

3 24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DIFERENCIAS INMUNOQUIMICAS DE LA LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANA OBTENIDA A PARTIR DE CLONAS VIRULENTAS Y NO VIRULENTAS DE LA CEPA HMI-IMSS DE Entamoeba histolytica

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN ARREGUIN OSUNA

Director de Tesis:
DR. ARMANDO ISIBASI A.

FALLA DE ORIGEN



Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1990



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.

CONTENIDO

I. RESUMEN	7
II. INTRODUCCION	
2.1 Antecedentes históricos	8
2.2 Morfología, Biología y Ciclo Vital	9
2.3 Patología	10
2.4 Epidemiología	11
2.5 Antígenos Amibianos de superficie	12
2.6 Inmunología	15
2.7 Clasificación	16
2.8 Patogenicidad y Virulencia	17
2.9 Obtención de clones deficientes en fagocitosis	18
III. OBJETIVOS	21
IV. MATERIAL Y METODOS	
4.1 Sueros	22
4.2 Cepas	22
4.3 Cultivo axénico de trofozoitos	22
4.4 Obtención de la LPFG	24
4.5 Caracterización química	25
4.6 ELISA	36
V. RESULTADOS	35
VI. DISCUSION	39
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. BIBLIOGRAFIA	43

INDICE DE FIGURAS

Tabla. 1	Caracterización química de la LPFG.
Fig. 1	Obtención de clones deficientes en fagocitosis.
Fig. 2	Método de extracción de la LPFG.
Fig. 3	Electroforesis SDS PAGE con tinción de azul de Coomassie de la LPFG.
Fig. 4	Electroforesis SDS PAGE con tinción de nitrato de plata de la LPFG.
Fig. 5	Electroforesis SDS PAGE con tinción de nitrato de plata de polisacáridos de <i>Salmonella typhi</i> 9,12,Vi,d
Fig. 6	Estandarización del método de ELISA para la LPFG de la cepa HMI-IMSS
Fig. 7	Estandarización del método de ELISA para la LPFG de la clona A
Fig. 8	Estandarización del método de ELISA para la LPFG de la clona L-6
Fig. 9	Determinación de anticuerpos séricos en pacientes con AHA contra la LPFG de la cepa HMI-IMSS y de dos clones derivadas.
Fig. 10	Determinación de anticuerpos séricos en pacientes con AHA y en personas sanas contra la LPFG de la cepa HMI-IMSS y de dos clones derivadas.

PRINCIPALES	ABREVIATURAS	UTILIZADAS
AHA	Absceso	hepático amibiano
LPFG	Lipopeptidofosfoglicana	
Ag	Antígeno	
Ac	Anticuerpo	
SDS PAGE	Gel de poliacrilamida	dodecil sulfato de sodio
HLA	Complejo mayor de	Hisatocompatibilidad
D.O.	Densidad óptica	
CLISA	Ensayo inmunoenzimático	en fase sólida
Kd	Kilodaltons	
PM	Peso molecular	

RESUMEN

En base a los hallazgos de obtención de clonas virulentas y no virulentas derivadas de una cepa patógena de *Entamoeba histolytica*, se decidió explorar las diferencias inmunoquímicas entre estas clonas y la cepa original a través del estudio inmunoquímico de los polisacáridos de superficie (lipopeptidofosfoligana).

Los resultados son los siguientes: la concentración total de azúcares para la cepa original HMI-IMSS fue del 85%, mientras que para la clona A fue del 75% y la clona L-6 del 95%. La concentración de proteínas fue del 1% para los 3 polisacáridos en estudio. El corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) de los 3 polisacáridos fue semejante al corrimiento electroforético de los lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas; sin embargo, entre las clonas virulentas y no virulentas hubo algunas diferencias en cuanto a la distribución de las bandas.

Se comparó el nivel de anticuerpos séricos anti-LPFG de 66 pacientes con absceso hepático amibiano en relación con 50 personas sanas por el método de ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) ante cada uno de los antígenos polisacáridos extraídos de la cepa y clonas de *E. histolytica*. El suero de pacientes muestra una media en densidad óptica para la cepa HMI-IMSS de 0.46 (± 0.16). Con el polisacárido de la clona virulenta fue de 0.49 (± 0.21) y para la clona no virulenta fue de 0.24 (± 0.05). Mientras que el suero de personas sanas presentó una media de 0.29 (± 0.04) para la cepa HMI-IMSS y para la clona A de 0.25 (± 0.04) y para la clona L-6 de 0.17 (± 0.02).

INTRODUCCION

Antecedentes históricos:

Las amibas fueron vistas por primera vez por Rosel van Rosenhorf en 1755. Ehrenberg creó en 1839 el género *Amoeba* y en 1849 Gros descubrió la primera amiba parásita del hombre.

En 1875 Lesh publicó los resultados de la experimentación que hizo en un caso de disentería. El título de su trabajo fué "Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso". Este estudio abarcó la descripción de las amibas, incluyendo su estructura, tamaño, núcleos, movilidad, vacuolas y elementos intracitoplásmicos. Además llevó a cabo experimentos en perros admistrando las heces del paciente, aunque no llegó a sospechar la relación causa-efecto entre la amiba y la colitis aguda.

En 1886, Kartulis publicó sus observaciones obtenidas en pacientes con disentería, afirmando el papel etiológico de las amibas en la disentería y en 1890 hace notar que estos parásitos se encuentran en diversos climas.

En 1891 Councilman y Lafleur efectuaron un trabajo sobre amibiasis intestinal y hepática denominando a las amibas causales de la enfermedad como *Entamoeba dysenteriae*.

Quincke y Roos en 1893 demostraron que los quistes son la forma infectante.

Schaudinn en 1908 fijó los caracteres diferenciales y estructurales de las amibas parásitas del intestino humano; a la patógena la llamó *Entamoeba histolytica* por la capacidad de esta especie para desintegrar los tejidos y *Entamoeba coli* a la

especie desprovista de poder patógeno.

En 1912 Roges publicó un artículo en relación con el tratamiento de la amebiasis usando sales solubles de emetina. Siguieron numerosos estudios centrados en el tratamiento de la amebiasis encontrándose que la yodoxiquinoleína tiene propiedades amebicidas.

En el transcurso de los años fueron descritas otras especies de amibas que suelen vivir en el intestino humano como *Iodamoeba butschlii*, por Von Prowazek en 1912; *Endolimax nana* por Weynon y O'Connor en 1917; *Dientamoeba fragilis* por Jepps y Dobell en 1918; *Entamoeba hartmanni* por Von Prowazek en 1912.(27)

Morfología, Biología y ciclo vital

Entamoeba histolytica:

Pertenece al Phylum Protozoa

Subphylum: Sarcodina

Clase: Rhizopoda

Orden: Amoebida

Género: *Entamoeba*(24)

Son protozoarios anaerobios; la forma móvil del parásito es el trofozoito, una fase altamente dinámica y pleomorfica con movimientos característicos que resultan de la formación de pseudópodos. Miden de 15 a 25 micras de diámetro.(13) En su citoplasma encontramos diversos organelos: cuerpos densos, ribosomas libres y ribonucleoproteínas, gránulos osmiofilos, cuerpos helicoidales y tubulares(30), numerosas vacuolas digestivas y lisosomas. La amiba carece de mitocondrias y aparato de Golgi.

Posee un núcleo ovalado con un nucleolo central y cromatina periférica. Tiene una membrana externa que contiene mucopolisacáridos y grupos aniónicos. Se reproducen por fisión binaria.

Los quistes son la forma infectante. Su diámetro varía entre 5 y 20 micras y son cuerpos esféricos u ovoides. Su membrana plasmática frecuentemente presenta profundas invaginaciones y en su citoplasma se observan: polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno. En el núcleo existe un cariosoma, cuerpos cromatoidales y cromatina periférica adherida a la envoltura nuclear(26).

La pared del quiste está formada por proteínas; es posible que la membrana más interna la compongan carbohidratos.

El ciclo vital de *E. histolytica* consiste en cuatro estadios consecutivos: trofozoito, prequiste, quiste y trofozoito metaquístico.

El ciclo de vida de *E. histolytica* no requiere de la invasión tisular. En la mayoría de los casos, esta ameba vive como comensal dentro del colon, condición denominada amibiasis luminal. Sin embargo, el parásito puede invadir la mucosa intestinal y provocar disentería amibiana; algunos trofozoitos pueden llegar al sistema sanguíneo dando las formas extraintestinales de la amibiasis; la más común es el absceso hepático amibiano donde los trofozoitos invaden el hígado vía vena porta.(22).

Patología

La patología de la amibiasis se caracteriza por daño masivo del tejido del hospedero como resultado de citólisis contacto dependiente. La patogénesis de la amibiasis incluye los siguientes eventos:

1.- Colonización del Intestino por una cepa amibiana virulenta.

2.- Contacto íntimo con adherencia a la mucosa intestinal.

3.- Destrucción de las barreras intestinales por enzimas, productos tóxicos o factores citopáticos liberados por la amiba.

4.- Lisis de las células intestinales y de las células inflamatorias del hospedero, lo cual lleva a la pérdida de la continuidad, interrupción de la mucosa intestinal, úlceras del colon y a una posterior invasión de los tejidos y/o a una invasión de otros órganos principalmente el hígado(9).

Epidemiología

La amibiasis se define como la condición de hospedar *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. *E. histolytica* es la única especie del género *Entamoeba* que es patógena al hombre.

Su distribución es cosmopolita. Su incidencia varía de un área a otra, siendo mayor en zonas tropicales y subtropicales y en ciudades con condiciones sanitarias deficientes, donde prevalecen la pobreza, la sobrepoblación y la ignorancia (47).

En México, la amibiasis es endémica, es frecuente, se encuentra extendida por todo el país de manera independiente del clima y predomina en los medios mal saneados, con higiene precaria y de bajo nivel socioeconómico. La localización más frecuente es la intestinal y se observa con mayor frecuencia en niños de ambos sexos a diferencia del absceso hepático amibiano que predomina en adultos del sexo masculino(15).

En México la frecuencia con que se han encontrado quistes

de *E. histolytica* en heces varía enormemente entre el 5 y 55% (15,6) y el 90% de los abscesos hepáticos son de etiología amibiana. (15).

Antígenos amibianos de superficie

Para estudiar la participación del sistema inmune en la amibiasis, es necesario definir los antígenos amibianos que son reconocidos durante la infección. Los estudios inmunológicos hechos con antígenos amibianos derivados de cultivos no axénicos eran difíciles de interpretar debido a los contaminantes de bacterias o parásitos (23).

En 1968 Diamond (11) desarrolló el cultivo axénico de trofozoitos lo que permitió un rápido avance en los estudios bioquímicos, fisiológicos e inmunológicos de las amibas y permitió obtener los antígenos amibianos puros, ya sea de células completas, homogeneizados, productos de secreción o de fracciones particuladas o solubles. Ese mismo año, Thompson y col. (42) estandarizan antígenos amibianos, provenientes de este tipo de cultivo. El material antigénico así obtenido es heterogéneo y está formado por varios compuestos de diversa naturaleza química: proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Esta mezcla de antígenos recibió el nombre de histolicina.

Los antígenos de *Entamoeba histolytica* localizados en la superficie celular deben ser los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune durante la infección (22). La importancia y existencia de estos antígenos de superficie se ha demostrado por la inmovilización de los trofozoitos por suero inmune (5), por la unión del suero inmune fluoresceinado al trofozoito intacto (7), y

por la lisis de los trofozoitos por la vía clásica y alterna del complemento (16).

Parkhouse y cols. en 1978 (34) demostraron que los principales antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* que son reconocidos por sueros de pacientes, son de naturaleza glicoprotéica.

Martínez Palomo y cols.(28), demostraron que la membrana plasmática de *Entamoeba histolytica* contiene residuos de manosa o glucosa, ya que los trofozoitos se aglutinaban en presencia de Concanavalina A. También se ha reportado que la adherencia de los trofozoitos a las células epiteliales está mediado por una lectina asociada a la membrana de la amiba y esta puede ser inhibida por N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina (14).

Por otro lado, Ortiz Ortiz y cols.(33) encontraron que los trofozoitos activaban la vía alterna del complemento, lo que hace suponer la existencia de carbohidratos sobre la superficie de los trofozoitos .

En 1980, Aley y cols.(3) desarrollaron una metodología para la separación de las membranas plasmáticas de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, basada en la unión específica de la Concanavalina A a los componentes glicoprotéicos de la membrana del trofozoito, aislando 6 glicoproteínas de la cepa HM1-IMSS y 4 de la cepa HK9:NIH.

Korn y cols.(20) aislaron y caracterizaron una molécula polisacáridica que llamaron lipofusfonoglicana. Esta molécula constituye el 31 % de la membrana plasmática de *Acanthamoeba castellanii*.

En 1982, Isibasi y cols.(17) lograron aislar una molécula

de naturaleza polisacáridica extraída a partir de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cultivados axénicamente compuesta de:

-azúcares en un 85% y son: glucosa, galactosa, manosa, xilosa, fucosa y azúcares aminados como glucosamina y galactosamina.

-porción peptídica en un 8% formada de residuos de ácido aspártico y glutámico, pequeños residuos de metionina, tirosina, cisteína e histidina, trazas de arginina.

-fracción lipídica que abarca el 2.5% de la molécula.

-fosfatos en un 1%.

Este compuesto recibió el nombre de lipopeptidofosfoglicana (LPG). Por inmunofluorescencia indirecta y microscopía electrónica se ha demostrado que esta molécula se localiza en la superficie de los trofozoitos(18). Otros estudios han demostrado la presencia de anticuerpos específicos anti-lipopeptidofosfoglicana en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano de isotipo IgG, IgM e IgA(8) así como en el suero de conejos inmunizados con trofozoitos(31).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-LPG en la bilis de ratas inmunizadas intracelalmente con trofozoitos de clase IgA secretoria(1). También se ha encontrado la presencia de anticuerpos específicos de clase IgAs dirigidos contra la LPG en muestras de calostro de mujeres mexicanas(2).

Esta molécula perdió su actividad antigénica al tratarla con metaperyodato de sodio, lo que sugiere la importancia de los azúcares como determinantes antigénicos (9).

Inmunología

Los mecanismos inmunes humanos en contra de *E. histolytica* aún no han sido totalmente esclarecidos.

En la mayoría de los individuos infectados *E. histolytica* habita como comensal y las condiciones que llevan al desarrollo de la enfermedad invasiva son multifactoriales y están relacionados con el balance entre los "mecanismos patógenos del parásito y los mecanismos de defensa del hospedero ya sean éstos inmunes o no. La respuesta inmune a *E. histolytica* ocurre sólo como resultado de la invasión tisular y el parásito es capaz de disipar la inmunidad humoral y celular en el humano.

Inmunidad humoral: Se desarrolla con la enfermedad invasiva pues se ha encontrado que los pacientes con amibiasis intestinal o con absceso hepático amibiano desarrollaban anticuerpos IgG específicos (subclase IgG₂) e IgM (9); también se demostró la presencia de coproanticuerpos de clase IgA en pacientes con amibiasis intestinal (8).

La presencia de anticuerpos séricos anti-amiba en pacientes sólo es indicador de que el paciente tuvo o tiene amibiasis aunque los títulos más altos se presentan en las etapas iniciales de la enfermedad invasiva (21). No hay evidencias de que el título de anticuerpos correlacione con el estado clínico del paciente.

La producción de anticuerpos secretores no requiere de una penetración del tejido pero esta respuesta secretoria a *E. histolytica* es de corta duración.

Se ha demostrado por estudios in vitro, que los trofozoitos amibianos son capaces de agregar, ingerir y "desprender" a los anticuerpos anti-amiba que se unen a su superficie. Esto sugiere un

mecanismo de evasión del parásito a la respuesta inmune humoral del hospedero, de manera que la respuesta de anticuerpos no parece ser efectiva en controlar o proteger de la enfermedad(7,4).

En resumen, la respuesta inmune humoral sistémica dirigida en contra de *E. histolytica* no parece ser la responsable de controlar el desarrollo de una infección ya establecida o de proveer resistencia hacia la amibiasis invasiva ni de prevenir reinfecciones subsecuentes(9).

Clasificación entre amibas patógenas y no patógenas

En 1968, Robinson(37) describió un método de cultivo monoxénico para amibas, con lo cual fué posible obtener grandes cantidades de trofozoitos. Esto permitió que Sargeant y Williams(40,41) en 1978, empleando el comportamiento electroforético de 4 isoenzimas de la amiba (utilizando geles de almidón en capa fina) pudieran clasificar a las cepas amibianas.

Un zimodemo es una población de amibas que se diferencia de otra, por la movilidad electroforética de una o dos isoenzimas específicas(38).

Los marcadores de patogenicidad en zimodemos son el corrimiento electroforético en beta y ausencia en alfa de la isoenzima fosfoglucomutasa así como dobles bandas de corrimiento rápido en hexoquinasa.

De esta manera pudieron clasificar a las cepas amibianas en patógenas y no patógenas, ya que el patrón de corrimiento de las cepas aisladas de pacientes con amibiasis es diferente al patrón de corrimiento de las cepas aisladas de pacientes asintomáticos.

Los zimodemos patógenos conocidos actualmente son:

II, VI, VII, XI, XII, XIII, XIV, XIX, XX.

Los demás zimodemos se originan de portadores asintomáticos y son: I, III, V, IV, VIII, IX, X, XV, XVI, XVII, XVIII(41).

Patogenicidad y virulencia

Las diferentes cepas de *E. histolytica* varían en su poder patógeno y en su grado de virulencia. Esta puede aumentarse por pasajes sucesivos a través del hígado de animales de experimentación; o disminuirse a medida que aumenta el tiempo de cultivo en medio axénico. También la composición del medio, cocultivación con otros microorganismos, o subcultivación son factores que hacen fluctuar la virulencia(29,46).

Se ha demostrado que las cepas virulentas de *E. histolytica* tienen similitudes antigénicas que no comparten con las cepas no virulentas. Sin embargo, no se ha establecido una relación entre la composición antigénica y la virulencia(22).

Existen algunos parámetros para medir la virulencia y la patogenicidad "in vitro" de las cepas amibianas; algunos de estos son:

- grado de eritrofagocitosis
- fagocitosis de ciertas bacterias
- susceptibilidad de aglutinar con Concanavalina A
- efecto citopático en línea celular MDCK (fibroblastos que forman monocapas confluentes)
- contenido enzimático proteolítico
- producción de colagenasa
- capacidad de resistir la destrucción por polimorfonu-

cleares

- adherencia a la célula blanco

La fagocitosis, el grado de eritrofagocitosis y el efecto citopático están correlacionadas directamente con la virulencia de las cepas.

Hay resultados que sugieren que la población celular de las cepas amibianas es heterogénea ; esto es, está compuesta de células con diferentes capacidades fagocíticas. El aumento de la virulencia podría ser el resultado de una presión selectiva favorable a los trofozoitos más virulentos(32).

Obtención de clones deficientes en fagocitosis

En 1982 Orozco y cols.(32) aislaron a partir de la cepa HMI-IMSS de *E. histolytica* cultivada axénicamente dos clones seleccionadas de acuerdo a sus capacidades fagocíticas. Colocaron bacterias *Escherichia coli* CR-34 T_{im}^- en medio 56/2 suplementado con Timidina o Bromodeoxiuridina (BrdUr); fueron cosechadas en la fase logarítmica de su crecimiento y se irradiaron con una lámpara fluorescente. Posteriormente estas bacterias se sembraron en medio semisólido y al realizar la cuenta viable se encuentra que las bacterias crecidas en el medio 56/2 suplementado con BrdUr, la irradiación ejerce un efecto letal en ellas y fueron inactivadas.

Se colocaron trofozoitos (cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 de acuerdo a la técnica descrita por Diamond(11) y cosechadas en la fase logarítmica de su crecimiento) con bacterias BrdUr y se incubaron 3 horas a 37°C para permitir la ingestión de las bacterias por las amibas. Se lavó para quitar las bacterias no ingeridas y se sembró en medio TYI-S-33 por 24 horas para permitir

la replicación de las amibas y la incorporación de la BrdU en el DNA amibiano. Luego los trofozoitos se lavaron y se resuspendieron en medio mínimo para ser irradiados con lampara fluorescente. Después se sembraron en medio TYI-S-33 y se realizó la cuenta viable. Los trofozoitos sobrevivientes fueron aquellos deficientes en fagocitar las bacterias BrdU; éstos se crecieron y el protocolo se repitió tres veces más. La población obtenida se denominó población L.

Se tomaron trofozoitos de la cepa HMI-IMSS y de la población L; se clonaron para obtener poblaciones celulares homogéneas; a la clona obtenida de la población L se le llamó L-6 y a la obtenida a partir de HMI-IMSS sin ningún tratamiento se le llamó C-A. (Figura 1)

A estas clonas así como a la cepa original se le realizaron los siguientes ensayos:

-Eficiencia de formación de colonias en agar semisólido: Los trofozoitos se sembraron en botellas de agar semisólido preparado en medio TYI-S-33. Se incubaron a 37°C y el número de colonias se contó a los 7 días.

-Eficiencia de clonación en medio líquido: Los trofozoitos se resuspendieron a la concentración de 1 cel/µl en medio TYI-S-33 suplementado con antibióticos, se incubaron a 37°C y entre 6 y 10 días se revisó el crecimiento.

-Virulencia: Se inyectaron 20 000 o más trofozoitos intrahepáticamente en hamsters recién nacidos. Después de 8-16 días los hamsters se anestesiaron, se practicó laparotomía y se extrajo el hígado para valorar los abscesos de acuerdo a su número y tamaño.

-Eritrofagocitosis: Eritrocitos humanos lavados se pusieron en contacto con trofozoitos en relación 100:1, se incubaron a 37°C; la reacción de fagocitosis se detuvo agregando agua bidestilada para romper los eritrocitos libres y adheridos a la superficie del eritrocito. Las preparaciones celulares se fijaron y se contrastaron contando en el microscopio los eritrocitos ingeridos en 100 amibas.

- Efecto citopático sobre células en cultivo: El efecto citopático de *E. histolytica* sobre células epiteliales de la línea MDCK se midió por la velocidad de los trofozoitos de destruir las monocapas celulares.

En los resultados obtenidos, se observa que la clona A tiene un elevado grado de eritrofagocitosis, tiene efecto citopático sobre células en cultivo y formó AHA en el hígado de hamsters, por lo que se considera virulenta. En cambio la clona L-6, fagocito poco los eritrocitos humanos, no tuvo efecto citopático sobre células en cultivo y no formó AHA en el hígado de hamsters. La clona L-6 es no virulenta.

Es importante señalar que las clonas L-6 y A no cambiaron su zimodemo, conservando el zimodemo patógeno II de la cepa original HM1-IMS6.

El presente trabajo pretende encontrar las diferencias en el reconocimiento por anticuerpos séricos de pacientes con AHA hacia las LPFG obtenidas de clonas virulentas y no virulentas con el fin de observar si el sistema inmune es capaz de diferenciarlas.

OBJETIVOS

- Aislar la LPFG de la cepa HMI-IMSS de *E. histolytica* cultivada axénicamente y de las dos clonas derivadas de ella: C-A y L-6 aplicando la técnica de Westphal-Jann.

- Caracterizar químicamente la LPFG de la cepa y clonas antes mencionadas.

- Determinar el patrón de reconocimiento por los anticuerpos séricos de pacientes con absceso hepático amibiano a la LPFG obtenida de la cepa y clonas mencionadas.

MATERIALES Y METODOS

1.- Sueros.

Se utilizaron 66 sueros de pacientes con diagnóstico clínico, y radiológico comprobado de absceso hepático amibiano provenientes del Centro Médico Nacional y 50 sueros de personas sanas sin antecedentes de amibiasis.

2.- Cepas utilizadas de *Entamoeba histolytica*.

Se utilizó la cepa HMI-IMSS de *E. histolytica* y dos clonas derivadas de ella: L-6 y C-A donadas por Esther Orozco (CINVESTAV).

3.- Cultivo axénico de trofozoitos.

Se utilizaron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HMI-IMSS y de las clonas L-6 y C-A cultivadas axénicamente en medio TYI-S-33 de acuerdo a la metodología descrita por Diamond (10,11).

3.1.- Preparación del medio de cultivo tripticasa y peptona.

a) Los constituyentes de este medio de cultivo son:

Regulador de fosfatos	364.5	ml
Extracto de levadura	182.8	g
tripticasa (o peptona)	364.5	g
glucosa	182.8	g
cloruro de sodio	36.4	g

L-cisteína	18.2 g
ácido ascórbico	3.6 g
citrato férrico de amonio	36.0 ml

b) Agregar y disolver cada uno de estos componentes en agua destilada, aforando a un volúmen final de 15 lt. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

c) Inactivar suero bovino por calentamiento a 56°C por 30 minutos. En condiciones de esterilidad, complementar el medio al 15% de suero bovino y 3% de mezcla vitamínica.

d) Hacer pruebas de esterilidad sembrando en tioglicolato, BHI y gelosa sangre incubando a 37°C por 48 horas.

e) Envasar en botellas Falcon de 500 ml con tapón de rosca vertiendo aproximadamente 100 ml en cada frasco.

3.2 Siembra y cosecha de los trofozoitos.

Se partió de cultivos de ambas estacionarios en tubo y en la fase logarítmica de su crecimiento se sumergieron durante 10 minutos en baño de hielo para favorecer el desprendimiento de los trofozoitos de las paredes del tubo. Se deja reposar un tiempo después de lo cual, se elimina el sobrenadante y las células que por densidad están en el fondo se pasan a botellas con medio de cultivo para obtener un crecimiento masivo de células.

b) Estas botellas se incuban a 37°C por 72 horas, tiempo en el cual se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Sumergir estas botellas en un baño de hielo por 10 min. Los trofozoitos se cosechan por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en solución salina 0.85M; lavar 3 veces con solución salina 0.85M o

con amortiguador de fosfatos pH 7.2. Liofilizar los paquetes celulares hasta su uso.

4.- Obtención de la LPFG de los trofozoitos de *E. histolytica*.

Para la obtención de la LPFG de los trofozoitos de *E. histolytica* se usó la técnica de fenol-agua descrita por Westphal-Jann(45) usando fenol al 90%. Esta técnica se basa en que el fenol es un excelente solvente de proteínas; los polisacáridos, lipopolisacáridos, ác. nucleicos y mucopolisacáridos son solubles en agua e insolubles en fenol; mezclas de fenol-agua permiten una completa extracción de proteínas de soluciones acuosas. La separación de las proteínas de los polisacáridos y ác. nucleicos usando esta técnica es eficiente.

Soluciones

-fenol 90%

Procedimiento (figura 2)

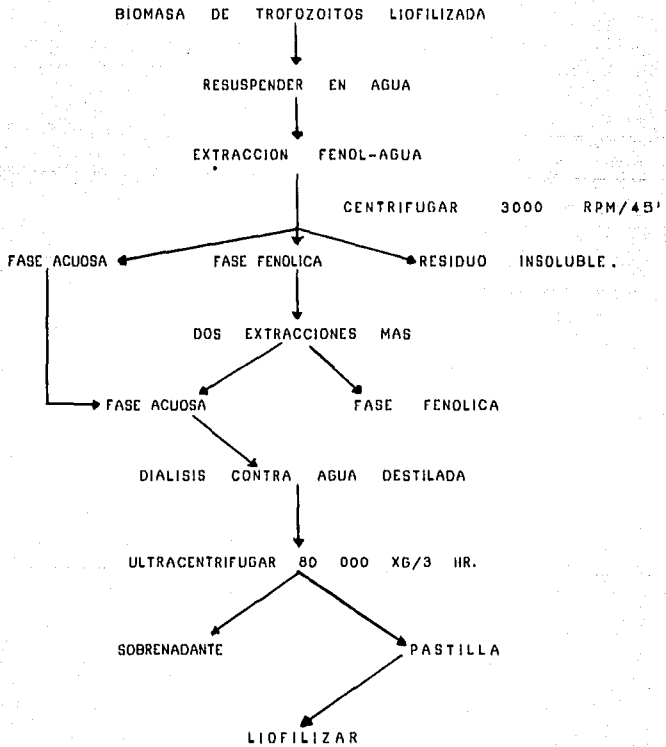
a) La biomasa liofilizada es resuspendida en agua hasta solubilizarse, se calienta a 65-68°C y se añade con agitación violenta el mismo volumen de fenol (90%) precalentado a 65-68°C pues a esa temperatura el agua y el fenol son miscibles y las células son desintegradas.

b) Dejar 30 minutos agitando constantemente. Después se enfría en baño de hielo.

c) Centrifugar la emulsión a 3000 rpm por 15 min. formándose 3 fases: una fase fenólica, una fase acuosa y un residuo insoluble. Se recolecta la fase acuosa donde va el polisacárido y a las otras fases se les repite la extracción dos veces más.

FIGURA #2

METODO DE EXTRACCION DE LPFG



- d) Dializar exhaustivamente con agua para quitar el fenol.
 e) Ultracentrifugar a 80 000 xg por 3 horas a 40C. La pastilla obtenida es la LPFG, que es liofilizada nuevamente.

5.- Caracterización química de la LPFG.

5.1 Determinación de azúcares por el método fenol-ác. sulfúrico.

El método colorimétrico fenol-ác. sulfúrico⁽¹²⁾ permite cuantificar azúcares totales y el contenido de azúcares en glicoproteínas, debido a que la unión del reactivo con los residuos del azúcar forma un complejo de color naranja.

Soluciones

- Azúcar de referencia: Se empleó como estándar de referencia 10 mg de glucosa disuelta en 10 ml de agua destilada (concentración de 1 mg/ml).

-Solución acuosa de fenol al 5%.

-ácido sulfúrico concentrado

Procedimiento

a) En tubos de ensaye limpios se colocan por duplicado cantidades crecientes de glucosa ajustándose a un volumen final de 0.4 ml/tubo con agua destilada.

# tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
(glucosa en µg)	-	5	10	15	20	50	80	100
µl de estándar	-	5	10	15	20	50	80	100
ml de agua	.4	.395	.39	.385	.38	.35	.32	.30

b) Agregar a cada tubo 400 µl de fenol al 5% y colocarlo en baño de hielo.

c) Añadir a cada tubo 2 ml de ac. sulfúrico concentrado, agregándolo gota a gota por las paredes del tubo. Mezclar vigorosamente.

d) Meter en el horno a 100°C por 10 min.

e) Una vez que los tubos están a temperatura ambiente, medir la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. Construir la curva de calibración graficando los valores de absorbancia contra μg de azúcar.

f) Las muestras problema se tratan de igual forma que las de referencia, y el valor de su absorbancia se interpola en la curva para determinar la cantidad de azúcares.

5.2. Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Es una modificación del método de Folin-Ciocalteu basado en la determinación del triptófano, tirosina y cisteína contenida en las proteínas ya que en presencia de cobre son capaces de reducir el reactivo de folin-Ciocalteu formando un complejo de color azul₍₂₅₎.

Soluciones

-Proteína de referencia: Se usó como proteína estándar 10 mg de albúmina sérica bovina disuelta en 10 ml de solución salina 0.85M (concentración de 1 mg/ml).

-Reactivo B: Esta formado por 3 soluciones que deberán mezclarse al momento de usarse.

1) Tartrato doble de sodio y potasio: Disolver 200 mg de tartrato doble de sodio y potasio en 100 ml de agua destilada.

2) Sulfato de cobre: Disolver 100 mg de sulfato de cobre pentahidratado en 100 ml de agua destilada.

3) Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N

Reactivo B: Mezclar 1 ml de tartrato doble de sodio y potasio con 1 ml de sulfato de cobre y añadir 100 ml de carbonato de sodio.

-Reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico fosfolúngstico). Mezclar 2 ml del reactivo de Folin con 4 ml de agua destilada (1:3). Preparar al momento de usarse.

Procedimiento

a) Para elaborar la curva patrón, se colocan en los tubos de ensaye perfectamente lavados y por duplicado, cantidades crecientes de albúmina, ajustando a un volumen final de 0.4 ml por tubo con NaCl 0.85 M.

# tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[proteína en μ l]	-	10	20	30	50	100	150	200	250
μ l de estándar	-	10	20	30	50	100	150	200	250
ml NaCl 0.85M	.40	.39	.38	.37	.35	.30	.25	.20	.15

b) Añadir a cada tubo 2 ml del reactivo B. Mezclar bien y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente

c) Agregar a cada tubo 0.2 ml del reactivo de Folin. Mezclar y dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Leer en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 500 nm ajustando con el tubo 1 (blanco). Construir la curva de calibración graficando absorbancia contra μ g de proteína.

d) Las muestras problema se tratan de igual forma que las de referencia y el valor de su absorbancia se interpola en la curva de calibración para determinar la concentración de proteína.

5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida permite el análisis y la separación de mezclas de proteínas y es un excelente método dada la transparencia del gel, su alta resolución y reproducibilidad. La separación en la electroforesis depende de la carga, tamaño y forma de las moléculas. Es posible separar diferentes intervalos de peso molecular al variar la concentración del gel.

En la electroforesis desnaturante, SDS-PAGE, las proteínas se someten a la acción del 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro y simultáneamente se tratan con el detergente aniónico dodecil-sulfato de sodio (SDS) que recubre las cadenas y las carga negativamente. Así, la separación únicamente depende del tamaño y es posible determinar el peso molecular de las muestras comparando su movilidad con la de marcadores de peso molecular conocido (43).

Soluciones

-Acrilamida Bis. Disolver 30 g de Acrilamida y 0.8 g de N,N' N,N' metilenobisacrilamida en agua destilada y desionizada, aforando a 100 ml. Filtrar con papel Whatman. Almacenarlo en la oscuridad a 4 C.

-Tris-HCl 1.5 M pH=8.8. Disolver 18.15 g de tris base en 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N. Aforar a 100 ml.

-Tris-HCl 0.5 M pH=6.8. Disolver 7.8 g de tris base en 50 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N. Aforar a 100 ml.

-Solución acuosa de SDS al 10%.

-N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED).

-Persulfato de amonio (APS) al 10%.

-Amortiguador de muestra: Mezclar 25 ml de Tris-HCl pH 6.8, 10 ml de glicerol, 0.1 ml de azul de bromofenol al 0.1%. En el caso de SDS-PAGE, agregar 2 g de SDS y 5 ml de 2-mercaptoetanol.

-Amortiguador de corrimiento pH 8.3. Disolver 3 g de tris base y 14.4 g de glicina aforando a 1000 ml con agua destilada y desionizada, ajustando el pH a 8.3. Para SDS-PAGE, agregar poco a poco 1 g de SDS.

-Gel de separación al 14% con urea 4M. Mezclar 14 ml de acrilamida bis, 7.5 ml de Tris-HCl pH 8.8 y 8.05 ml de agua desionizada. Añadir 10 µl de TEMED y 0.05 ml de APS al 10%. Para SDS-PAGE, agregar 0.6 ml de SDS al 10%. Mezclar y aplicar inmediatamente en las placas.

-Gel de introducción: Mezclar 2.5 ml de acrilamida bis, 3.73 ml de Tris-HCl pH 6.4 y 8.55 ml de agua desionizada. Agregar 7.1 µl de TEMED y .05 ml de APS al 10%. Para SDS-PAGE, agregar 0.15 ml de SDS al 10%. Mezclar y aplicar de inmediato en las placas.

-Solución fijadora para tinción de azul de Coomasie: A 400 ml de metanol agregar 70 ml de ácido acético y 530 ml de agua destilada.

-Solución teñidora para tinción de azul de Coomasie: Disolver 1.25 g de azul de Coomasie en 454 ml de metanol al 50%. Añadir 40 ml de ácido acético, agitar durante 30 minutos y filtrar.

-Solución desteñidora: A 50 ml de metanol agregar 25 ml de ácido acético aforando a 1000 ml con agua destilada.

-Solución pre-fijadora para tinción de plata: A 50 ml de metanol añadir 10 ml de ácido acético aforando a 100 ml con agua

destilada.

-Solución fijadora para tinción de plata: Glutaraldehído al 10%.

-Solución teñidora para tinción de nitrato de plata: A 21 ml de NaOH 0.1 M agregar 1.4 ml de hidróxido de amonio. Añadir gota a gota 4 ml de nitrato de plata al 20%.

-Solución reveladora: A 10 ml de metanol añadir 5 mg de ácido cítrico y .05 ml de formaldehído, aforando a 100 ml con agua destilada.

Procedimiento

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó bajo condiciones reductoras, empleando un equipo de electroforesis vertical LKB-2001

A. Preparación del gel:

-Verificar que el material esté perfectamente lavado, enjuagándolo con agua destilada. Desengrasar las placas de vidrio con metanol.

-Colocar las placas de vidrio en su base y checar que los bordes estén perfectamente sellados, ajustando con los tornillos.

- La base se coloca sobre una superficie plana. Se prepara el gel de separación y se aplica entre las placas de vidrio evitando la formación de burbujas hasta una altura de 15 cm. En el espacio restante se agrega agua destilada para favorecer la polimerización horizontal del gel. Dejar por dos hrs.

- Desechar el agua decantando. Preparar en gel introduccion y aplicarlo sobre el gel separador entre las placas de vidrio; colocar el peine que formará los canales donde se aplicarán las muestras. Dejar polimerizar una hr. y quitar el peine.

- Se coloca la cámara de la parte superior sellando perfectamente. Agregar en la cámara el amortiguador de corrimiento hasta llenar la cámara.

B. Preparación de las muestras:

-Colocar las muestras en tubos de ensayo y mezclarlas volúmen a volúmen con el amortiguador de muestra. Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 5 min. y aplicar.

-Marcadores: Se incluyen marcadores de pesos moleculares conocidos. En este caso se emplearon:

fosforilasa.....	97	Kd
albúmina.....	66	Kd
ovoalbúmina.....	42	Kd
anhidrasa carbónica.....	31	Kd
inibidor de tripsina.....	21	Kd
lisosima.....	14	Kd

Los marcadores se tratan de la misma forma que las muestras y se aplican en los carriles correspondientes.

C. Electroforesis:

-Colocar el amortiguador de corrimiento en la cámara inferior: colocar dentro las mangueras de refrigerante y las placas con la cámara superior y tapar.

-Conectar el sistema a una fuente de poder a 20 mA por placa cuando las muestras pasan a gel separador cambiar a 25 mA por placa. Dejar aproximadamente 5 o 6 hrs hasta que la muestra llegue a 2 cm. por arriba del límite inferior del gel.

D. Tinción de azul de Coomassie para proteínas:

-En un recipiente colocar el gel y agregar la solución fijadora cubriéndolo completamente. Dejar toda la noche.

-Eliminar la solución fijadora y añadir al gel la solución teñidora durante 1 hr.

-Eliminar el colorante y aplicar la solución desteñidora. Realizar los cambios que sean necesarios (cada hora) hasta obtener la coloración deseada del gel.

-Colocar el gel en un papel filtro grueso y ponerlo en un secador de geles para lograr su deshidratación.

C. Tinción de plata para polisacáridos:

Todo debe hacerse con guantes y sin tocar el gel.

-En un recipiente colocar el gel y agregar la solución prefijadora cubriéndolo completamente. Dejar 30 min. y lavar con etanol 5%-ácido acético 7%.

-Añadir la solución fijadora y dejar 30 min., lavar minuciosamente con agua destilada, agitando por 24 hrs.

-Colocar la sol. teñidora en un recipiente y después poner el gel que debe quedar totalmente cubierto con la solución. Dejar 15 min.

-Lavar con agua desionizada agitando y añadir la sol. reveladora; cuando aparezcan las bandas, detener la reacción con ácido acético al 1%.

-Lavar el gel y colocarlo en un secador de geles para lograr su deshidratación.

B.- Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Los inmunoensayos son técnicas para detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos. En estos ensayos, la reacción antígeno-anticuerpo es detectada mediante una enzima y uno de los reactantes (antígeno o anticuerpo) es inmovilizado en la fase

sólida. ELISA combina especificidad y sensibilidad además de que es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de los reactivos inmunológicos(44)

Soluciones

-Amortiguador de carbonatos pH 9.5 : Disolver 7 g de carbonato de sodio y 2.8 g de bicarbonato de sodio en agua destilada aforando a 1 lt. y ajustando el pH a 9.5 con HCl 1 N.

-Amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 : Disolver 8.7 g de cloruro de sodio, 2.7 g de fosfato dibásico de sodio, 0.4 g de fosfato monobásico de sodio en agua destilada, aforando a 1 lt. y ajustando el pH a 7.4.

-Solución de lavado: PBS al 0.1 % de Tween 20

-Solución diluyente: Disolver 0.5g de gelatina en 100 ml de PBS con 0.1 ml de Tween 20.

-Solución de bloqueo: Disolver 1 g de gelatina en 100 ml de PBS.

-Amortiguador de citratos pH 5.6 : Disolver 29 g de citrato de sodio y 4.1 g de ácido cítrico en agua destilada aforando a 1 lt. y ajustando el pH a 5.6.

-Sustrato para peroxidasa (prepararse en el momento que se va a utilizar): Pesar exactamente 6 mg de o-fenilendiamina y disolver en 12 ml de amortiguador de citratos pH 5.6. Adicionar 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %.

-Ácido sulfúrico 2 N

Procedimiento

- Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano.
- Disolver la LPFG en amortiguador de carbonatos pH 9.5 y colocar 100 µl en cada pozo, incubando toda la noche a 40°C.

c) Después de cada uno de los pasos mencionados a continuación, deberá lavarse exhaustivamente con solución de lavado.

d) Bloquear llenando los pozos con solución de bloqueo, dejar 1 hr. a 37 C.

e) Diluir los sueros de los pacientes con diagnóstico clínico y comprobado de AHA en solución diluyente y colocar 100 μ l en cada pozo. Incubar 1.30 hrs. a 37 C.

f) Diluir el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-inmunoglobulinas totales humanas) en solución diluyente colocando 100 μ l en cada pozo dejando incubar 1.30 hrs. a 37°C.

g) Agregar el sustrato para peroxidasa a cada pozo, dejando 10 min. en la oscuridad.

h) Detener la reacción agregando 100 μ l de ácido sulfúrico 2 N a cada pozo y leer a 490 nm. en un lector de ELISA (Dynatec).

6.1 Estandarización del método de ELISA .

Fue necesario estandarizar previamente el método de ELISA para conocer las condiciones óptimas de trabajo. Con esta finalidad se usó como Ag la LPFG obtenida de la cepa HM1-IMSS y de las clones L-6 y A a las diluciones siguientes: 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2.5 μ g/ml y 1.25 μ g/ml (considerando su concentración de azúcares). Como Ac usé un mismo suero de paciente con diagnóstico clínico comprobado de absceso hepático amibiano a las diluciones siguientes: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200.

El conjugado anti-inmunoglobulinas unido a peroxidasa (preparado en el laboratorio) se usó a una dilución de 1:400, revelando con o-fenilendiamina con agua oxigenada. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización química

La LPFG se obtuvo por el método de Westphal Jann y los resultados de la caracterización química de la LPFG de las diferentes clonas fue el siguiente: en la tabla 1 observamos que el contenido de proteínas por el método de Lowry fue similar en las tres clonas menor al 1%; en cambio la concentración de azúcares por la técnica fenol-ác. sulfúrico muestra las siguientes diferencias: para la clona L-6 (virulenta) fue de un 95%, mientras que para la clona A (no virulenta) fue del 70% ; en cambio para la cepa original fue del 85%, este último resultado coincide con los estudios ya reportados por Isibasi y col.(17).

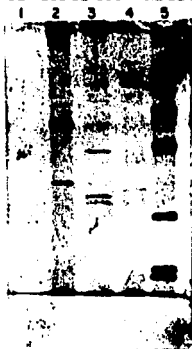
La figura 3 nos muestra el patrón de corrimiento electroforético obtenido en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) para la LPFG de la cepa y clonas de *Entamoeba histolytica* reveladas con tinción de azul de Coomasie específica para proteínas.

En el carril 2 vemos el patrón de corrimiento electroforético para la LPFG de la clona A. Podemos observar que existen una serie de bandas proteicas cuyos PM oscilan entre 21 y 45 Kd los cuales podrian corresponder a la porción peptidica de esta molécula. En el carril 3 observamos el patrón de corrimiento electroforético para la LPFG de la clona L-6 el cual muestra bandas proteicas entre 21 y 66 Kd y en el carril 4 la LPFG de la cepa HM1-IMSS el cual muestra bandas proteicas entre 21 y 66 Kd. En el último carril se colocaron los estándares de PM. Aparentemente existen una serie de bandas proteicas que se comparten entre las

TABLA 1**ANALISIS QUIMICO DE LOS LPFG DE LAS 3 DIFERENTES
CLONAS DE *E. histolytica* .**

Clona	Azúcares Totales (%)	Contenido de Proteína (%)
HMI - IMSS	85	> 1
L - 6	95	> 1
C - A	75	> 1

FIGURA 3:
ELECTROFESIS SDS PAGE CON TINCION
DE AZUL DE COOMASIE DE LA LPFG.



66 Kd

45

31

21

14

CARRIL 2: LPFG DE LA CLONA C-A
CARRIL 3: LPFG DE LA CLONA L-6
CARRIL 4: LPFG DE LA CEPA HMI-IMSS
CARRIL 5: MARCADORES DE PM

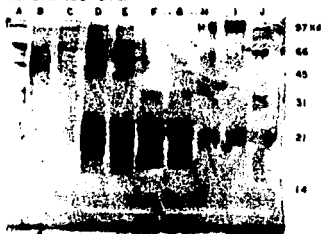
clonas virulentas y no virulentas aunque hubieron otras bandas con distribución diferente entre clonas virulentas y no virulentas.

La figura 4 nos muestra el patrón de corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) para la LPFG de la cepa y clonas de *Entamoeba histolytica* reveladas con tinción de nitrato de plata específica para polisacáridos.

En los carriles B y C observamos el patrón de corrimiento electroforético para la LPFG de la cepa HMI-IMSS; observamos un "barrido" típico de los polisacáridos el cual consiste en unidades de repetición de los monosacáridos que constituyen esta molécula. En el carril D y E el patrón de corrimiento electroforético para la LPFG de la clona L-6 el cual muestra un "barrido" con el mismo comportamiento que los polisacáridos ; en el carril F y G el patrón de corrimiento electroforético para la clona A, en el cual existe un "barrido" semejante a los carriles anteriores; en los carriles H e I muestra el patrón de corrimiento electroforético para la LPFG de la cepa HMI-IMSS de un lote diferente al que se trabajó en esta tesis, el cual se utilizó como testigo de corrimiento electroforético de la LPFG.

Los "barridos" observados en las electroforesis reveladas con nitrato de plata muestran semejanzas en el comportamiento electroforético entre la cepa y clonas estudiadas, las cuales a su vez muestran semejanza con el comportamiento electroforético visto en los polisacáridos de enterobacterias como lo muestra la figura 5. Esta figura muestra el corrimiento electroforético del polisacárido de *Salmonella typhi* 9, 12,Vi;d revelado con nitrato de plata, en el cual observamos el mismo tipo de "barrido" encontrado en la LPFG de la cepa y clones de *E. histolytica*.

FIGURA 4:
ELECTROFORESIS SDS PAGE CON TINCIÓN DE NITRATO
DE PLATA DE LA LPPG.



CARRIL A: MARCADORES DE PM
CARRIL B Y C: LPPG DE LA CEPA HNI-1M88
CARRIL D Y E: LPPG DE LA CLONA L-6
CARRIL F Y G: LPPG DE LA CLONA A
CARRIL H, I: LPPG DE LA CEPA HNI-1M88
CARRIL J: MARCADORES DE PM

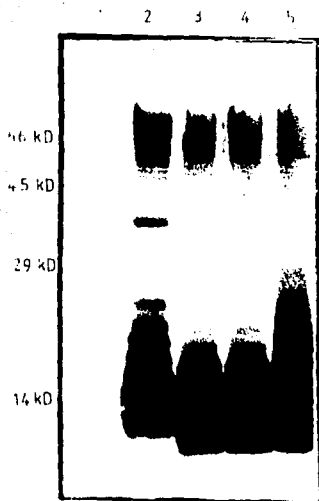


Figura 5:

Electroforesis SDS PAGE con tinción de nitrato de plata de polisacridos de *Salmonella typhi* 9,12,VI,d.

Ensayo inmunoenzimático

La estandarización del método de ELISA se llevó a cabo comparando diferentes concentraciones de LPFG de la cepa y clones estudiadas contra diferentes diluciones de un mismo suero de paciente con AHA y de un suero de persona sana, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas del método y el punto de corte donde se diferencia mejor entre sanos y enfermos.

La figura 6 muestra la gráfica de estandarización para la LPFG de la cepa HMI-IMSS en la cual se decidió tomar como punto de corte una concentración del Ag de 10 $\mu\text{g/ml}$ y una dilución del suero de 1:400. La razones de esta decisión fueron: la diferencia observada entre sanos y enfermos, la cantidad de Ag disponible para el experimento y la ventaja de usar una dilución del suero de 1:400 para evitar falsos positivos.

La figura 7 muestra la gráfica de estandarización para la LPFG de la clona A y en la figura 8 la de la clona L-6 en las cuales se observa el mismo fenómeno que para la cepa HMI-IMSS. Por estos resultados se decidió trabajar los sueros a una dilución de 1:400 con una concentración de LPFG de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa y clones en estudio.

Se estudiaron 66 sueros de pacientes con AHA cuyos resultados se pueden observar en la figura 9, la cual es una gráfica de barras que compara los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos séricos anti-LPFG de pacientes con AHA, utilizando el método de ELISA. Observamos un mayor reconocimiento hacia las moléculas provenientes de la cepa HMI-IMSS con una media de D.O. $x=.46 \pm .16$ y de la clona A virulenta con una $x=.49 \pm .21$ mientras que estos mismos anticuerpos reconocen con menor

FIGURA 6:

ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA PARA LA LPFG DE LA CLONA HMI-IMSS

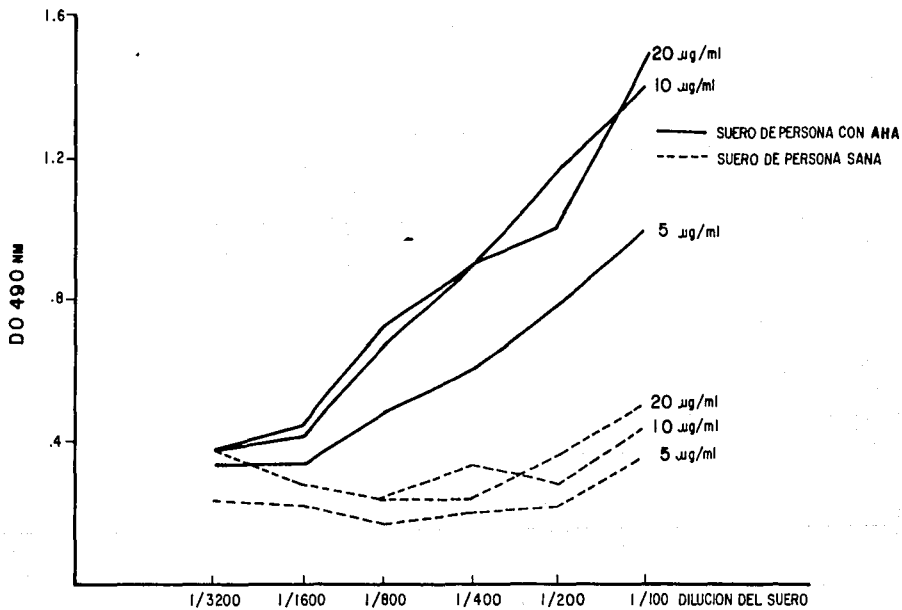


FIGURA 7:

ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA PARA LA LPFG DE LA CLONA C-A

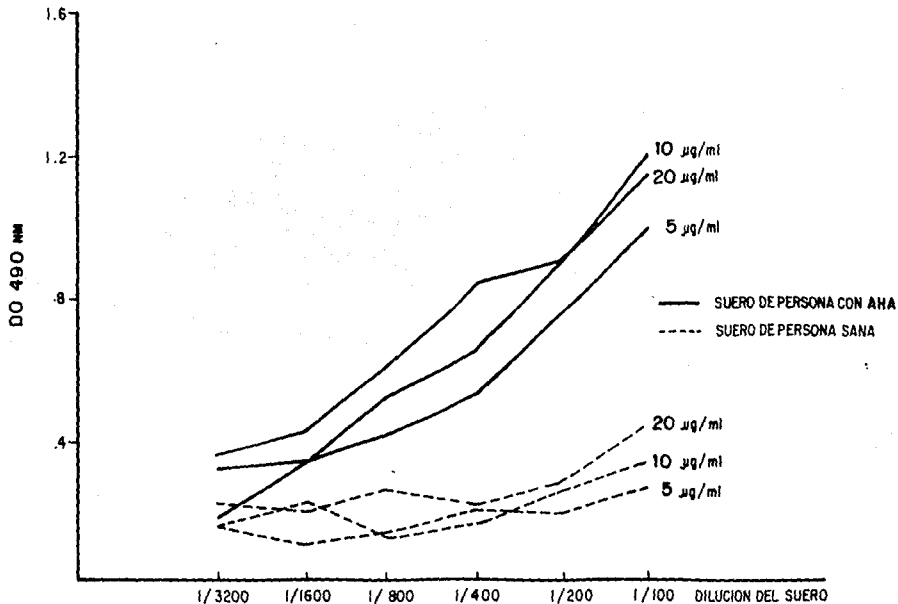


FIGURA 8:
ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA PARA LA LPFG DE LA CLONA L-6

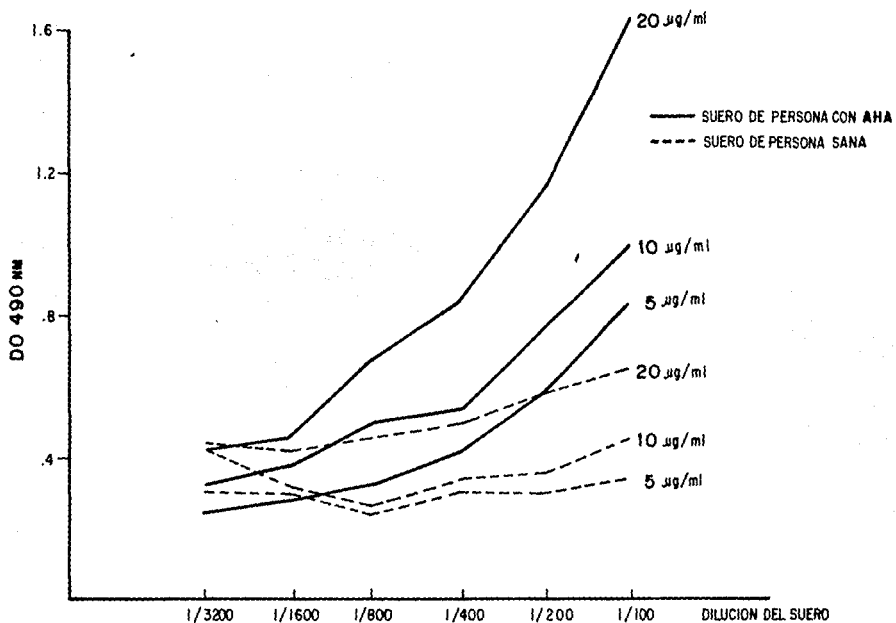
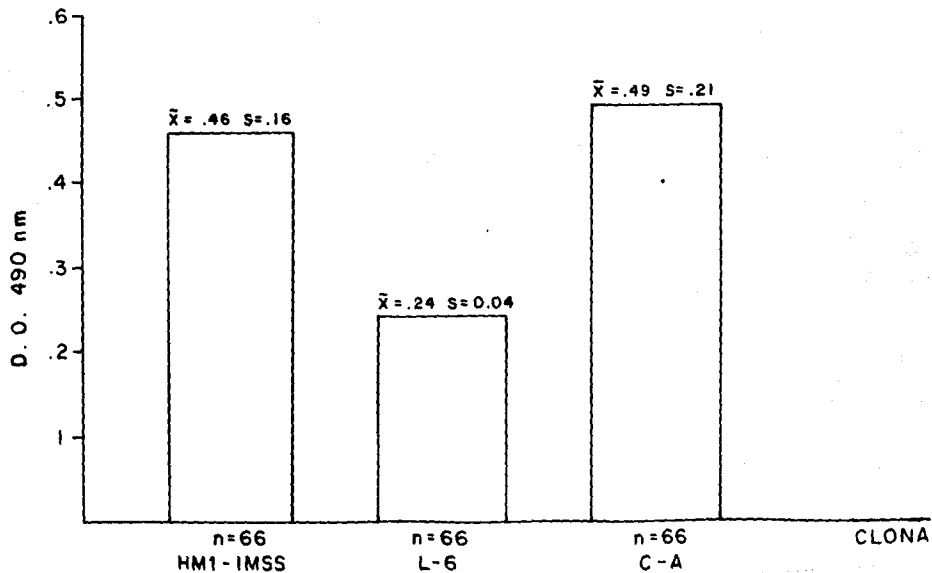


FIGURA 9:

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN PACIENTES CON
AHA CONTRA LA LPFG DE LA CEPA HM1-IMSS Y DE 2 CLONAS
DERIVADAS.



afinidad la LPFG proveniente de la clona L-6 no virulenta con una $x = .24 \pm .05$. Podemos decir que existen diferencias en el reconocimiento por anticuerpos séricos hacia la LPFG obtenida de cepas virulentas y no virulentas.

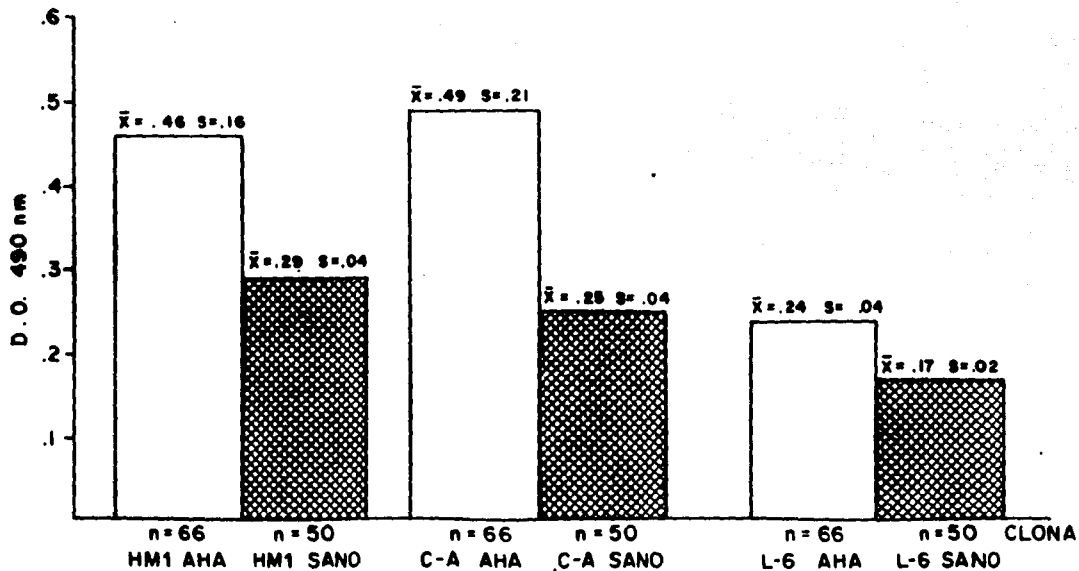
La figura 10 muestra los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos séricos anti-LPFG de pacientes con AHA comparados con testigos, los cuales consistieron en 50 sueros de personas sanas sin antecedentes de amibiasis.

Se puede observar que existen diferencias entre los resultados obtenidos con sueros de pacientes con AHA y los obtenidos con los testigos. En los testigos, el reconocimiento por es mucho menor. Las lecturas de densidad óptica para la cepa original HM1-IMSS fueron de $x = .29 \pm .04$, un valor muy semejante al obtenido con la clona A con una $x = .28 \pm .04$. Las lecturas para la clona L-6 son menores con $x = .17 \pm .02$.

Es importante hacer notar que aunque los testigos fueron personas sanas sin antecedentes aparentes de amibiasis, todos presentaron anticuerpos anti-LPFG con títulos bajos. Esto se debe probablemente a que la población estudiada son mexicanos y habla del problema de salud en México ya que según la OMS la frecuencia con que se eliminan quistes de amiba en heces varía del 5 al 55% en México. Esto es probablemente la causa de estos resultados. Sin embargo se puede diferenciar entre los anticuerpos séricos anti-amiba producidos por alguna colitis amibiana y los anticuerpos séricos de los enfermos con amibiasis invasiva como el AHA.

FIGURA 10:

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SERICOS EN PACIENTES CON AHA Y DE PERSONAS SANAS CONTRA LA LPFG DE LA CEPA HMI-IMSS Y DE 2 CLONAS DERIVADAS.



DISCUSION

La disentería amibiana es un importante problema de salud no solo en nuestro país sino en diversas regiones del mundo. Debido a su frecuencia y a sus repercusiones sociales, es importante toda investigación que conduzca a un mejor conocimiento de su agente causal, de la relación huésped-parásito o de medidas terapéuticas. Esto no ha sido fácil, ya que no se han logrado obtener antígenos amibianos totalmente puros. La LPFG es un antígeno polisacárido de superficie, heterogéneo, que ha sido parcialmente purificado. Esta, como el resto de las moléculas polisacáridicas son capaces de activar la inmunidad humoral ya que se ha demostrado que participan en la respuesta inmune en la amibiasis invasiva.

El diagnóstico ideal de la amibiasis sería uno de tipo serológico ya que es más conveniente detectar antígenos amibianos o anticuerpos dirigidos contra alguna molécula del parásito.

Hasta ahora los zimodemos, utilizados para la clasificación de las amibas, han permitido separar a las amibas en patógenas y no patógenas; los marcadores de patogenicidad están dados por la ausencia de una banda α y presencia de una banda β en el corrimiento electroforético de la fosfoglucomutasa (PGM) y bandas de corrimiento rápido de la hexoquinasa (HK) (excepto el zimodemo XIII). Con este método se logra un diagnóstico preciso diferencial entre *E. histolytica* patógena y no patógena. El problema de esta técnica, es que requiere de personal y material especializado y su costo es elevado, por lo que hace difícil que se utilice de manera rutinaria en los laboratorios clínicos. Por otro lado

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

existen evidencias de que en alguna forma la patogenicidad de la amiba (detectada por los zimodemos), se expresa en la superficie del trofozoito; así se encontró por primer vez que las cepas patógenas de *E. histolytica*, en contraste con las no patógenas, pueden resistir a la lisis por el suero humano normal (36), a pesar de que ambas activan el complemento (35). Esta lisis por el suero humano es mediada principalmente por la activación del complemento por la vía alterna, la cual generalmente esta asociada a la presencia de moléculas polisacarídicas. Probablemente haya diferencias de composición, en los azúcares constitutivos de algunas moléculas polisacarídicas de superficie de los diferentes zimodemos, lo que hace que haya diferencias en la resistencia a la lisis por complemento de los diferentes zimodemos. Para comprobar esta hipótesis, lo ideal sería obtener de zimodemos patógeno y no patógenos moléculas polisacarídicas tipo LPFG y demostrar que hay diferencias en la composición química de sus polisacáridos. Si esto resultara cierto, sería posible hacer una clasificación serológica de las diferentes cepas amibianas.

Para demostrar en parte esta hipótesis y al no tener un zimodemo no patógeno axenizado, se realizó el presente trabajo donde se extrajo LPFG de trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS y de dos clonas derivadas de ella: L-6, no virulenta y C-A, virulenta. Ambas clonas mantuvieron el mismo zimodemo II (patógeno) de la cepa original HM1:IMSS. La concentración de azúcares fué similar entre la cepa original HM1:IMSS y la clona A a diferencia de la clona L-6 la cual presentó una concentración mayor de azúcares. El corrimiento electroforético en SDS-PAGE revelado con

azul de Coomassie mostró bandas protéicas comunes entre clonas virulentas y no virulentas y otras no compartidas entre ellas. El corrimiento electroforético en SDS-PAGE revelado con nitrato de plata mostró un "barrido" semejante entre la cepa y clonas estudiadas.

Por otro lado se hizo el ensayo serológico comparativo utilizando sueros de personas normales y sueros de pacientes con AHA, por la técnica de ELISA, usando como antígeno la LPFG de la cepa y clonas. Los resultados demostraron que los títulos hacia la LPFG de la cepa original y de la clona C-A eran altos en los pacientes con AHA con respecto a los sueros normales; mientras que los títulos hacia la LPFG de la clona L-6, fueron bajos en los pacientes con AHA y semejantes a los testigos negativos. Probablemente las diferencias encontradas en el reconocimiento de los anticuerpos séricos entre los pacientes con AHA se deba al control genético de la respuesta inmune la cual está dada por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (HLA). Esto se ha demostrado con los experimentos en ratones (H2) y en el humano por la predisposición genética a las enfermedades dada por el HLA.

El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza de dos vías para muestras independientes y prueba de T de Student. Se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos entre virulentas y no virulentas con una $p < .001$.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que pueden existir diferencias en la conformación o en la posición de los azúcares que constituyen los polisacáridos (LPFG) de la clona virulenta C A y la no virulenta L-6. Esto nos hace pensar en la factibilidad de una futura clasificación de las cepas amibianas, basándose en la composición de los polisacáridos de superficie, semejante a la de Kauffman y White para las bacterias Gram-negativas (19).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acosta, G., Barranco, C., Isibasi, A. y col. Excreción de anticuerpos de clase IgA específicos anti*Amiba* en billis de ratas inmunizadas con trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cultivados en medio axénico. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1982; 13 (Supl. 3): 255.
- 2.- Acosta, G., Torres, E., Isibasi, A. y col. Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en muestras de calostro humano. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1986; 17 (Supl.): 291.
- 3.- Aley, S.B., Scott, W.A. y Cohn, Z.A. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 1980; 152: 391.
- 4.- Aust-Kettis, A. y Sundqvist, K.G. Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. I. Capping and endocytosis: Influence of inhibiting and accelerating factors; variation on the expression of surface antigens. Can. J. Immunol., 1978; 71: 35.
- 5.- Beltrán, F., Biagi, F., Ortega, P. L. y col. Observaciones sobre la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmovilización de *Entamoeba histolytica*. Rev. Gast. (Méx), 1965; 30: 491.
- 6.- Biagi, F. Parasitología. Ed. Mundo Científico. México, 1975.
- 7.- Calderon, J., Muñoz, M.L. y Acosta, H.M. Surface redistribution and release of antibody induced caps in *Entamoeba histolytica*. Exp. Med. 1980; 151: 184.
- 8.- Campos, R., Barranco, C., Isibasi, A. y col. Células plasmáticas anti*Amiba* en sangre periférica de pacientes con absceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1986; 17 (Supl.): 303.
- 9.- Cruz, M.S. Inmunuquímica de un antígeno de naturaleza polisacáridica de la superficie de *Entamoeba histolytica*. Tesis del Instituto Politécnico Nacional. México 1988.
- 10.- Diamond, L.S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: Progress and problems. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1980; 11 (Supl.1): 47.
- 11.- Diamond, L.S., Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 1978; 72: 431.

- 12.- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. y col. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956; 28: 350.
- 13.- Faust. *Parasitología Clínica*. Ed. Salvat. 1a edición. México, 1979.
- 14.- García Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y col. Aislamiento de clones de *Entamoeba histolytica* deficientes en adhesión a eritocitos humanos. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1982; 13 (Supl. 3): 129.
- 15.- Gutiérrez, G. Epidemiología y control de la amebiasis en México. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1986; 17 (Supl. 1): 375.
- 16.- Huidt, G., Davies, P., Allison, A.C. y Schorlemmer, H. U. Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature*, 1979; 277: 214.
- 17.- Isibasi, A., Cruz, M.S., Ramírez, A. y col. Inmunológica de una lipopeptidofosfoligiana extraída de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9 cultivados en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*, 1982; 13 (Supl. 3): 51.
- 18.- Isibasi, A., Cruz, M.S., Ramírez, A. y col. Localización en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de una lipopeptidofosfoligiana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*, 1982; 13 (Supl. 3): 57.
- 19.- Kauffmann, F. *Classification of bacterial*. 1st edition, 1975. Dinamarca.
- 20.- Korn, E.D., Dearborn, D.G. y Wright, P. Lipophosphoglycan of plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoebae and identification of water-soluble product of acid hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 3335.
- 21.- Kotcher, E., Miranda, M. y García de Salgado, V. Correlation of clinical, parasitological and serological data of individuals infected with *Entamoeba histolytica*. *Gastroenterology*, 1970; 58: 336.
- 22.- Kretschmer, R. *Immunology of Amebiasis*. Amebiasis. Elsevier Science publishers B.V. 1986.
- 23.- Krupp, I.M. Immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1966; 15: 849.
- 24.- Levine, N.D. y col. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 1980; 27: 37.

25.- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y col. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951; 3: 73.

26.- Martínez Palomo, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, Ltd., Gran Bretaña. 1982.

27.- Martínez Báez, M. Historia de la amibiasis. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis. (México), 1976: 42.

28.- Martínez Palomo, A., González Robles, A. y De la Torre, M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalin A. Nature New Biology. 1973; 249: 186.

29.- Mattern, C.F., Keister, D.B. y Xlatovitz, P.C. Virulence of *Entamoeba histolytica* upon continuous axenic cultivation. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1982; 13 (Supl. 3): 185.

30.- Miller, J.H., Swartawelder, J.C. y Deas, J.E. An electronic microscopic study of *Entamoeba histolytica*. Parasitol., 1961; 45: 577.

31.- Orozco, M.E., Martínez Palomo, A., González, A. y col. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales; relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1982; 13 (Supl.3): 159.

32.- Orozco, M.E., Guarneros, G., Martínez, A. Clonas de *Entamoeba histolytica* deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Invest. Med. (Méx.), 1982; 13 (Supl. 3): 137.

33.- Ortiz-Ortiz, L., Capin, M.R., Sepúlveda, B. y col. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. Clin. Exp. Immunol. 1978; 34: 10.

34.- Parkhouse, M., Cid, M.E. y Calderon, J. Identificación de antígenos de membrana de *Entamoeba histolytica* con anticuerpos de pacientes con amibiasis. Arch. Invest. Med. (Méx.) 1978; 9 (Supl. 1): 339.

35.- Reed, S.L., Curd, J.G., Gigli, I. y col. Activation of complement by pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Immunol., 1986; 136: 2265.

36.- Reed, S.L., Sargeant, P.G. y Braude, A.I. Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Trans. Roy. Soc. Med. Hyg., 1983; 77: 248.

- 37.- Robinson, G.L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1968; 62 (2):265.
- 38.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Bhojhani, R. y col. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a rural and urban area of México. A pilot survey II. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982; 76: 208.
- 39.- Sargeant, P.G. y Williams, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic intestinal amoebae of man. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1979; 73: 225.
- 40.- Sargeant, P.G., Williams, J.E. y Grene, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978; 72: 122.
- 41.- Sargeant, P.G., Williams, J.E., Bhojhani, R. y col. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in México city. A pilot survey I. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.; 74: 653.
- 42.- Thompson, P.E., Graedel, S.K., Schneider, C.R. y col. Preparation and evaluation of standardized antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. Bull. W. H. O. 1968; 34: 349.
- 43.- Weber, K. y Osborns, M. The reliability of molecular weight determination by SDS gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 1969; 244: 4406.
- 44.- Weir, D. M. Immunochemistry. Vol. I. Blackwell Scientific publications. 4ª edición, 1986. Gran Bretaña.
- 45.- Westphal, O., Jann, A.K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure. Methods in carbohydrate Chemistry. 1985; 5: 83.
- 46.- Wittner, M. y Rosenbaum, R.M. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. Studies of amebae from axenic cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1979; 19: 755.
- 47.- World Health Organization. Amoebiasis. World Health Org. Teach. Report Series, No. 421.