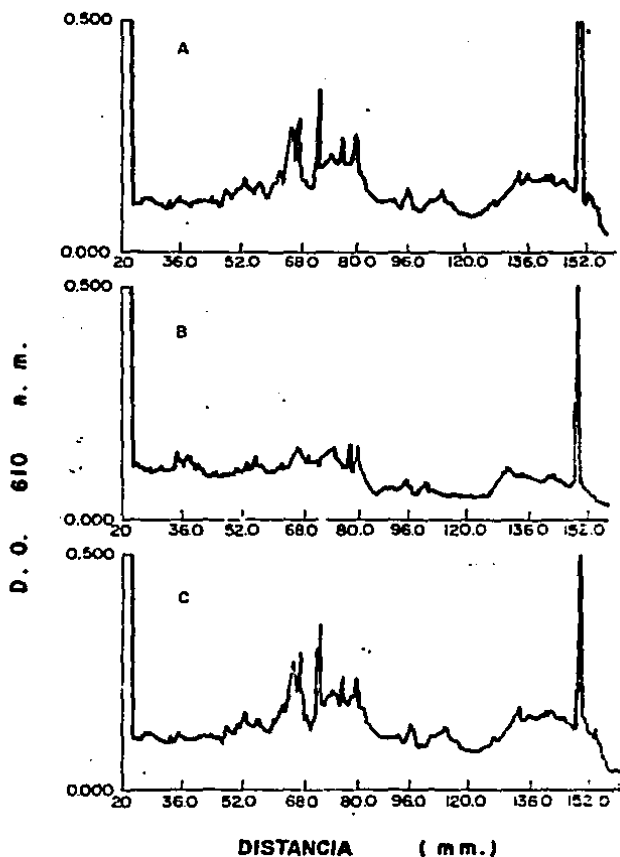


Figura 3: Densitometría. Se analizaron los perfiles densitométricos de las bandas de proteínas amibianas separadas por electroforesis. AgTto, Perfil A; AgD, Perfil B, y AgE, Perfil C.

Inmunotransferencia. Con el objeto de determinar similitudes o diferencias en el reconocimiento de las proteínas amebianas por un suero policlonal anti-E. histolytica y los diferentes antígenos aquí reportados, se realizaron estudios de inmunotransferencia. En la Figura 4 se observa que un suero policlonal anti- E. histolytica reconoce de manera diferente al AgD (Fig. 4, carril B) cuando se comparan con el AgTto (carril A) y el AgE (carril C). Sin embargo, todos ellos comparten varias bandas de proteínas que, como ya mencionamos anteriormente, se mantienen a pesar de la degradación (Fig. 2). Por otra parte, el AgE no parece haber sufrido cambios radicales en su estructura, ya que presentan el mismo patrón de bandas de reconocimiento que el AgTto (Fig. 4, carriles A y C).

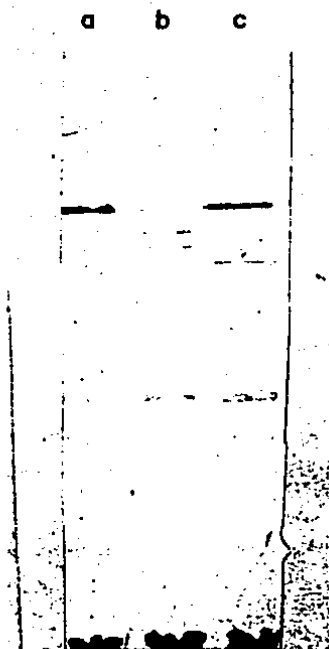


Figura 4. Inmunotransferencia. Las proteínas ambientales separadas por electroforesis se transfirieron al papel de nitrocelulosa y se revelaron con suero policlonal anti-E. histolytica como primer anticuerpo y anti-IgG, IgM e IgA anti-ratón peroxidado como segundo anticuerpo. AgTto, carril A; AgD, carril B, y AgE, carril C.

Título de anticuerpos hemaglutinantes. Se realizaron experimentos para determinar la inmunogenicidad de los diferentes antígenos en estudio. Con este propósito se inmunizaron ratones BALB/c hembras con tres inoculaciones del antígeno respectivo y se determinaron los niveles de anticuerpos por medio de hemaglutinación indirecta.

Los resultados obtenidos indican que el AgE es más inmunogénico que las otras preparaciones (Tabla 3), ya que el título más bajo inducido por este antígeno corresponde al mayor obtenido con el AgTto. La inmunogenicidad del AgTto fue parecida a la del AgD y la diferencia observada en el título fue sólo de una dilución en favor del primero.



TABLA 3  
TITULO DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES

Antígeno Amibiano	No. Animales	Título (recíproca)
AgTto	8	160 (80 - 640)
AgD	8	160 (40 - 320)
AgE	9	1280 (640-5120)

Cada ratón recibió 3 inmunizaciones de 1 mg por vía intraperitoneal. Los animales se sangraron a blanco a la cuarta semana y se determinaron en los sueros los títulos de anticuerpos hemaglutinantes utilizando eritrocitos sensibilizados en el antígeno amibiano.

Inhibición de la hemaglutinación con diferentes preparaciones de antígeno. Ante la posibilidad de que los AgD y AgE hubiesen sufrido modificaciones conformacionales que impidieran su reconocimiento por anticuerpos policlonales anti- E. histolytica, se realizaron estudios de inhibición de la hemaglutinación, donde se permitió al suero incubarse con los diferentes antígenos antes de añadir los eritrocitos sensibilizados con el antígeno ambiano. Los resultados de la Tabla 4 nos muestran que el AgD inhibe la hemaglutinación de 2 UHA con 2.5ug, mientras que el AgTto requiere de únicamente de 1.25ug. Cuando comparamos los antígenos AgE y AgTto observamos que ambos requieren de la misma cantidad para inhibir la hemaglutinación de un número determinado de unidades (Tabla 4).

TABLA 4

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION CON DIFERENTES PREPARACIONES DE ANTIGENO.

Antigeno Amibiano	cantidad de inhibidor (µg)	U H A		
		1	2	4
AgTto	5.0	+	+	+
	2.5	+	+	+
	1.25	+	+	-
AgD	5.0	+	+	+
	2.5	+	+	-
	1.25	+	-	-
AgE	5.0	+	+	+
	2.5	+	+	+
	1.25	+	-	-

Las diferentes preparaciones de antígeno amibiano fueron incubadas con 1, 2 y 4 UHA presentes en el suero policlonal de ratón anti- E. histolytica a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se añadieron los eritrocitos sensibilizados con antígeno amibiano.

+ Inhibición de la hemaglutinación  
 - Hemaglutinación

Persistencia de los carbohidratos presentes en el AgD. La serie de resultados presentados hasta el momento sugieren que aún en el AgD se mantienen determinantes antigénicos casi por completo (Tabla 4). Se consideró a los carbohidratos y en particular a las glicoproteínas como las moléculas estables. Con el propósito de profundizar en este sentido, se realizaron estudios de los antígenos por inmunotransferencia de los geles obtenidos por electroforesis y revelados con una lectina afin a estos carbohidratos; la lectina usada fue la Con A acoplada a peroxidasa. En la Figura 5 observamos que el patrón de bandas que reconoce la Con A-peroxidasa se mantiene igual en los tres antígenos, a pesar de que como ya mencionamos anteriormente, se presentaron diferencias cuando el estudio se limitó a proteínas (Fig. 2).

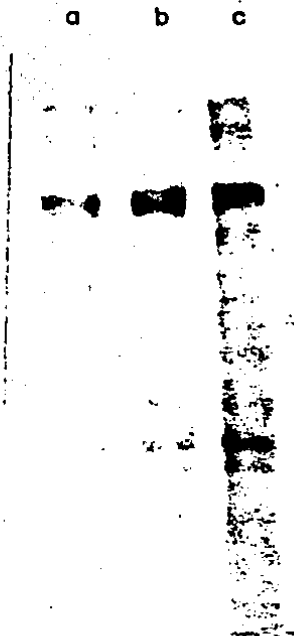


Figura 5. Persistencia de los carbohidratos presentes en los antígenos amibianos. Al gel de la Fig. 2 se le realizó una transferencia que se bloqueó con BSA-PBS-T. Se reveló con Con A-peroxidasa y se usó como sustrato o-cloronaftol. Ag1to, carril A; AgD, carril B, y AgE, carril C.

Inmunoplot. La variedad de bandas reconocidas por el suero policlonal anti- E. histolytica, como las glicoproteínas sensibles a Con A que presentan los tres antígenos estudiados, fueron analizadas por el método de Inmunoplot, que nos permite comparar las características de los antígenos por medio de una gráfica. De esta manera, las gráficas a y b de la Fig. 6 comparan las bandas que reconoce el suero policlonal anti-E. histolytica en los antígenos. Se observa que el AgTto y el AgE presentan los mismos puntos (gráfica a); mientras que el AgD (gráfica b) presenta dos bandas que no comparte con el AgTto; así mismo hay 8 bandas en el AgTto no presentes en el AgD por lo tanto son únicamente 6 bandas las compatibles por estos dos antígenos.

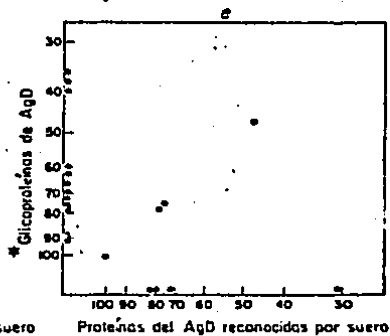
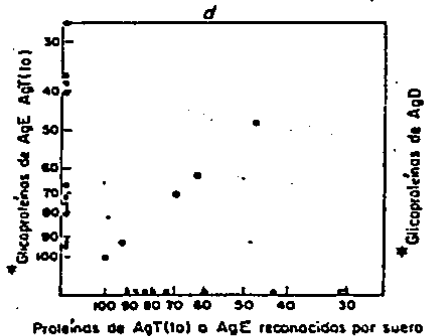
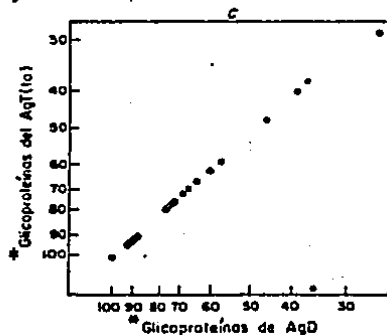
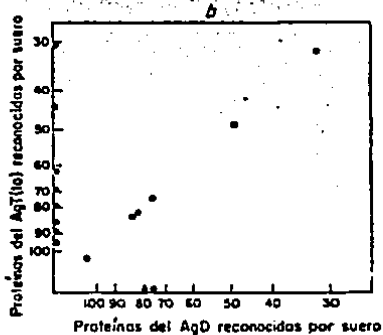
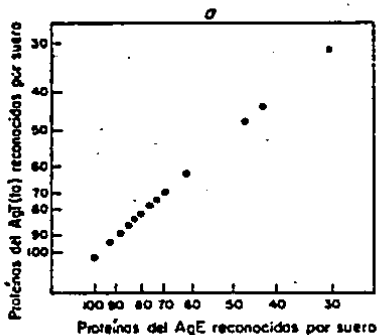
En cuanto al análisis de las glicoproteínas presentes en los antígenos y reconocidas por Con A, con excepción de la glicoproteína de 35 kDa en el AgD, todas las demás son compartidas por los tres antígenos.

Al relacionar las glicoproteínas que son reconocidas por el suero policlonal anti- E. histolytica se observa que 5 proteínas comunes a los AgTto y AgE comparten dos características (gráfica d) mientras que la mayoría de las otras proteínas sólo comparten una.

De forma similar se comporta el AgD que presenta 4 proteínas en común a las dos características estudiadas.

Es interesante mencionar que existen 2 glicoproteínas presentes en los tres antígenos que también son reconocidas por el suero policlonal anti-E. histolytica (100 y 50 kDa.)

P E S C M O L E C U L A R



P E S O M O L E C U L A R



Figura 6. Inmunoplot. Gráfica a: Comparación entre las proteínas del AgTto y las del AgE reconocidas por suero policlonal anti- E. histolytica, (ver Fig. 2); gráfica b: Comparación entre las proteínas del AgTto y las del AgD reconocidas por suero policlonal anti- E. histolytica (ver Fig. 2); gráfica c: Comparación de glicoproteínas reconocidas por Con A del AgTto y AgE con las del AgD (ver Fig. 5); gráfica d: Relación de glicoproteínas reconocidas por Con A del AgTto y AgE (ver Fig. 5) con las proteínas de estos antígenos reconocidas por suero policlonal anti- E. histolytica (ver Fig. 2); gráfica e: Comparación de las glicoproteínas reconocidas por Con A del AgD (ver Fig. 5) con las proteínas reconocidas por suero policlonal anti- E. histolytica.

Inhibición de la hemaglutinación con el antígeno amibiano total y el enriquecido en carbohidratos. Debido a la observación de que en el AgD las glicoproteínas se mantenían sin modificación, se procedió a purificar la fracción de carbohidrato del antígeno amibiano (antígeno enriquecido en carbohidratos), y a determinar su capacidad de inhibir la hemaglutinación de eritrocitos sensibilizados con el antígeno amibiano. En la Tabla 5 podemos apreciar que el antígeno enriquecido en carbohidratos inhibió 2 UHA con 2.5 $\mu$ g, mientras que el AgTto lo hizo con una concentración de 1.25 $\mu$ g.

TABLA 5

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION CON EL AgTto  
Y EL ENRIQUECIDO EN CARBOHIDRATOS.

Antigeno Amibiano	cantidad de inhibidor (µg )	U H'A		
		1	2	4
AgTto	5.0	+	+	+
	2.5	+	+	+
	1.25	-	+	-
Enriquecido en carbohidratos	5.0	+	+	+
	2.5	+	+	+
	1.25	-	-	-

Diferentes preparaciones de los antigenos se incubaron 30 minutos a 37°C con 1, 2 y 4 UHA presentes en suero policlonal de ratón anti- E. histolytica. Posteriormente se añadieron 100 µl de eritrocitos sensibilizados con antígeno amibiano.

- + Inhibición de la hemaglutinación
- Hemaglutinación.

Inhibición de la reacción de ELISA con el antígeno enriquecido en carbohidratos. Al considerar la posibilidad de que los determinantes antigénicos en este antígeno ambiente estuviesen constituidos exclusivamente por carbohidratos, se estudió si el antígeno enriquecido en carbohidratos podía reaccionar con anticuerpos anti-E. histolytica e inhibir así su reactividad como un AgTto. Los ensayos se realizaron por medio de ELISA con anticuerpos monoclonales y policlonales. En la Tabla 6 se observa que 10 µg de AgTto inhibe hasta 50% del reconocimiento del anticuerpo monoclonal por el AgTto.. La misma concentración del antígeno enriquecido en carbohidratos sólo inhibe 16 a 20% y requiere de concentraciones mayores (50 µg) para inhibir el 50%. Resultados similares se observan cuando se usan anticuerpos policlonales anti-E. histolytica. El AgTto inhibe casi al 50 % con 10 µg, mientras que la misma cantidad del antígeno enriquecido en carbohidratos sólo inhibe del 21 al 24% (Tabla 7).

TABLA 6

INHIBICION DE LA REACCION DE ELISA CON EL ANTIGENO ENRIQUECIDO EN CARBOHIDRATOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-E. HISTOLYTICA

Antigeno anibiano	cantidad de inhibidor(ug)	% de inhibicion	
		Anticuerpo 1:500	diluido 1:1000
AgT to	10	50	53
Enriquecido en carbohidratos	10	16	20

Los anticuerpos monoclonales se incubaron con diferentes concentraciones del inhibidor antes de adicionarse al antigeno pegado a la placa de ELISA, posteriormente se reveló al anticuerpo presente con anti-IgM peroxidado y o-cloronaftol como sustrato. Se determinó la actividad por espectrofotometria a 490 nm.

TABLA 7 .

INHIBICION DE LA REACCION DE ELISA CON UN ANTIGENO ENRIQUECIDO EN CARBOHIDRATOS Y ANTICUERPOS POLICLONAL ANTI-E. HISTOLYTICA

Antigeno Amibiano	cantidad de inhibidor(ug)	% de inhibición	
		Sueros anti- <u>E. histolytica</u> 1	2
AgTto	10	46.6	50.2
Enriquecido en carbohidratos	10	24.5	21,6

Los sueros policlonales (1 y 2) anti- E.histolytica se incubaron con los inhibidores durante 1 h a 37°C y se añadieron a la placa de ELISA, posteriormente se reveló con anti-IgG, IgM e IgA peroxidado y como sustrato al o-cloronaftol. La reacción se leyó por espectrofotometría a 490 nm.

Inmunoprofilaxis. Con el objeto de determinar la relevancia que pudiera tener un antígeno estable como agente preventivo de amibiasis invasora, se procedió a inmunizar hamsters con las diferentes preparaciones de antígeno amibiano (5 animales por lote) y a desafiarlos posteriormente por vía intrahepática para determinar el grado de protección. En la Figura 7 se observa que los animales inmunizados con las diferentes preparaciones son protegidos contra el desafío amibiano en contraste con el grupo control no inmunizado. Esta diferencia es claramente evidente cuando el desafío se realizó con  $1.500,000$  trofozoitos de E. histolytica, ya que los grupos inmunizados muestran de un 72.9 a un 80.4% de protección.

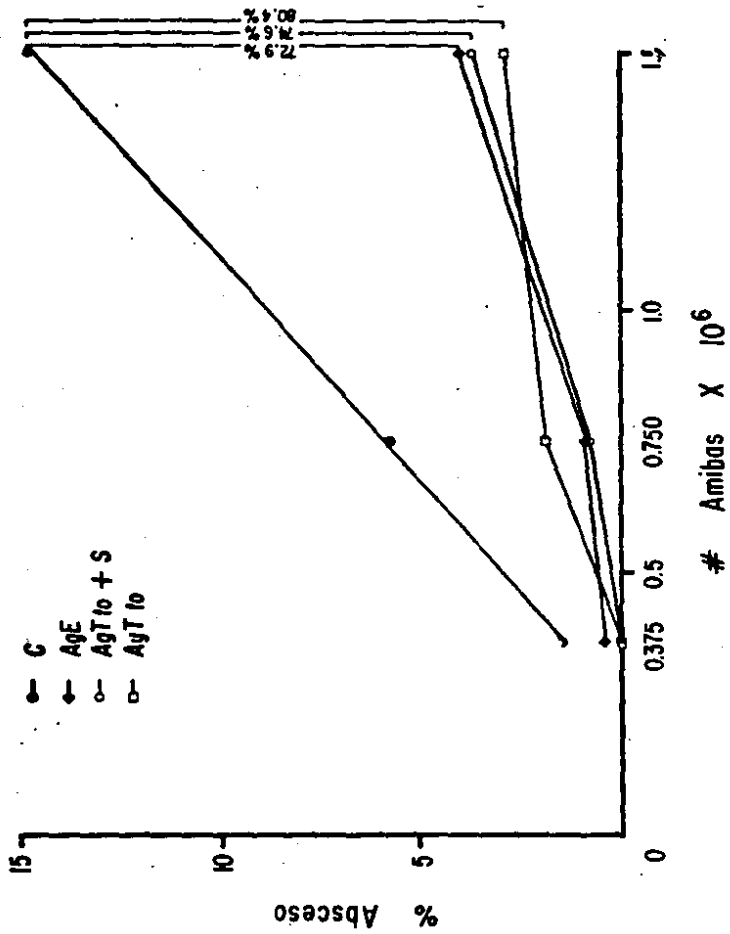


Figura 7. Inmunoprolifaxis. Se inmunizaron hamsters por via intramuscular, semanalmente por tres ocasiones con los diferentes antigenos en estudio. A la cuarta semana se realizo el desafio con 375,000, 750,000 y 1 500,000 trofozoitos de *E. histolytica*. A los 8 dias se sacrificaron y se determino el porciento de tejido hepatico dañado.



## DISCUSION

Se han descrito dos formas por medio de las cuales Es. histolytica efectúa su actividad citotóxica, una de ellas se induce mediante el contacto de la ameba con la célula blanco a través de factores citotóxicos que se introducen en la célula por el canal iónico y la otra, por medio de sustancias solubles, como son las enzimas proteolíticas que libera el trofozoito y que afectan a distancia a la célula y a la matriz extracelular (Bos y col., 1980; McGowan y col., 1982; Gadasi y Kobiler, 1983; Keene y col., 1986).

Gadasi y colaboradores (1983) compararon la actividad enzimática de dos cepas patógenas y encontraron que el grado de virulencia es definido por las variaciones en el contenido de enzimas proteolíticas. El estudio se realizó con las cepas HM1 y HK9, a las cuales se les determinó su actividad proteolítica midiendo la degradación de un sustrato proteico (Azocoll) y el efecto sobre una capa de fibroblastos.

Las enzimas proteolíticas se activan casi instantáneamente con la lisis celular de la ameba, (Parkhouse y col., 1978) o bien, cuando se hidrata el

antígeno liofilizado como lo observamos en nuestros estudios y donde es evidente desde los 30 minutos de incubación y progresa a medida que aumenta el tiempo de de la misma (Fig. 1).

La actividad proteolítica que presenta el antígeno es capaz de actuar sobre sus propias proteínas influyendo de esta manera en su estabilidad. Este proceso se inicia con la degradación de proteínas de alto peso molecular (Fig. 2, carriles A y B), que modifican su estructura proteica original.

Estudios recientes (Keene y col., 1986; Scholze y col., 1986; Schulte y col., 1987; Pérez-Montfort y col., 1987) indican que en la amiba, la clase principal de proteasas pertenece al grupo de las proteasas de cisteína, ya que su actividad se reduce en un 80-90% con el uso de inhibidores específicos para este grupo de enzimas (PHMB, NEM e IA, Tabla 2). El porcentaje de actividad restante parece deberse a otros grupos de proteasas, como el dirigido a la serina y a la metalo-colagenasa asociada a la membrana del parásito (Keene y col., 1986). Para anular este efecto proteolítico se requiere de la adición de inhibidores específicos para estas enzimas (McGowan y col., 1982; Avila y col., 1985; Pérez-Montfort y col., 1987). También

se usa con el mismo propósito la adición al extracto amibiano de suero normal o inmune al 2%, lo que abate su efecto citopatogénico. Este efecto inhibitor puede en parte ser causado por la presencia en el suero normal de inhibidores de proteasas, como la  $\alpha$ 2-macroglobulina, la  $\alpha$ 1antitripsina y otras, y en el caso de sueros inmunes a la presencia de anticuerpos IgG específicos contra los componentes de la amiba que neutralizan la actividad enzimática (Bos y col., 1980; McGowan y col., 1982) (Fig. 1, Tabla 1).

La actividad de las enzimas presentes en el extracto amibiano muestran un rango de pH muy amplio, pues se mantienen estables desde pH 3 a 10; sin embargo, se presenta la máxima actividad proteolítica entre pH 5 y 7.5. A pH menores de 5 disminuye esta actividad y a pH 3 se inhibe completamente (Bos y col., 1980; Avila y col., 1985; Pérez-Montfort y col., 1987). Estas observaciones nos indujeron a estudiar el efecto del pH en la estabilización del antígeno amibiano al someterlo a un choque ácido, de tal manera de evitar el uso de inhibidores de proteasas o de suero. Los resultados obtenidos en geles de poliacrilamida (Fig. 2, carriles A y C) y su lectura por densitometría (Fig. 3, gráficas A y C), nos indican la estabilidad obtenida por el

tratamiento del extracto amibiano a pH 2; los perfiles obtenidos en ambos casos son similares a los que presenta el AgTto que se procesa inmediatamente para evitar cualquier degradación.

La inactivación enzimática del AgE no modifica la presentación de los antígenos, pues éste, como el AgTto son reconocidos de igual manera por un suero policlonal anti-E. histolytica (Fig. 4, carriles A y C y Fig. 6, gráfica a). Por otra parte, el AgD es reconocido por este mismo antisuero de una forma diferente, debido a las modificaciones que sufren las proteínas (Fig. 4 carriles A y B y Fig. 6, gráfica b).

El choque ácido al que se somete el antígeno para estabilizarlo, inactiva irreversiblemente a las proteasas (Bcs y col., 1980), por lo que este antígeno se comporta ahora como aquel que se ha tratado con suero normal al 2 % (Tabla 1). Este comportamiento es distinto del que presenta el AgD donde sus enzimas proteolíticas aún actúan sobre el sustrato de Azocoll (Tabla 1).

Las modificaciones que presenta el AgD o las que pudieran ser inducidas por el choque ácido en el AgE podrían ocasionar cambios en la inmunogenicidad de estas preparaciones. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos

en el suero de ratones inmunizados con los distintos antígenos, medida por hemaglutinación pasiva, indica que el AgD y AgTto inducen títulos similares (título 160, Tabla 3), por otra parte, el AgE estimula una respuesta de anticuerpos muy superior (título 1280, Tabla 3). Es posible que el AgTto sufra degradación tan pronto como se hidrata y eso ocasione la inducción de una respuesta humoral semejante a la del AgD. Por otra parte, el antígeno que se ha estabilizado evita que sus proteínas sean degradadas por las enzimas de la ameba y en consecuencia es más inmunogénico.

A pesar de las diferencias en inmunogenicidad de las tres preparaciones ensayadas, es interesante observar que aún conservan determinantes antigénicos similares, como lo demuestra su reactividad con un suero policlonal anti-E, histolytica. Los estudios de inhibición de la hemaglutinación comprueban lo anterior ya que las preparaciones inhiben la aglutinación de eritrocitos sensibilizados con antígeno amebiano. Es necesario hacer notar que el AgE y el AgTto inhiben la aglutinación a concentraciones de 1.25ug, mientras que el AgD requiere de 2.5ug, lo que indica que aunque las tres preparaciones reaccionan con el anticuerpo policlonal anti-E, histolytica, las dos primeras conservan

seguramente determinantes protéicos que aumentan su eficiencia en la inhibición de la hemaglutinación (Tabla 4).

La presencia de carbohidratos en la superficie del trofozoito de E. histolytica ha sido previamente demostrado por varios investigadores (Martínez-Palomo y col., 1973; Gitler y Mirelman 1986); así se observa que la Con A aglutina a los trofozoitos de E. histolytica. Otros autores han implicado a las glicoproteínas de superficie como componentes antigénicos importantes (Parkhouse y col., 1978). En este trabajo se muestra que las glicoproteínas del antígeno amibiano reconocidas por Con A se mantienen a pesar de la degradación que sufren las otras proteínas (Fig. 5, carriles A y B; Fig. 6, gráfica c). En la Figura 6, (gráficas d y e) se observa que no todas las glicoproteínas del AgTto, del AgE y del AgD son reconocidas por el suero inmune. Estos hallazgos sugieren que el residuo de carbohidrato puede ser el responsable de la inhibición que se observa con las tres preparaciones ya mencionadas y que la reactividad superior del AgE y del AgTto puede ser debida a la preservación del residuo proteico de las glicoproteínas de la amiba. Más aún, cuando se usó el antígeno enriquecido en carbohidratos como inhibidor de

la prueba de inhibición de la hemaglutinación, no se observó una inhibición comparable a la obtenida con el AgTto (Tabla 5); sin embargo, el antígeno enriquecido en carbohidratos inhibió mejor que el AgD. Estos experimentos sugieren que en la fracción rica en carbohidratos se encuentra una parte importante de los determinantes antigénicos, como lo apoyan los ensayos de inhibición de la prueba de ELISA, donde 10 µg de AgTto inhibe el 50% de la reactividad de un anticuerpo, ya sea mono o policlonal, mientras que el antígeno enriquecido en carbohidratos inhibe únicamente entre el 16 y el 20% de la reacción del anticuerpo monoclonal (Tabla 6) y del 21 al 24.5%, para anticuerpos policlonales (Tabla 7). Es posible que el residuo proteico de la glicoproteína, que parece ser degradado por las enzimas amibianas, sea importante en la reactividad con anticuerpos que seguramente reconocen a la estructura antigénica intacta del parásito.

En los trabajos que se realizaron de inmunoprolaxis se obtuvo un alto grado de protección para el desarrollo del AHA para los tres antígenos estudiados, protegiendo para el AgE y el AgTto, desde el 72 al 80 % respectivamente. Sin embargo son resultados preliminares que requieren de más investigación.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aley, S.B., Scott, W.A. y Cohn, Z.A., 1980. Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152: 391-404.
- 2.- Anaya-Velazquez, F., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V. y Gonzalez-Robles, A., 1985. Intestinal invasive amoebiasis: An experimental model in rodent using axenic or monoxenic strains of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 723-730.
- 3.- Avila, E.E., Sanchez-Garza, M. y Calderon, J., 1985. Entamoeba histolytica and E. invadens: Sulfhydryl-dependent proteolytic activity. J. Protozool., 32: 163-166.
- 4.- Bos, H.J. 1979. Entamoeba histolytica: cytopathogenicity of intact amoebae and cell-free extracts: isolation and characterization of an intracellular toxin, Exp Parasitol, 47:369-377.
- 5.- Bos, H.J., Leijendekker, W.J. y van den Eijk, A.A., 1980. Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin induced lysis of hamster kidney cell monolayer., Exp. Parasitol., 50: 342-348
- 6.- Chayen, A. y Avron, B., 1985. Entamoeba histolytica, Antigens and amoebiasis., Curr. Top. in Microbiol. Immunol., 120:19-41.
- 7.- del Muro, R., Oliva, A., Herion, P., Capin, R. y Ortiz-Ortiz, L., 1987. Diagnosis of Entamoeba histolytica in feces by ELISA., J. Clin. Lab. Anal., 1:322-325.
- 8.- 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. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72:431-432



- 9.- Gadasi, H. y Kobiler, D., 1983. Entamoeba histolytica: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes., Exp. Parasitol. 55:105-110.
10. - Gitler, C y Mirelman, D., 1986. Factores contribuyentes to the pathogenic behavior of Entamoeba histolytica. Ann. Rev. Microbiol. 40: 257-261.
- 11.- Glass II, W.F., Briggs, R.C. y Hnilica, L.S., 1981. Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Anal. Biochem, 115:219-224
- 12.- Guerrant, R.L., 1986. The global problem of amebiasis: Current status, research needs and opportunities for progress. Rev. Infect. Dis. 8:218-227.
- 13.- Guirges, S.Y., 1984. Virulence of Entamoeba histolytica strains of human origin in Bombay to Golden hamster. Jap. J. Med. Sci. Biol. 37:125-130.
- 14.- Gutierrez, G., 1987. Investigaciones mexicanas sobre vacunas, amebiasis. Información estadística sobre enfermedades transmisibles. Epidemiología, 2:125-140.
- 15.- Keene, W.E., Pettit, M.G., Allen, S. y McKerrrow, J.H. 1986. The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 163: 536-549.
- 16.- Kretschmer, R.R. 1984. Immune phenomena in Amebiasis. Surv. Immunol. Res. 3:1-10.
- 17.- Kretschmer, R.R. 1986. Immune consequences of Amebiasis. Ped. Infect. Dis., 5:S109-S116.
- 18.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 19.- Larralde, C., Lacleste, J.P., Owen, C.S., Madrazo, I., Bandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L. Govezensky, T., Montoya, R.M., y Goodsaid, F., 1986. Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluids: ELISA and Hemagglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 965-973.

- 20.- Larraide, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Diaz, M.L., Govezensky, T. y Coltorti, E. 1988. Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients with neurocysticercosis and disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. En prensa.
- 21- Martinez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A.y de la Torre, M., 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced Con-A. Nature (New Biol) 245:186-187.
- 22-Mathews, H.M., Moss, D.M. y Visvesvara, G.S. 1986. Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 33:326-334.
- 23.- Mattern, C.F.T. and Keister, D.B., 1977. Experimental Amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26:402-411.
- 24.-McGowan, K., Deneka, C.F., Thorne, G.M. y Gorbach, S.L. 1982. Entamoeba histolytica cytotoxins: Purification, characterization, strain virulence and proteasa activity. J. Infect. Dis. 146:616-625.
- 25.-Meza, I., Cazares, F., Rosales-Encina, J.L., Talamas-Rohana, P. y Rojkind, M., 1987. Use of antibodies to characterize a 220-Kilodalton surface protein from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156:798-805.
- 26.- Mirelman, D., 1987. Ameba-bacterium relationship in Amebiasis. Microbiol. Rev. 51:272-284.
- 27.- Oliva, A., Correa, I y Ortiz-Ortiz, L., 1986. Inmunogenicidad de un antigeno deslipidizado de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex), 17(Supl):229-232.
- 29.- Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F., y Contreras, M.F., 1972. Delayed hypersensitivity to polysaccharides from Nocardia. J. Immunol. 108:1409-1413.
- 29.- Ortiz-Ortiz, L., Zamacona, G., Sepulveda, B., y Capin, N.R., 1975. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4:127-134.

- 30.- Ortiz-Ortiz, L. y Avella, M.L., 1984. Respuesta inmune en infecciones por Entamoeba histolytica, *Inmunologia* 3:5-11.
- 31.- Ortiz-Ortiz, L., Jimenez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E.I., y Oliva, A., 1986. Entamoeba histolytica: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61:390-397.
- 32.- Parkhouse, M., Cid, M.E. y J. Calderon, 1978. Identificación de antígenos de membrana de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes de Amibiasis. *ARCH. INVEST. MED. (MEX)* 9(Supl. 1):211-218.
- 33.- Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velazquez-Medina, L., Montfort, I. e Becker., I., 1987. Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica, *Mol. Biochem. Parasitol.* 26:87-98.
- 34.- Petri, W.A., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F. y Ravdin, J.I., 1987. Recognition of the galactose- or N-Acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. *Infect. Immun.* 55:2327-2331.
- 35.- Ravdin, J.I., 1986. Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 6:247-260.
- 36.- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., Lopez-De-Leon, A., Talamas-Rohana, P. y Rojkind, M., 1987., Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from virulent strain of Entamoeba histolytica. *J. Infect. Dis.* 156:790-797.
- 37.- Salata, R.A. y Ravdin, J.I., 1986. The interaction of human neutrophil and Entamoeba histolytica increase cytopathogenicity for liver cell monolayers, *J. Infect. Dis.* 154:19-26.
- 38.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Bhojnanii, R., Kumate, J. y Jimenez, E., 1982. A review of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stock isolated in Mexico. *Arch. Invest. Med. (MEX)* 13(Supl. 3):89-94.

- 39.-Sawhney, S., Chakravarti, R.N., Jain, P. y Vinayak, V.K., 1980. Immunogenicity of axenic Entamoeba histolytica antigen and its fractions. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 74:26-29.
- 40.- Scholze, H. y Werries, E., 1984. A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in Entamoeba histolytica.  
01. Biochem. Parasitol. 11:293-300.
- 41.- Scholze, H. y Werries, E., 1986. Cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and action on different enzymes. Mol. Biochem. Parasitol. 18:103-112.
- 42.- Scholze, H., Otte, J. y Werries, E., 1986. Cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. II. Identification of the major split position in bovine insulin b-chain. Mol. Biochem. Parasitol. 18:113-121.
- 43.- Schott, K.J., Neuhoff, V., Nessel, B., Potter, U. y Schroter, J., 1984. Staining of Concanavalin A-reactive glycoproteins on polyacrilamide gels with horseradish peroxidase- A critical evaluation. Electrophoresis. 5:77-83.
- 44.-Schulte, W., Scholze, H. y Werries, E. 1987. Specificity of a cysteine proteinase of Entamoeba histolytica towards the 1-CB2 peptide of bovine collagen type I. Mol. Biochem. Parasitol. 25:39-43.
- 45.-Sepulveda, B., 1980. Immunology of Amebiasis. in Molecules, Cells and Parasites in Immunology, Ed. C. Larralde, K. Willms, M. Sela y L. Ortiz- Ortiz, Academic Press Inc. New York.
- 46.-Tanimoto, M., Sepulveda, B., Vazquez-Saavedra, J.A. y Landa, L., 1971. Lesiones producidas en el higado de hámster por inoculación de Entamoeba histolytica cultivada en medio axenico. Arch. Invest. Med. (Mex)2:275-284.
- 47.- Torian, B.E., Lukehart, S.A. y Stamm, W.E., 1987. Use of monoclonal antibodies to identify, characterize and purify a 96,000-dalton surface antigen of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 156:334-343.
- 48.- Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F. y Martinez-Palomo, A., 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Amer. J. Pathol. 117: 81-91.

49.- Walsh, J.A., 1986. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity. Rev. Infect. Dis. 8:228-238.

50.- Williams, C.A. y Chase, M.W., 1968. Methods in immunology and immunochemistry, Vol.II, Academic Press Inc. New York.

51.- Zamora, A., Bojalil, L.F. y Bastarrachea, F., 1963. Immunologically active polysaccharides from Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis. J. Bacteriol. 85:549-555.