



129
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE
SUEROS PROVENIENTES DE PACIENTES
CON AMIBIASIS INTESTINAL AGUDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OLIVIA SOSA FRIAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Indice General

Pág.

Introducción

1

Objetivos

3

Hipótesis

4

Generalidades:

Amibiasis

5

Epidemiología

6

Patología de la Amibiasis

Intestinal

8

Respuesta Inmune en la

Amibiasis

9

Material y Métodos

13

Resultados

19

Discusión de Resultados

32

Conclusiones

34

Bibliografía

35

I N T R O D U C C I O N .

La amibiasis es una infección intestinal producida por Entamoeba histolytica con una amplia distribución mundial, se ha observado que la frecuencia de esta enfermedad es mayor en regiones tropicales y subtropicales y es considerada como la segunda causa de muerte dentro de las parasitosis a nivel mundial.

En nuestro país guarda una relación directa con las condiciones sanitarias inadecuadas, así como el bajo nivel socioeconómico.

Se considera que la fuente de infección y diseminación de la enfermedad es el hombre mismo, ya que se transmite de persona a persona, ya sea por el fecalismo al aire libre, la coprofagia, por contacto con alimentos contaminados y agua, etc.

La información que se tiene al respecto de la relación huésped-parásito es muy amplia y controvertida, sin embargo existen evidencias de que el título de anticuerpos no correlaciona con el estado clínico del paciente, también es cierto que los trofozoitos presentan varios mecanismos de evasión a la respuesta inmune humoral del hospedero, por lo que parece ser que la respuesta de anticuerpos que aparece en la amibiasis invasora no resulta ser efectiva en la protección contra la enfermedad, pudiendo -

ser la presencia de estos anticuerpos sólo un indicador de la infección invasora de Entamoeba histolytica.

Dada la alta incidencia de la amebiasis en -- nuestro país y las ineficientes pruebas de diagnóstico, el presente trabajo plantea la posibilidad de detectar fracciones antigénicas, las cuales solas o combinadas pudieran ser buenas candidatas para el establecimiento de pruebas diagnósticas o epidemiológicas.

O B J E T I V O S .

Determinar la frecuencia de reconocimiento antigénico en sueros de pacientes con amebiasis intestinal aguda, comparativamente con el reconocimiento antigénico en una población de individuos control.

Identificar la o las fracciones del antígeno de Entamoeba histolytica que son reconocidas a una mayor frecuencia por los sueros de los individuos estudiados.

R I P O T E S I S .

El análisis de las frecuencias de reconocimiento de fracciones antigénicas de Entamoeba histolytica, por sueros de pacientes con amibiasis intestinal aguda, -- permitirá la detección de fracciones antigénicas útiles en el diagnóstico y epidemiología de esta enfermedad.

GENERALIDADES

Amibiasis.

La amibiasis ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la condición de albergar a Entamoeba histolytica con o sin manifestaciones clínicas (69). Desde el punto de vista clínico, se le ha clasificado en amibiasis sintomática y asintomática o estado de portador. En el primer caso se le subdivide a su vez en amibiasis intestinal y extraintestinal. Dentro de los cuadros clínicos a nivel intestinal se le clasifica como: amibiasis diarréico-disintérica (benigna), colitis fulminante, ameboma y apendicitis aguda (formas graves) (30,62,68).

Al reunirse el comité de expertos en amibiasis, diferenciaron a la amibiasis en dos: amibiasis invasora o sintomática; la cual presenta signos y síntomas de amibiasis, con presencia de trofozoítos hematófagos en las evacuaciones, alteraciones de las características de la mucosa intestinal (endoscopia) y presencia de anticuerpos séricos anti-amibianos. La amibiasis asintomática, no presenta alteraciones endoscópicas, ni trofozoítos hematófagos en las evacuaciones y los títulos de anticuerpos anti-amibianos son muy bajos o no existen (60,70).

La amiba se ha clasificado dentro del reino Proc-

tista, subreino Protozoa, phylum Sarcocystophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, suborden Tubulina y género Entamoeba (35), este protozoario es un organismo unicelular que tiene movilidad mediante la emisión de pseudópodos, se reproduce por fisión binaria, la forma vegetativa del parásito es el trofozoito, la forma infectante y de resistencia es el quiste (57).

Epidemiología.

Los datos aportados por la OMS, señalan que la amibiasis constituye la segunda causa de muerte dentro de las parasitosis a nivel mundial, por lo que se estima que 480 millones de individuos albergan en el intestino a este protozoario, de los cuales 48 millones presentan invasión a la mucosa intestinal o al hígado. La distribución de la infección luminal, ha sido determinada mediante la presencia de quistes en heces, de tal manera que la infección asintomática puede afectar desde el 5% al 50% de la población (70). En México probablemente el 27% de la población alberga a dicho parásito (68).

La frecuencia de esta enfermedad se ha observado que es mayor en regiones tropicales y subtropicales, aunque existe una gran discrepancia en los datos de frecuencia de la amibiasis, debida en gran parte a los métodos empleados para el diagnóstico y el escaso número de exámenes realizados en cada caso (8). El hallazgo

de quistes en heces de Entamoeba histolytica, va de 0% al 55%, la variabilidad de la frecuencia reportada puede atribuirse a diversas razones tales como, el error técnico en la identificación del quiste y a la baja sensibilidad de las técnicas coproparasitológicas (CPS). De los individuos infectados, la mayoría se encuentran como portadores asintomáticos y de ellos tan sólo la minoría enferma. Los datos de prevalencia de la amibiasis, en cuadros de diarrea aguda en nuestro país, son muy variables (33,44), sin embargo, estudios bien controlados indican que dentro de los cuadros diarréicos tan sólo el 1% ó 2% presentan como agente etiológico a este parásito (23,28,33), estas cifras son muy estimativas, pero otros investigadores consideran que las cifras se encuentran entre el 9% y 14% (14,44,48), por lo tanto la tasa de infección no es un indicador fiel para juzgar la frecuencia de la amibiasis en una zona geográfica, ya que el único índice seguro para evaluar la prevalencia de la amibiasis es el número de casos de absceso hepático amibiano (AHA) (12,39).

En México la amibiasis se considera un problema de Salud Pública, ya que la infección se encuentra extendida prácticamente en todo el país y en forma independiente de las condiciones climáticas, se ha visto que esta enfermedad guarda relación estrecha con las condiciones sanitarias, así como el bajo nivel socioeconómico de la población (9,46,68), por lo tanto no es extraño que los índices más altos de la amibiasis invasora a nivel mundial se presenten en México (16). Las principales causas de muerte en la amibiasis a nivel

mundial son el AHA y la colitis fulminante. La mortalidad en el AHA se encuentran entre el 2% y 10% y en la colitis fulminante es del 70% (70); en nuestro país la incidencia del AHA es del 2.1% (22). Con la introducción de la emetina en 1913, las cifras en la mortalidad se han visto disminuídas y en la actualidad dichas cifras han continuado decendiendo, gracias al uso del metronidazol y otros compuestos derivados (22,40), este decremento se ha observado principalmente en las zonas urbanas (22).

Se considera que la fuente de infección y diseminación de la enfermedad es el hombre mismo, ya que el parásito se transmite de persona a persona y la vía es el contacto ano-mano-boca, así como por el fecalismo al aire libre, la coprofagia y el contacto con objetos y agua contaminada o bien por transmisores biológicos (65, 68).

Patología de la amibiasis intestinal.

La variabilidad del cuadro clínico de la amibiasis, puede deberse a la existencia de una sola especie de amibas patógenas que expresan diferentes grados de virulencia o, acaso, a la existencia de cepas patógenas y no patógenas (41).

El órgano blanco en la amibiasis es el colon, en cuya luz los trofozoítos pueden invadir la mucosa y producir ulceraciones de la pared intestinal, ocasionando cuadros de disentería amibiana o bien, un daño muy -

localizado, sin manifestaciones clínicas de la enfermedad. Algunas veces las amibas alcanzan los capilares, - transportándose con la corriente sanguínea (circulación portal), como resultado de las lesiones ulcerativas en el intestino. Sin embargo puede darse en otros - órganos la formación del absceso amibiano (38,40).

En nuestro país se han podido establecer cuatro - formas clínicas fundamentales de la amibiasis intestinal: a) diarreica-disentérica; se presentan evacuaciones mucosanguinolentas, cólico, pujo y tenesmo. La mayoría de los casos sólo presentan diarrea con moco y -- sangre y en algunos únicamente diarrea; b) colitis fulminante, es la complicación más grave, todas las capas -- del colon presentan necrosis, generalmente con perforaciones múltiples; c) apendicitis amibiana, puede manifestarse como un cuadro común de apendicitis y es debida a la invasión de este órgano por la Entamoeba histolytica; d) ameboma, se describe generalmente como masa palpable y dolorosa en enfermos que sufren colitis amibia aguda, se localiza primordialmente en el rectosigmoides (15,24,30,56,68).

Respuesta inmune en la amibiasis.

Los eventos que conllevan al establecimiento y desarrollo de la enfermedad invasora son: la adherencia al moco colónico, destrucción de las barreras intestinales de protección por secreción de enzimas proteolíticas o por toxinas. Lisis de células epiteliales intestinales y células inflamatorias del hospedero y resis-

tencia a los mecanismos inmunes del hospedero (40,56).

La información que se tiene al respecto de la relación amiba-hospedero, es muy amplia y controvertida, ya que los trofozoitos de Entamoeba histolytica presentan varios mecanismos de defensa como son: agregar, ingerir y desprender anticuerpos anti-amiba que se unen a su superficie; por ello la respuesta inmune humoral del hospedero, no parece ser efectiva en la protección en contra de la enfermedad (6,7).

En estudios seroepidemiológicos, se ha encontrado que entre el 81% y el 100% de los pacientes con colitis amibiana invasora o AHA, desarrollan anticuerpos séricos de clase IgG, que probablemente corresponden a la subclase IgG 2 (61), aunque también se ha encontrado la presencia de otras inmunoglobulinas como la IgM (1,10, 20,30,37,51,58,66). Por otro lado se han encontrado anticuerpos anti-amibianos de la clase IgA en saliva de individuos infectados así como en calostro (5,11, 19); la presencia de IgG se ha relacionado con la amibiasis invasora y aparentemente no juega un papel importante en los mecanismos de protección (10,37,66,69). En la amibiasis invasora, los anticuerpos específicos circulantes persisten en el suero por meses o años después del tratamiento, en la enfermedad subclínica es poco probable que aparezca este tipo de respuesta (69); generalmente los títulos más elevados se presentan en las etapas iniciales de la enfermedad invasora (25,27, 29,50). Hay evidencias que indican que el título de anticuerpos no correlaciona con el estado clínico del pa

ciente (61,66).

Tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células son ineficientes en la amibiasis invasora. Las observaciones clínicas indican que la inmunidad protectora desarrollada previene la recurrencia del AHA. La respuesta inmune humoral no parece limitar la infección invasora o proveer de una inmunidad protectora; anticuerpos y complemento pueden impedir inicialmente la invasión en lesiones amibianas o pueden trabajar conjuntamente con procesos celulares inmunes en trastornos severos. Existen evidencias que indican que el componente aferente y eferente de la respuesta inmunitaria mediada por células se desarrolla después de la amibiasis invasora y puede representar la principal defensa en contra del parásito por parte del hospedero (40,58).

La detección de quistes o trofozoitos de Entamoeba histolytica en materia fecal o en sitios de localización extraintestinal sigue siendo la mejor forma de diagnosticar la enfermedad, debido a las complicaciones en esta identificación, se han buscado algunos ensayos inmunológicos encaminados a la detección de anticuerpos o antígenos derivados de la amiba, las técnicas empleadas en la búsqueda de anticuerpos anti-amiba, como son: ELISA, hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia indirecta, han empleado en su gran mayoría antígeno total de amiba, siendo éste muy heterogéneo en sus características por la forma de su extracción. Otro inconveniente es que muchos investigadores

trabajan con diversos tipos o fracciones del antígeno, lo que impide hacer una comparación entre los resultados obtenidos por los diferentes grupos (2,7,21,25,26, 27,28,63).

En estudios epidemiológicos se han empleado como herramienta la contraimmunoelectroforesis y la hemaglutinación pasiva, pero dada la discrepancia en los datos que arrojan estas dos técnicas, se ha intentado utilizar la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western blot), para determinar la o las fracciones antigénicas que son reconocidas por los sueros de pacientes con amibiasis (3,4,18,42,43,45,47,49,52,53,55,57,59,64). Se ha demostrado que este tipo de análisis es de gran utilidad en otras parasitosis (34).

MATERIAL Y METODOS

Individuos estudiados.

Se estudiaron 66 individuos adultos de ambos sexos, en edades entre los 17 y 54 años de edad; el primer grupo (21 individuos) presentó un cuadro diarréico con dos semanas de evolución y exámen coproparasitológico positivo para Entamoeba histolytica (Faust) (17). El segundo (45) se empleó como grupo control, no presentaron diarrea en el último mes y su exámen coproparasitológico fue negativo.

Los sueros se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

Preparación del antígeno.

El antígeno se preparó a partir de un cultivo axénico de trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HMI:IMSS en fase logarítmica de crecimiento. El medio utilizado fue el TYI-S-33 descrito por Diamond (13). Las botellas de cultivo de 50 ml (Costar, Cambridge, USA) se colocaron en baño de hielo, una vez desprendidos los trofozoítos, se agitaron las botellas, el contenido se transfirió a tubos cónicos para 50 ml (Costar); los trofozoítos se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos 19 mM, pH 7.2, fría (P.D.) y se centrifugaron a 200xg durante 10 min. a

4°C en una centrifuga refrigerada (Beckman.modelo - TJ-6); al botón se le agregaron los siguientes inhibidores de proteasas: 0.05 ml de Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 50 mM y 0.04 ml de p-hidróxi-mercuribenzoato (PHMB) 10 mM (Sigma Chemical Co. St. Louis - Mo., USA) y 5 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, por cada 10⁸ trofozoítos, esta suspensión se homogeneizó en un homogenizador manual en un baño de hielo (200 veces). El homogenizado se centrifugó a 8000xg durante 30 min. a 4°C en una centrifuga refrigerada (Sorvall, modelo - RC-5B, Du Pont Instruments, Boston Ma., USA; rotor modelo SS-34). Se separó el sobrenadante, almacenándolo en alícuotas de 0.5 ml a -40°C, previa determinación de proteínas por el método de Lowry (36), a esta fracción se le denominó antígeno soluble. Al paquete restante denominado antígeno insoluble, también se le determinó la concentración proteica y se le agregaron los inhibidores de proteasas, almacenándose en alícuotas de 0.5 ml y a -40°C.

Inmunolectroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli (31), utilizando un aparato para electroforesis vertical (LKB Broma, modelo 2001, HSI Sn. Francisco Ca., USA), el gel resolutor se preparó al 10% y el concentrador al 5%. El gel concentrador se corrió a 18 mA, hasta que el frente de corrimiento emigró al fondo del gel (aproximadamente 5 hrs.). Se emplearon 0.12 mg de la fracción insoluble del antígeno y 0.01 ml de -

marcadores de bajo peso molecular para electroforesis en poliacrilamida-SDS, por carril. Ambas muestras se trataron con una solución amortiguadora en condiciones no reductoras, el gel se tiñió con azul de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Richmond Ca., USA).

Inmuno-electrotransferencia.

Las fracciones antigénicas separadas en el gel de poliacrilamida-SDS, se transfirieron al papel de nitrocelulosa con poro 0.45 micras (Schleicher & Schuell, Keene N.H., USA) de acuerdo a la técnica descrita por Towbin (67). Para ello se utilizó fibra Scotch Brite 3M, sobre la cual se colocó una hoja de papel filtro, el gel, el papel de nitrocelulosa prehidratado en agua destilada durante 15 min. y una hoja de papel filtro, de esta manera y con ayuda de los soportes se fijaron y se colocaron en la cámara de electrotransferencia (TE Serie Trasphor Electrophoresis Unit, Sn. Francisco, USA) llena con una solución amortiguadora de Tris-Glicina 0.2 M, pH 8.3 y metanol al 12% con el papel en dirección al ánodo; la transferencia se realizó a 100 volts durante 90 min. Una vez concluida, el papel se tiñió con una solución temporal de negro amido al 0.01% en ácido acético al 0.5% (32), durante 2 ó 3 min. con el objeto de verificar la calidad de la misma. A continuación se destiñó el papel con agua destilada, se lavó con una solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4 y 0.02% de NaN_3 (TBS), durante 5 min., el papel se cortó en tiras

de 2 ó 3 mm de ancho y se colocaron en las placas - (Transtar-96, Costar), se bloquearon con TBS y leche - descremada al 5% (Sveltes, Nestlé, Coatepec Ver., Méxi-- co) a 4°C durante 12 hrs. en agitación suave. Se hicie- ron diluciones 1:5 con los sueros control y los del grupo de pacientes, las tiras de papel se incubaron - con 1 ml de la dilución de los sueros a 4°C durante - 12 hrs. en agitación suave. Al término del tiempo, se - lavaron con TBS (5 min.), se incubaron en agitación - suave y a temperatura ambiente (2 hrs.) con anti-IgG, IgA ó IgM conjugadas a peroxidasas (Zymed lab. Inc. - Sn. Francisco Ca., USA). Las diluciones utilizadas en - el caso de la anti-IgG e IgM fue de 1:1000 y para la anti-IgA de 1:1500, en todos los casos las diluciones - fueron hechas en TBS y leche descremada al 5%.

Las tiras se lavaron tres veces (10 min.) y una - vez con una solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, pH 6.8 (TB) durante 10 min. Posteriormente, para eviden- ciar la reacción antígeno-anticuerpo se agregó el sus- trato, el cual consistió en un volumen de 4-cloro-1- - naftol al 0.3% en metanol y cuatro volúmenes de TB , adicionado con 0.33 ml de H₂O₂ por ml de mezcla, se - dejó reaccionar por espacio de 5 a 30 min. bloqueando la reacción con abundante agua destilada.

Determinación de pesos moleculares.

Los marcadores de peso molecular conocido, como - son: la Fosforilasa b, Albúmina sérica bovina, Ovoalbú-

mina, Anhidrasa carbónica, Inhibidor de tripsina, Lisozima (Bio-Rad), se separaron en geles de poliacrilamida-SDS junto con el antígeno. A partir del patrón de corrimiento de estas proteínas se calculó el peso molecular de las diferentes fracciones antigénicas.

Al graficar el peso molecular, contra la movilidad electroforética expresada en r_f (distancia que migra la proteína/ distancia total disponible para migrar) se obtuvo una curva, al efectuarse la regresión lineal se determinó que la expresión matemática de la curva que cruzó a un mayor número de puntos fue: $y = a + b x$ donde $a =$ ordenada al origen, $b =$ pendiente, $x = r_f$. El antilogaritmo de la ecuación correspondió al peso molecular de las diferentes proteínas.

Determinación de frecuencias de reconocimiento.

La frecuencia de reconocimiento, es la frecuencia con que cada fracción antigénica de Entamoeba histolytica transferida al papel de nitrocelulosa, reacciona con el suero de individuos con amibiasis intestinal aguda o con el suero del grupo de individuos control. El graficar estas frecuencias permite discriminar entre el significado inmunológico que pudiera tener una determinada fracción antigénica en las condiciones estudiadas.

Los valores de frecuencia de reconocimiento para

cada fracción representada en la transferencia, se obtuvo a partir de un patrón que incluye todas las fracciones antigénicas de Entamoeba histolytica que aparecen por lo menos una vez en el papel cuando se hace reacción con cada uno de los sueros.

Las bandas fueron ordenadas por peso molecular (Tabla No.1) y se determinó la presencia o ausencia de éstas después de reaccionar con cada muestra sérica estudiada.

Los valores en la gráfica (Fig. 5,6A y 6B) corresponden a la suma de todos los sueros de uno de los dos grupos estudiados, que reaccionaron con una fracción en particular, dividido entre el total de sueros pertenecientes a un mismo grupo, el resultado se encuentra expresado como valor porcentual.

R E S U L T A D O S .

En el Western blot de las fracciones antigénicas del extracto crudo de Entamoeba histolytica, que fueron previamente separadas en el gel de poliacrilamida SDS al 10%, se observaron 53 bandas definidas con pesos moleculares entre 148 y 8 Kd (Fig.1).

La reactividad de los sueros de los dos grupos - de individuos estudiados que se muestran en la Fig.2, 3 y 4, en ambos casos se observó una gran heterogeneidad, incluso entre los miembros de un mismo grupo, aunque la reactividad con los sueros controles fue menor que en los de pacientes con amibiasis intestinal aguda.

Una de las cosas que saltan a la vista es que en la Fig. 2,3 y 4 se observa una mayor reactividad con anticuerpos de la clase IgG que con IgA ó IgM. La lista de las bandas obtenidas con sus respectivos pesos moleculares aparecen en las tablas No.1, en las Tablas No. 3 y 4 se muestran las bandas que fueron reconocidas sólo por los sueros control y sólo por los sueros de pacientes con amibiasis intestinal aguda (A.I.A.), las reconocidas por ambos sueros se muestran en la Fig. 5.

Inmunográfica.

Se empleó la gráfica de frecuencia simple para -

comparar las dos poblaciones estudiadas, sueros de pacientes con amibiasis intestinal aguda y sueros controles (Fig. 5, 6A y 6B). Este tipo de gráfica nos permite la identificación más fácil de las fracciones antigénicas que reaccionan únicamente con los sueros de pacientes, éstas se graficaron sobre el eje "X", las que reaccionaron sólo con los sueros control se graficaron sobre el eje de la "Y" y los que reaccionaron con ambos sueros se localizaron entre ambos ejes (Fig. 5, 6A y 6B).

Los valores más altos obtenidos con respecto a la frecuencia de reconocimiento, fueron para IgG que provenían de los sueros de pacientes (Fig. 5), en este caso las bandas 6.7, 6.8, 6.4 y 4.1, cuyo peso molecular es de: 24, 23, 26 y 51 Kd respectivamente, fueron reconocidos a una frecuencia de 65% y 60%. Sin embargo las bandas 6.8, 6.4 y 4.1 fueron reconocidas a una frecuencia de 10, 12 y 10% respectivamente por los sueros control. Una banda más, la cual puede ser interesante es la 3.4 (62 Kd), ésta fue reconocida al 52% por los sueros de pacientes y sólo en un 2% por los sueros control. Un gran número de fracciones antigénicas fueron reconocidas por el suero de ambos. Finalmente un pequeño número de bandas fueron reconocidas exclusivamente por los sueros control (Tabla No. 4). Con respecto a IgA, IgM las frecuencias de reconocimiento fueron menores al 40% (Fig. 6A y 6B). Ya que los valores de frecuencia de reconocimiento antigénico encontrado en el grupo de pacientes no fue mayor del 65%, se probaron varias combinaciones de bandas reconocidas por arriba

del 50% en el grupo de pacientes. Este tipo de análisis reveló que la combinación de las bandas 3.4, 4.1 y 6.7 eleva los valores de frecuencia en los pacientes_ a 91.4%, manteniéndose en el 10% para la población con trol.

T A B L A N O . 1

PESO MOLECULAR DE LAS FRACCIONES ANTIGENICAS DE *Entamoeba histolytica*

0.4 - 147.865	2.8 - 73.952	5.9 - 30.204
0.5 - 143.865	3.0 - 69.848	6.0 - 29.309
0.6 - 139.544	3.1 - 67.781	6.2 - 27.683
0.7 - 135.569	3.4 - 62.124	6.4 - 26.147
0.8 - 131.708	3.5 - 60.285	6.5 - 25.373
1.0 - 124.313	3.6 - 58.677	6.7 - 23.965
1.2 - 117.333	3.7 - 56.940	6.8 - 23.255
1.3 - 113.992	4.0 - 52.188	7.0 - 21.965
1.4 - 110.617	4.1 - 50.796	7.1 - 21.314
1.6 - 104.479	4.2 - 49.292	7.4 - 19.536
1.7 - 101.691	4.3 - 47.977	7.6 - 18.452
1.9 - 95.760	4.6 - 43.973	7.8 - 17.428
2.0 - 93.305	4.8 - 41.408	8.1 - 15.973
2.1 - 90.446	4.9 - 40.303	8.6 - 13.828
2.2 - 87.768	5.1 - 38.067	8.9 - 12.674
2.4 - 82.898	5.3 - 35.046	9.8 - 9.787
2.5 - 80.686	5.5 - 33.857	10.4 - 8.222
2.6 - 78.297	5.7 - 31.978	

* PESO MOLECULAR EXPRESADO EN KILODALTONES (KD).

T A B L A N o . 2

ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO

FRACC.	I y C		I y A		I y H	
	CONT.**	A.I.**	CONT.	A.I.	CONT.	A.I.
0.4	0	0	0	0	0	0
0.5	0	22	0	0	3	9
0.6	0	17	0	0	0	0
0.7	0	17	2	4	0	0
0.8	0	17	0	22	3	0
1.0	13	26	5	4	5	0
1.2	10	26	5	17	0	4
1.3	0	30	0	13	5	0
1.4	0	22	0	9	0	0
1.6	0	22	0	17	0	0
1.7	5	22	7	0	0	0
1.9	0	17	0	9	0	0
2.0	0	17	5	30	5	17
2.1	20	0	2	30	5	13
2.2	0	17	2	4	3	17
2.4	0	26	0	22	0	9
2.5	7	43	7	4	0	9
2.6	30	43	23	26	2	4
2.8	0	22	20	30	3	4
3.0	15	17	7	13	6	9
3.1	27	47	17	22	3	0
3.4	2	52	3	26	3	4
3.5	0	47	5	13	15	17
3.6	0	47	3	4	15	9
3.7	27	56	25	13	0	9
3.8	10	43	10	13	5	4
4.1	10	45	12	33	0	9
4.2	15	30	2	0	5	9
4.3	23	52	7	20	5	17
4.6	27	0	3	11	10	9
4.8	22	34	0	9	2	0
4.9	12	47	0	17	0	9
5.1	17	43	12	9	3	0
5.3	27	43	3	22	3	0
5.5	0	0	2	30	10	4
5.7	17	30	0	20	5	4
5.8	22	45	2	13	5	9
6.0	33	60	10	34	10	22
6.2	17	56	0	20	15	0
6.4	12	60	3	22	3	4
6.5	10	56	2	17	0	9
6.7	0	45	2	26	13	4
6.8	10	60	3	26	5	0
7.0	0	52	2	9	0	9
7.1	10	39	3	22	0	13
7.4	13	52	0	17	0	9
7.6	13	34	0	13	3	0
7.8	3	34	7	9	0	0
8.1	7	39	3	0	0	9
8.6	12	26	0	0	0	0
8.9	7	0	0	0	0	0
9.0	6	0	3	9	3	0
10.4	7	0	0	9	0	4

* LA FRECUENCIA SE ENCUENTRA EXPRESADA EN CUENTAS POR CIENTO.

** (CONT.) SUENOS CONTROL.

*** (A.I.) SUENOS DE PACIENTES CON AMIBIASIS INTESTINAL.

T A B L A N o . 3

FRACCIONES ANTIGENICAS RECONOCIDAS
 SOLO POR SUEROS CON AMIBIASIS INTESTINAL

<u>I g G</u>	<u>I g A</u>	<u>I g M</u>
0.5	0.8	1.2
0.6	1.3	2.4
0.7	1.4	4.9
0.8	1.6	5.3
1.3	2.4	6.5
1.4	4.8	7.0
1.6	4.9	7.1
1.9	5.7	7.4
2.0	6.2	
2.2	7.1	
2.4	7.6	
2.8	10.4	
6.7		

T A B L A N o . 4

FRACCIONES ANTIGENICAS RECONOCIDAS
SOLO POR SUEROS CONTROL.

<u>I g G</u>	<u>I g A</u>	<u>I g M</u>
2.1	1.7	0.8
4.6	9.8	1.0
8.9		1.3
9.8		3.1
10.4		4.8
		5.1
		6.2
		6.8
		7.6

T A B L A N O . 5

FRACCIONES ANTIGENICAS RECONOCIDAS
POR AMBOS SUEROS.

<u>I q G</u>	<u>I q A</u>	<u>I q M</u>
1.0	0.7	0.5
1.2	1.0	2.0
1.7	1.2	2.1
2.5	1.9	2.2
2.6	2.0	2.5
3.0	2.1	2.6
3.1	2.2	2.8
3.4	2.5	3.0
3.5	2.6	3.4
3.6	2.8	3.5
3.7	3.0	3.6
3.8	3.1	3.7
4.1	3.4	4.0
4.2	3.5	4.1
4.3	3.6	4.2
4.8	3.7	4.3
4.9	3.8	4.6
5.1	4.1	5.5
5.3	4.2	5.7
5.7	4.3	5.9
5.9	4.6	6.4
6.0	5.1	6.7
6.2	5.3	6.8
6.4	5.5	8.1
6.5	5.9	10.4
6.8	6.0	
7.0	6.4	
7.1	6.5	
7.4	6.7	
7.6	6.8	
7.8	7.0	
8.1	7.4	
8.6	7.8	

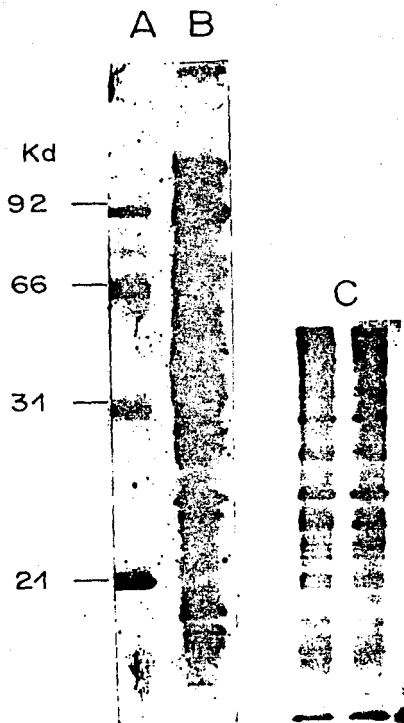


Fig. 1. Transferencia de antígenos de E. histolytica HMI:IMSS, A.Pesos moleculares, B.Antígeno, C.Electroforesis del antígeno.

I g G Sérica.

Sueros Control

Sueros con A. I.

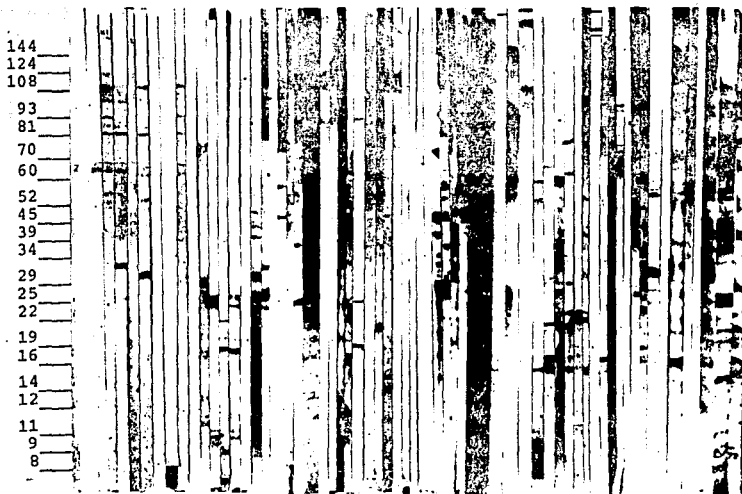


Fig. 2. Inmunoelectrotransferencia de antígeno amibiano , sueros control y con amibiasis intestinal aguda. La reacción - fue revelada con anti-IgG acoplada a peroxidasa.

I g A Sérica.

Sueros Control

Sueros con A.I.



Fig. 3 Inmunolectrotransferencia de antígeno amibiano, sueros control y con amibiasis intestinal aguda. La reacción - fue revelada con anti-IgA acoplada a peroxidasa.

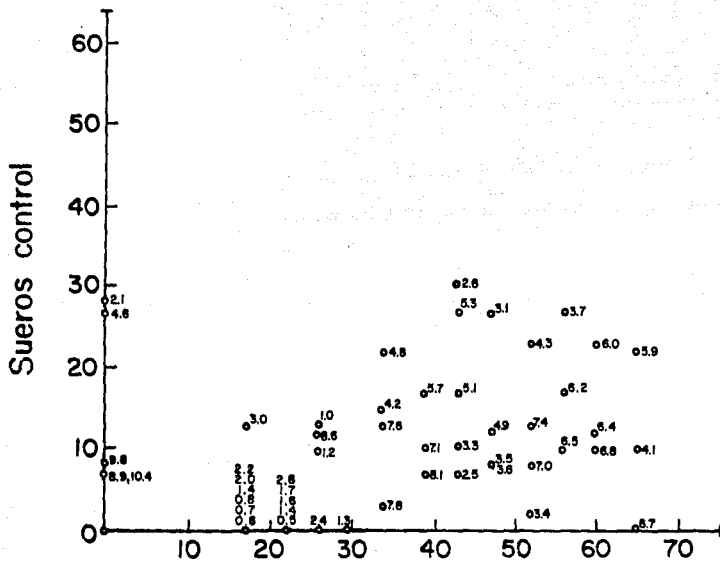
I g M Sérica.

Sueros Control

Sueros con A.I.



Fig. 4. Inmunoelctrotransferencia de antígeno amibiano, sueros control y con amibiasis intestinal aguda. La reacción - fue revelada con anti-IgM acoplada a peroxidasa.



Sueros de pacientes con amebiasis intestinal aguda

Fig. 5 Frecuencia de reconocimiento antigénico para IgG.

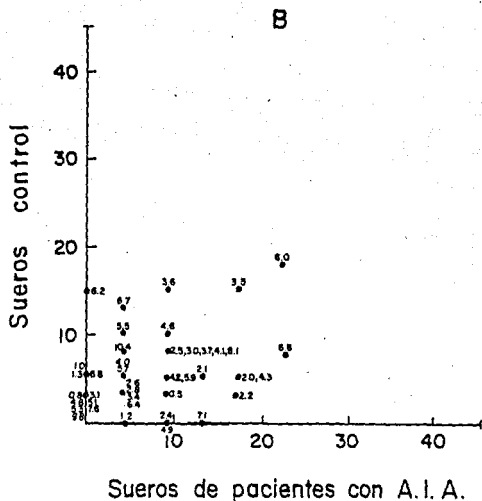
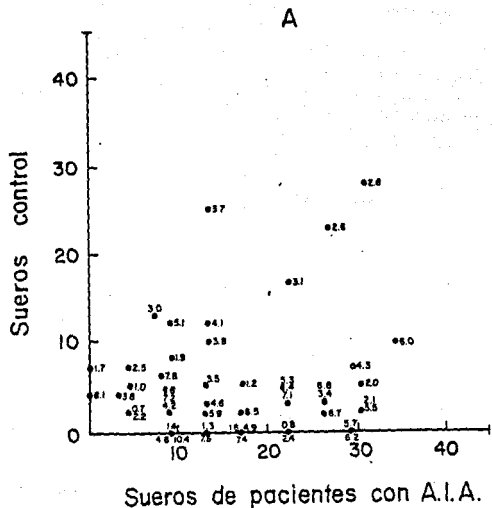


Fig. 6 Frecuencia de reconocimiento antigénico. A) Reconocimiento de IgM
B) Reconocimiento de IgG.

D I S C U S I O N .

Algunas de las moléculas amibianas asociadas con la patógenicidad, capaces de desencadenar una respuesta inmune humoral en humanos y en modelos experimentales, parecen estar en su mayoría asociadas a membranas, algunas de ellas forman parte de los factores de virulencia del parásito (43).

Sin embargo, no se conoce en que grado son reconocidas por los anticuerpos séricos de pacientes con amibiasis intestinal ó extraintestinal.

Nuestros resultados demostraron que muchas fracciones antigénicas de E. histolytica son reconocidas por el suero de los individuos controles, lo cuál no es sorprendente en áreas donde la amibiasis es endémica como en nuestro país. Se ha visto que familiares de individuos portadores del parásito o de pacientes con enfermedad amibiana, pueden tener anticuerpos séricos anti-amiba (23). Por otro lado la presencia en este protozooario de antígenos compartidos con otros parásitos intestinales, podría explicar la reactividad observada en la población control.

Los datos anteriores, resaltan la gran dificultad que existe en la interpretación de resultados en pruebas inmunodiagnósticas, especialmente cuando en ellas se emplean extractos totales o parcialmente purificados de este parásito.

La identificación de antígenos de E.histolytica, que pudieran correlacionarse con la enfermedad intestinal aguda, es uno de los problemas centrales en el estudio de la amibiasis intestinal.

El análisis de frecuencia de reconocimiento --- antigénico ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación de antígenos parasitarios a partir de extractos crudos o preparados antigénicos parcialmente purificados (34).

Nuestros resultados revelan que la respuesta de los anticuerpos en pacientes adultos durante la fase aguda de la amibiasis intestinal, es altamente heterogénea, esta característica ha sido documentada previamente en amibiasis intestinal y absceso hepático amibiano (5,7,18,56).

El análisis de frecuencia nos permitió la identificación de siete fracciones antigénicas, las cuales son reconocidas preferentemente por el suero de pacientes con amibiasis intestinal aguda, aunque a frecuencias no mayores al 65%. La combinación de las bandas 3.4, 4.1 y 6.7 cuyos pesos moleculares son 62,51 y 24 Kd respectivamente incrementa la frecuencia de reconocimiento al 91.4% en el grupo de pacientes, mientras que en el grupo control se mantiene en el 10%.

C O N C L U S I O N E S .

Los contactos repetidos con ambas virulentas y no virulentas y por otro lado, la presencia de antígenos en este protozooario que pudieran dar reacciones cruzadas con otros microorganismos intestinales, dificulta el inmunodiagnóstico, especialmente cuando en la metodología empleada se utilizan extractos de parásitos completos o antígenos parcialmente purificados.

Los valores de frecuencia de las principales bandas reconocidas por los sueros de pacientes no son mayores al 65%. Es posible aumentar estos valores hasta el 91.4% haciendo mezclas de las fracciones 3.4, 4.1 y 6.7 manteniéndose en el 10% la frecuencia en el grupo control.

Estos resultados constituyen un primer, pero importante paso para el desarrollo de una mejor prueba inmunodiagnóstica de amibiasis intestinal aguda.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Abioye,A.A.,Lewis,E.A. y Mc Farland,H.:Clinical - evaluation of immunoglobulins in amoebiasis.Immunol.23:937.1972.
- 2.- Aley,S.B.,Scott,W.A. y Cohn,A.A.:Plasma membrane_ of E. histolytica. J.Exp.Med.152:391.1980.
- 3.- Arroyo,R. y Orozco,E.:Localization and identifica- tion of adhemiba, a protein wichs participates in_ the adhesión of E. histolytica to human erythro- cytes and epithelian cells. Arch.Invest.Med.(Méx) 17 (Supl.1):135.1986.
- 4.- Arroyo,R.,Orozco,E.:Localization and identifica- tion of an E. histolytica adhesin.Molecular and - Biochemical Parasitology,23:151.1987.
- 5.- Bever Eslava,A.:Identificación de los antígenos - de E. histolytica reconocidos por IgA de calostro y sueros puerperales de mujeres mexicanas,utili- zando inmunoelctrotransferencia. XI Seminario - sobre amibiasis:10.1989.
- 6.- Calderón,J.,Muñoz,M.L. y Acosta,H.M.:Surfase re- distribution and released of antibody-induced -- caps in E. histolytica. Exp.Med.151:184.1980.

- 7.- Calderón, J. y Avila, E.: Antibody caps in E. histolytica; isolation and electrophoretic analysis. J. Infect. Dis. 153:927.1986.
- 8.- Craig y Faust. Parasitología Clínica, 8a. ed. Salvat Ed. Pág. 140. Barcelona España. 1984.
- 9.- Crevenna, P.B.: Epidemiología de la amibiasis. Sal. Púb. Méx. 23:179.1981.
- 10.- Dasgupta, A.: Immunoglobulin in health and disease. III Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. Clin. Exp. Immunol. 86:163.1974.
- 11.- Del Muro, R.: Diagnóstico de la amibiasis intestinal mediante anticuerpos salivales. XI seminario sobre amibiasis:16.1989.
- 12.- Deschiens, R.: L' amibiase et l' Amibe Disentérique Paris Masson et Cie. Pág.131.1965.
- 13.- Diamond, L.S.: Axenic cultivation of E. histolytica Science. 134:336.1961.
- 14.- Donata, S.T., Wallace, R.B., Nipp, S.C., Olarte, J.: Enterotoxigenic Escherichia coli and Diarrheal disease in Mexican children. J. Infect. Dis. 135:482 1977.
- 15.- Eister, J., Hannibel, J.E.E. y Sanders, S.L.: Fatal amebiasis complicating corticosteroid management-

- of pemphigus vulgaris. New England J. Med. 261:843. 1959.
- 16.- Elsdon-Dew, R.: Amebiasis as world problem. Bull. N.Y. Acad. Sci. 47:438. 1971.
- 17.- Faust, E.C., Rusell, P.R. y Jug, R.C.: Clinical Parasitology. Lea y Febiger (Ed.). Philadelphia. Pág. 783. 1970.
- 18.- Flores-Castañeda, M.S.: Análisis por inmuno-electro-transferencia de antígenos de trofozoitos de E. histolytica. XI Seminario sobre amibiasis: 65. 1989.
- 19.- Grundy, M.S.: Antibodies against E. histolytica in human milk and serum, in Kenya. J. of Clin. Microb. 17:753. 1983.
- 20.- Ganguly, N.K., Mahan, R.C., Datta, D.V., Sharma, S., Chhuti, P.N.: Immunoglobulin and complement levels in cases of invasive amoebiasis. Ind. J. Med. Res. 67: 221. 1978.
- 21.- Gupta, A.K.: Immunodiagnosis of amoebiasis by antibody detection. Indian J. Pediatr. 51:725. 1984.
- 22.- Gutiérrez, G.: Epidemiología y control de la amibiasis en México. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl.):375. 1986.

- 23.- Gutiérrez,G. y Muñoz,O.: Epidemiology of amebiasis.En amebiasis.Infection and Disease by Entamoeba histolytica.Kretschmer,R.(ed.).CRC. Cap.8.1990.
- 24.- Jessurum,J.:Patología de la amibiasis intestinal. Rev. Mex. de Parasitología,3(1).1990.
- 25.- Juniper,K.,Worrel,C.L.,Roth,L.S.,Cypert,H. y Lloyd R.E.:Serological diagnosis of amebiasis.Am. J. Trop.Med.Hyg,21:157.1972.
- 26.- Kagan,I.G.:Seroepidemiology of amebiasis.En proceedings of the International Conference on Amebiasis.Sepúlveda,B. y Diamond,L.S. Instituto Mexicano del Seguro Social.Méx.:574.1976.
- 27.- Kotcher,E.,Miranda,M. y García de S.V.:Correlation of clinical,parasitological and serological data of individuals infected with E. histolytica. Gastroenterology,58:338.1970.
- 28.- Kretschmer,R.R. Immunology of amebiasis.En amebiasis.Martínez-Palomo,A.(ed.).Elsevier.Amsterdam. - Cap.4.1986.
- 29.- Krupp,I.M.: Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis.Am.J.Trop.Med.Hyg,19: 388.1970.
- 30.- Kumate,J.,Gutiérrez,G. Manual de Infectología,11a ed. Ed. M.C. Méx.,Pág.61.1990.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 31.- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins - during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature.277:680.1970.
- 32.- Lamb, J.R., O' Hehir, R.E. y Young, D.B.: The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes. J. of Immun. Meth.110:1.Elsevier.1988.
- 33.- Lara-Aguilera, R., Alvarez-Chacon, R., Lugo-Savage, J. L., Patojo-Vega, U. Current factors on the frequency of invasive amebiasis in children. En Sepúlveda, B., Diamond, L.S. (ed.). Proceeding on the International conference en Amebiasis. Instituto Mexicano del Seguro Social. Méx.:787.1976.
- 34.- Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govenzensky, T. y Coltorti, E.: Deciphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am.J.Trop.Med.Hyg.40(3):282.1989.
- 35.- Levine, N.D.: A newly revised classification of 0 the protozoa. J.Protozool.27(1):37.1980.
- 36.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.L y Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol -- reagent. Biol.Chem.193:265.1951.
- 37.- Maddison, S.E., Kagan, I.G. y Norman, L.: Reactivity_

of human immunoglobulins in amoebiasis. J. Immunol.
100:217.1968.

- 38.- Markell, E.K., Voge, M. Parasitología. Diagnóstico, -
prevención y tratamiento. Ed. Manual Moderno. México
D.F. Pág. 29. 1986.
- 39.- Marsden, P.D. y Schulz, M.G.: Intestinal Parasites.
Gastroenterology. 57:724. 1969.
- 40.- Martínez-Palomo, A.: The pathogenesis of amoebia-
sis. Parasitol. Today. 3(4):111. 1987.
- 41.- Martínez-Palomo, A.: Unidad o dualidad de Entamoeba histolytica. Rev. Mex. de Parasitol. 3(1). 1990.
- 42.- Meza, I., Cazares, F., Rosales-Encinas, J.L., Talamas-
Rohana, P y Rojkind, M.: Use of antibodies to cha-
racterize a 220 KDa surface protein from E. histolytica. J. Infect. Dis. 156:798. 1987
- 43.- Meza, I., Torres-Guerrero, H.K. y Meraz, M.A.: En -
Amebiasis. Infection and disease by E. histolytica.
Kretschmer, R.R. (ed.). CRC. Cap. 3. 1990.
- 44.- Muñoz, O. En Amebiasis. Martínez-Palomo, A. (ed.). -
Pág. 213. Elsevier Biomedical. Amsterdam. 1986.
- 45.- Orozco, E., Rodríguez, M.A.: Adhesinas de E. histo-
lytica: Moléculas útiles para diferenciar cepas -
patógenas de no patógenas. Rev. Mex. de Parasitol.

- 46.- Ortiz-Ocampo.: Estudio de campo realizado en Tizayuca Edo. de Hidalgo, con el objeto de investigar la prevalencia de E. histolytica en una población suburbana. XI Seminario sobre amibiasis: 89.1989.
- 47.- Ostoa-Saloma, P., Cabrera, N. y Pérez-Monfort, R.: - Purificación de proteinasas de E. histolytica - utilizando distintos soportes de cromatografía - de afinidad. Rev. Mex. de Parasitol. 3(1).1990.
- 48.- Pardo-Gilbert, A.: Frecuencia de rectocolitis -- amibiana aguda en diversas unidades del Instituto Mexicano del Seguro Social en el D.F. y en el Valle de México. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 2 (supl. 1):335.1971.
- 49.- Parkhouse, M., Cid, M.E. y Calderón, J.: Identificación de Entamoeba histolytica con anticuerpos de pacientes de amibiasis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) - 9 (Supl.1):211.1978.
- 50.- Patterson, M., Healy, G.R. y Shabot, M.: Serological testing for amebiasis. Gastroenterology. 78:136. - 1980.
- 51.- Perches, A., Kretschmer, R., Lee, E. y Sepúlveda, B.: Determinación de inmunoglobulinas del suero de - pacientes con amibiasis invasora. Arch. Invest. -

Méd. (Méx.) 2 (Supl.1) :97.1979.

- 52.- Petri, W.A. Jr., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F., Ravdin, J.I.: Recognition of the galactose or N-acetyl-galactosamine binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. Infect. Immun. 55:2327.1987.
- 53.- Petri, W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, I., Mann, B.J., Broman, J., Ravdin, J.L.: Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. J.Biol.Chem. 264:3007.1989.
- 54.- Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L.: A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev.Infect.Dis. 4:1185.1982.
- 55.- Ravdin, J., Murphy, C., Salata, R. y Hewlett, E.: The N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of the E. histolytica. I. Partial purification and relation to amebic virulence in vitro. J. of Infect.Dis. 151:804.1985.
- 56.- Ravdin, J.I. :Entamoeba histolytica: from adherence to enteropathy. J. of Infect. Dis. 159 (3):420.1989.
- 57.- Rosales-Encinas, J., Meza, I., López-De Leon, A., Talamas Rohana, P. y Rojkind, M.: Isolation of a 220-KDA protein with lectin properties from a virulent strain of E. histolytica. J. of Infect. Dis. 156:790.1987.

- 58.- Salata, R.A., Ravdin, J.I.: Review of the human immune mechanism directed against E. histolytica. Rev. of - Infect. 8(2):261.1986.
- 59.- Salata, R.A. y Ravdin, J.I.: N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 151:816.1985.
- 60.- Sepúlveda, B.: La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Monografías Médicas. 1976
- 61.- Sepúlveda, B. Immunology of amebiasis. En molecules , cells and parasites in immunology. Larralde, C., -- Willms, K., Ortiz-Ortiz, L. y Sela, M. (ed.). Academic Press. USA. Pág. 163. 1980.
- 62.- Sepúlveda, B. y Martínez-Palomo, A. En tropical and - geographical Medicine. Warren, K.S. and Mahmoud, A.A.S. (ed.). Pág. 305. Mc. Graw-Hill. N.H. 1984.
- 63.- Stamm, W.P., Ashley, M.L. y Bell, K.: The value of amebic serology in an area of low endemicity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70:49. 1976.
- 64.- Talamás-Rohana, P. y Meza, I.: Interaction between - pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. J. - Cell. Biol. 106:1787. 1988.
- 65.- Tay, Z.J., Velasco, C.O., Lara, A.R., Gutiérrez, Q.M. Para sitología médica. Editor Francisco Méndez. México D.F., Pág. 49-55. 1989.

- 66.- Trilss, D.: Immunology of Entamoeba histolytica in -
human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. 4:1154.1982.
- 67.- Towbin, H.: Electrophoretic transfer of proteins from
polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9):4350.1979.
- 68.- Villalobos, P.J. Introducción a la gastroenterología.
Cap. 65 y 127. Ediciones M.C. México. 1989.
- 69.- W.H.O. Expert Committee. Amoebiasis. W.H.O. Tech. Rep. Ser. 421:1.1969.
- 70.- W.H.O. Parasitic diseases control programme. Ginebra,
Febrero. 1984.