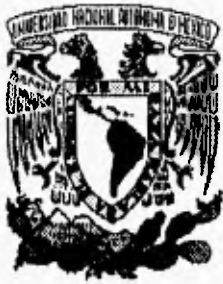


173  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Análisis de la Respuesta Inmune Humoral en Ratones de la Cepa C3H/HeJ Inoculados intracecalmente con *Entamoeba histolytica*.”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
Luis Rosales León



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



1996

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Análisis de la respuesta inmune humoral en ratones de la cepa C3H/HeJ inoculados intracecalmente con Entamoeba histolytica.

realizado por Luis Rosales León

con número de cuenta 8836680-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Blanca Haydee Ruiz Ordaz

*Blanca Haydee Ruiz Ordaz*

Propietario

Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

*Carlos Alberto Castillo Pompeyo*

Propietario

M. en C. Saúl Cano Colín

*Saúl Cano Colín*

Suplente

Biol. Patricia Santos González

*Patricia Santos González*

Suplente

QFB. Fernando Ramos Reyes

*Fernando Ramos Reyes*

Consejo Departamental de Biología

*[Firma]*  
SECRETARÍA  
DE BIOLÓGICA

Este proyecto se realizó en el laboratorio de la Dra. Blanca Ruíz, Depto de Biología Molecular del:



# **INTRODUCCION**

La amibiasis es una parasitosis ocasionada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. En la mayoría de los individuos afectados (entre un 80 a 90 %), el parásito vive como comensal en la mucosa intestinal, predominando el estado asintomático. Sin embargo, *E. histolytica* es capaz de invadir la mucosa intestinal y diseminarse por vía sanguínea, por lo que el espectro clínico es muy amplio y varía desde un cuadro diarreico moderado, (agudo o crónico) hasta la disenteria fulminante, con la posibilidad de diseminación y manifestación de la enfermedad de manera extraintestinal, siendo el absceso hepático la forma mas frecuente que ocasionalmente se extiende al peritoneo, pleura, pulmón y pericárdio (Guerrant, 1986).

En 1990 W, Petri estimó que, anualmente, 480 millones de individuos (un 10 % de la población) a nivel mundial son infectados por este protozooario, de los cuales entre 40 y 50 millones de casos (alrededor de un 10 % de los individuos afectados) presentaban amibiasis invasiva (colitis o absceso hepático), con una notificación de 40,000 a 110,000 muertes; por lo cual se ha considerado que este padecimiento sólo es superado por la malaria y la esquistosomiasis como causa principal de muerte por infección parasitaria (Guerrant, 1986).

Aunque la infección amibiana presenta una distribución cosmopolita, existe una elevada morbilidad y mortalidad en América, Asia, Africa y la India. En los Estados Unidos *E. histolytica* es una causa importante de diarrea en pacientes con HIV (Walsh, 1986).

En México, el 20% de la población es afectada y aunque predomina el estado de portador asintomático, la amibiasis invasora conserva un carácter endémico, por lo que en nuestro país se considera un problema muy importante de salud pública (Kumate, 1985). De manera más reciente, durante una serie de análisis que resultaron de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada durante el periodo comprendido entre 1987 y 1988, se observó (detectando la presencia de anticuerpos séricos dirigidos en contra de *E. histolytica* mediante hemaglutinación indirecta) una seroprevalencia promedio de 8.41 %, la cual varió de acuerdo a factores tales como la región geográfica, urbanización, escolaridad, nivel socioeconómico, edad y sexo (Caballero-Salcedo, *et al.*, 1994).

Hasta la fecha, no es posible explicar por qué algunas cepas amebianas son capaces de invadir tejidos del huésped, mientras que otras permanecen en la luz intestinal sin producir daño aparente. Sin embargo, se sabe que la invasión de este parásito al huésped ocurre en una serie de eventos específicos que incluyen: la colonización del lumen intestinal con adherencia de trofozoitos a la membrana basal de la mucosa colónica además de la penetración al recubrimiento mucoso por lisis y destrucción del epitelio del colon.

La respuesta inmune mediada por células se ha considerado como la más eficaz en la limitación y prevención de la amebiasis invasiva (Gutierrez, 1991). Los estudios seroepidemiológicos han revelado que a pesar de que entre un 81 a un 100 % de los pacientes con amebiasis invasora desarrollan anticuerpos específicos anti-*E. histolytica* (Guerrant, 1986), el título de dichos anticuerpos no se correlaciona con el desarrollo clínico de la enfermedad y tampoco ayuda al paciente en la resolución de la infección, ni confiere resistencia a infecciones posteriores (Trissl, 1982).

Con la finalidad de resolver muchas de las interrogantes presentes en el estudio de la amebiasis es necesario conocer cuales son los antígenos de *E. histolytica* reconocidos por el hospedero en el curso de la infección, así como conocer las bases de las diferencias en la expresión de la virulencia en distintas cepas del parásito, los mecanismos de la fagocitosis, el efecto citopático y eliminar la controversia de la existencia de dos especies distintas de *Entamoeba* con características virulentas y no virulentas (Spice & Ackers, 1992; Melothra, 1993).

En un estudio realizado con sueros obtenidos de 30 pacientes con amebiasis intestinal comprobada mediante análisis coproparasitoscópico, se logró identificar un antígeno (24 KD) que era inmunoreactivo solamente para los sueros de pacientes, además de un grupo de antígenos de 22, 23, 25, 26, 50 y 62 KD que eran reconocidos tanto por un pequeño porcentaje (<12%) de los controles, como por un gran porcentaje (>50%) de los sueros de los pacientes (Ximenez, C. *et al.*, 1992). Sin embargo, otros grupos (Ali Khan & Meerovitch, 1970; Purnima *et al.*, 1987) asocian la máxima antigenicidad e inmunogenicidad de extractos totales de *E. histolytica* con las fracciones de alto peso molecular. De manera más reciente, Das *et al.*, en 1993 reportaron la existencia de una fracción



antigénica de alto peso molecular, determinada por medio de Inmunolectrotransferencia (660 hasta 170 KD), la cual confiere protección contra el absceso hepático amibiano hasta en un 91.6 %.

## **ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica***

### **Antígeno de 96 KD.**

Este antígeno se identificó mediante la producción de anticuerpos monoclonales específicos contra componentes de superficie en trofozoitos de *E. histolytica* (Torian, Lukehart & Stamm, 1987), reportes posteriores mencionan la existencia de dos isoformas de la proteína dentro del parásito: una forma asociada a membranas y una segunda forma soluble en agua (Torian, *et al.*, 1990a), aunque el significado biológico de la presencia de ambas formas es todavía incierto.

Este antígeno se identificó en aislados de cultivos axénicos y polixénicos, asimismo es reconocido mediante inmunoensayo enzimático (**ELISA**) e inmunoprecipitación en fluido de absceso hepático amibiano. En un estudio inmunológico se describe una respuesta serológica al antígeno de 96 KD en el 68% de los pacientes que presentaban amibiasis invasiva (Torian, *et al.*, 1989). Sin embargo, otro grupo menciona que, utilizando los sueros de 108 pacientes con absceso hepático y comparando mediante inmunolectrotransferencia contra antígenos totales de *E. histolytica*, encontró un reconocimiento del 90% para un antígeno de 97 KD (Torian, *et al.*, 1990a).

### **Antígeno variable de superficie (125 KD).**

Aislado en un principio a partir de una biblioteca de expresión en  $\lambda$  gt11 de *E. histolytica* cepa *HMI:IMSS* mediante el uso de suero inmune humano, este antígeno de superficie de 125 KD es reconocido por un 73 % de los sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991). Recientemente, un fragmento (de que % se trata) de esta proteína ha sido expresada de manera recombinante y utilizada para la inmunodiagnóstico de amibiasis invasiva, utilizando dicho polipéptido recombinante en un ensayo ELISA, se obtuvo un 100 % de sensibilidad y especificidad para los sueros de pacientes con amibiasis invasora (Lotter, *et al.*, 1992).

Las clonas genómicas aisladas mediante hibridación con la clona de cDNA contienen un marco de lectura abierto de 3.34 Kb. Se ha postulado que dicha proteína tiene un peso molecular de

125,513 Daltons (1141 aminoácidos) con 17 sitios potenciales de N-glicosilación. Esta proteína contiene una región amino terminal de 35 aminoácidos hidrofóbicos cuya función postulada es de anclaje a la membrana del trofozoito (Edman, U. *et al.*, 1990).

Las diversas secuencias correspondientes a una porción de 470 aminoácidos de longitud han sido sometidos a análisis de similitud entre las diversas cepas. Los resultados muestran que las diferencias entre cepas virulentas son de 1% en promedio, mientras que comparadas con las secuencias de cepas no virulentas, la diferencia llega a ser de 12.9 % (Edman, U. *et al.*, 1990). Paralelamente, Tannich, *et al.*, (1989) mostraron que los patrones de hibridación ADN-ADN (Southern blot) entre cepas virulentas y no virulentas son distintos para 9 cepas distintas de *E. histolytica*, posteriormente este mismo grupo ha extendido dicho estudio a 48 cepas del parásito, encontrando solamente una cepa patógena con un patrón de restricción de tipo no patógeno (Tannich, E. y G. D. Burchard, 1991). En conjunto estos estudios sugieren que las diferencias entre cepas virulentas y no virulentas cuentan con bases genéticas (Mann, B.J. y W.A. Petri Jr, 1991).

### **Antígeno de 29 KD.**

Este antígeno se identificó a partir de una biblioteca de cDNA como un inserto de 700 pb, la secuencia deducida reveló la presencia de una proteína rica en cisteína (Meraz, *et al.*, 1989), asimismo, tanto con sueros monoclonales, como policlonales se es posible reconocer un antígeno de 29 KD en muestras de extracto total amibiano. Este antígeno también se correlacionó en la superficie de los trofozoitos mediante el uso de inmunoprecipitación de trofozoitos iodados e inmunofluorescencia indirecta. Por otro lado, anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de este antígeno reconocen a la proteína rica en cisteína en las cepas axénicas, así como en 6 aislados clínicos de zimodensos patógenos y no patógenos de *E. histolytica*. Cabe hacer notar que no todos los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer a todos los aislados clínicos, indicando que en esta proteína hay epítopes que no se conservan en todas las cepas (Torian, B.E., *et al.*, 1990b). Los hallazgos realizados a partir de ensayos de Inmunolectrotransferencia con sueros de pacientes han mostrado que esta proteína es capaz de desencadenar una respuesta humoral específica a la infección amibiana. Asimismo, la producción diferencial de anticuerpos en contra de este antígeno se

correlacionó con los distintos estadios de evolución de la infección, encontrándose en general una mayor respuesta de anticuerpos en aquellos pacientes con absceso hepático amibiano, mientras que el menor nivel fué hallado en pacientes asintomáticos portadores de quistes; ésto ha permitido postular que esta proteína rica en cisteína sufre una expresión diferencial a lo largo del curso de la infección, pudiendo correlacionarse así el nivel de expresión con el potencial invasivo del parásito y por lo tanto con su virulencia (Shandil y Vinayak, 1992).

Por otro lado, Vinayak (1990) demostró que un antígeno de 29 KD estaba involucrado en los procesos de adhesión y citotoxicidad de trofozoitos amibianos sobre las células blanco.

### **Proteína rica en serina de *E. histolytica* (PRSEH)**

Esta proteína cuenta con un extremo amino terminal rico en serina, seguida de una región rica en aminoácidos con carga, después de la cual hay una serie de aminoácidos repetidos en tandem, la cual limita con una región carboxilo terminal hidrofóbica, dicha disposición de aminoácidos repetidos en tándemes múltiples es similar a la que se encuentra en las proteínas de los circunsporozoitos de algunos tripanosomas (Stanley, *et al.*, 1991).

Antisueros preparados contra dicha proteína identifican dos bandas de 46 y 52 KD en un extracto crudo de membranas amibianas (Stanley, *et al.*, 1990). Los resultados de una prueba con 108 sueros inmunes muestran un 82 % de reconocimiento entre pacientes con amibiasis invasiva con un 95 % de especificidad, es por ésto que se estudia el papel de dicha proteína como una herramienta para el diagnóstico clínico en áreas endémicas (Stanley, *et al.*, 1991).

Se ha postulado que la proteína juega un papel muy importante en la adherencia de los trofozoitos de *E. histolytica* a las células blanco, dado que el antisuero dirigido en contra de la proteína inhibe la adhesión a células de ovario de hámster chino (CHO) en un 70 % con respecto a los niveles control (Stanley, *et al.*, 1991).

### **Adhesina de 112 KD.**

La adhesina de 112 KD fué descubierta a partir de una clona de *E. histolytica* con una adherencia deficiente. Anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de la membrana plasmática de

*E. histolytica* cepa HMI:IMSS reaccionan contra la superficie celular de dicha cepa, aunque debilmente con la clona mutante con baja adhesión (Aley, Scott & Cohn, 1980). Posteriormente se encontró que el suero de pacientes con absceso hepático amibiano reconoce un polipéptido de 112 KD. Rodríguez, *et al.*, (1989) han demostrado que la preincubación de trofozoitos virulentos de *E. histolytica* con anticuerpos monoclonales contra dicha adhesina inhiben parcialmente la adherencia, fagocitosis y efecto citopático en monocapas de células (MDCK), inhibiendo su destrucción en un 61 %.

### **Superoxido Dismutasa (25 KD).**

Tannich y colaboradores en 1992 aislaron una clona de cDNA que codifica para una enzima del tipo superóxido dismutasa [SOD] (una enzima capaz de neutralizar radicales de oxígeno) a partir de aislados provenientes de cepas virulentas y no virulentas (Bruchhaus, Brattig y Tannich, 1992). Esta enzima es codificada por un gen único y el peso molecular de la proteína purificada a partir de la expresión del cDNA (en un vector de tipo  $\lambda$  gt11) es de 25 KD. En un extracto crudo de *E. histolytica* se lograron aislar tres isoformas para la proteína con puntos isoeléctricos de entre 6.5 y 7.0, todas las isoformas fueron reactivas a  $H_2O_2$ , requirieron de  $Fe^{++}$  como cofactor y reaccionaron con antisuero dirigido en contra de la FeSOD recombinante. Así mismo, se investigó la utilidad de la FeSOD como herramienta inmunodiagnóstica, el estudio realizado mediante un ensayo de tipo ELISA reveló una alta sensibilidad, aunque se encontró reacción cruzada con antisuero de otros pacientes infectados con otros protozoarios, como *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma* (Bruchhaus, N., W. Brattig y E. Tannich, 1992).

### **Lectina con afinidad por Galactosa (260 KD).**

La lectina con afinidad por galactosa es un heterodímero con un punto isoeléctrico de 6.2, un peso molecular de 260 KD determinado por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Cuenta con una subunidad de 170 KD y otra de 35 KD unidas por medio de puentes disulfuro (Petri Jr., *et al.*, 1989). Esta lectina parece jugar un papel muy importante en la adhesión amibiana a la mucosa del colon, fagocitosis de bacterias, eritrocitos e iniciación de

citólisis dependiente de contacto (Ravdin, *et al.*, 1990). Así mismo, es un antígeno importante reconocido por el 95% de los sueros inmunes probados, además de ser una proteína conservada antigénicamente entre aislados geográficamente distintos de *E. histolytica* (Mann y Petri Jr, 1991).

A pesar de que hasta el momento existen numerosos reportes relativos a la identificación, purificación y caracterización de diversos antígenos de *E. histolytica*, es necesario llevar a cabo su caracterización de una manera más completa, con la finalidad de establecer una correlación entre los diversos reportes que mencionan la existencia de antígenos con peso molecular similar y sus características biológicas. Así mismo es muy importante el tratar de esclarecer el papel de dichos antígenos en los mecanismos de patogénesis y en la relación hospedero-parásito.

#### *Entamoeba histolytica* Y EL SISTEMA INMUNE

Dado que las etapas tempranas en el curso de la amibiasis invasiva se desarrollan sobre el epitelio intestinal, la respuesta local del sistema inmune asociado a mucosas debe jugar un papel muy importante en la regulación de dichas etapas. Así mismo, los anticuerpos IgA secretorios (siendo los anticuerpos de mayor abundancia en las mucosas, además de contar con un carácter neutralizante de antígenos), deben de tener suma importancia en la prevención de las etapas extraintestinales de la infección; como lo demuestran los estudios epidemiológicos de la incidencia de amibiasis en niños de hasta 10 meses de edad, dicha incidencia fue nula debido a la presencia de anticuerpos de tipo IgA en la leche materna (Islam, 1988), asimismo, se ha encontrado que gran parte de los coproanticuerpos anti-amiba pertenecen a esta clase. Los anticuerpos de tipo IgM se presentan durante el contacto inicial con el patógeno, mientras que durante el curso de la infección los anticuerpos de tipo IgG presentan la mayor concentración en suero (Kretschmer, 1990).

Sin embargo, aunque ya se ha planteado la importancia que tiene el conocimiento de los eventos tempranos de la interacción de *E. histolytica* con las mucosas y su papel en la determinación de los casos de amibiasis extraintestinal, actualmente se carece de un modelo adecuado de amibiasis intestinal. Los modelos que hasta la fecha se han propuesto, abarcan un amplio espectro de animales, incluyendo conejos, cobayos, ratas (Jones, 1946; Rigolhier, *et al.*, 1989), ratones (Cicslak, *et al.*,

1992), gatos, perros (Swartzwelder y Avant, 1952), gerbos (Chadec y Meerovitch, 1984) y macacos (Miller, 1952). En general, los modelos que han sido propuestos a la fecha son muy laboriosos, tienen poca reproducibilidad, producen lesiones que son detectables solo después de varios días post-inoculación, o incluyen una gran cantidad de manipulaciones, como los tratamientos pre-inoculación con drogas como metronidazol (Navarro-García, *et al.*, 1992).

Kumar Gosh y colaboradores (Kumar *et al.* 1994) han podido desarrollar de manera continua un modelo murino de amibiasis intestinal, el cual aprovecha la susceptibilidad de la cepa de ratones C3H/HeJ a la infección con *E. histolytica* (Ghadirian, *et al.*, 1984); así mismo, el uso de ratones como hospederos para el desarrollo de la parasitosis, facilita en gran medida la experimentación, ya que el ratón es fácilmente manipulable, además de que tanto su fondo genético, como algunos aspectos inmunológicos son más conocidos. En estudios preliminares (Kumar, *et al.*, 1994) se ha podido demostrar que el desarrollo de la enfermedad producida en este modelo es muy similar a lo que se ha reportado para los casos de amibiasis intestinal en humanos, incluyendo erosión del epitelio de cubierta, ulceraciones, amebomas y perforaciones de la pared (ver Figura 1). Actualmente, en el laboratorio de la Dra. Blanca H. Ruiz se ha reproducido el modelo intestinal, con el objeto de llevar a cabo un análisis de la respuesta inmune humoral durante el desarrollo de una cinética de infección con *E. histolytica* en ratones C3H/HeJ.

## STOPATHOLOGIC FEATURES IN EXPERIMENTAL AMEB



Figure 2. A more extensive lesion at 5 days postinoculation is

**FIGURA 1. LESIÓN A 5 DÍAS POST-INOCULACIÓN EN EL CIEGO DE LOS ANIMALES INOCULADOS INTRACECALMENTE CON CULTIVOS MONOAXÉNICOS DE *E. histolytica*. PUEDE OBSERVARSE LA DESTRUCCIÓN DEL EPITELIO (flechas), UN TROFOZOITO HA LOGRADO PENETRAR HASTA LA MUCOSA MUSCULARIS (cabeza de flecha).**

# OBJETIVOS



## **General:**

Evaluar la respuesta inmune humoral en un modelo murino experimental de amibiasis intestinal.

## **Particulares:**

**I.** Realizar la cinética de aparición de células formadoras de anticuerpos (CFA) tanto a nivel sistémico como a nivel local en contra de *Entamoeba histolytica* en un modelo murino experimental de amibiasis intestinal

**II.** Determinar los principales antígenos de *Entamoeba histolytica* reconocidos por el suero inmune de ratones, en el curso de una cinética de infección.

# MATERIALE Y METODOS

## CULTIVOS DE *Entamoeba histolytica*

Los cultivos monoaxénicos de *E. histolytica* se llevaron a cabo de acuerdo al método de Robinson (Robinson, 1968); en el cual 3 ml de agar al 1.5% en cloruro de sodio al 0.7% se colocaron en tubos de ensaye de 16 x 150 mm, los tubos se esterizaron en autoclave y se dejaron enfriar inclinados, con el fin de producir esta inclinación en el agar. En la preparación del medio se utilizó una solución de peptona al 20%, suero bovino inactivado a 56°C, hidrogenofalato de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ) 0.05 M y agua destilada. Esta solución se vertió en los tubos de ensaye con agar, las poblaciones bacterianas se controlaron mediante la adición de 120 ml de eritromicina al 0.5%, violeta de genciana y acriflavina, finalmente se agregaron 10 mg de almidón de arroz. Los trofozoitos se cultivaron asociados a *Escherichia coli*, a una temperatura de 37 °C y todos los tubos se subcultivaron cada 48 hrs.

Inicialmente se realizó una serie de ensayos destinados a determinar el comportamiento de la curva de crecimiento amibiano, con el fin de conocer la fase de máximo crecimiento, así como el estado de los cultivos a lo largo de dicha curva. El inóculo inicial para los diversos tubos se realizó por triplicado, en todos los casos la densidad de la población de trofozoitos se determinó mediante el uso de la cámara de Neubauer, tomando muestras de los cultivos a intervalos de tiempo regulares, como se muestra en la Tabla I.

TUBO	INÓCULO
I	1000
B	1000
C	1000
D	10000

**TABLA I.** Inóculo inicial para los ensayos de crecimiento de trofozoitos de *E. histolytica* en Medio Monoaxénico Bifásico de Robinson.

Para realizar los cultivos axénicos se utilizó la técnica de Diamond (Diamond, 1961), que consiste en lo siguiente: Trofozoitos de la cepa *HMI:IMSS* se cultivaron axénicamente a 37°C en 10 ml de medio TYI-S-33 en tubos de 16 x 125 mm con tapa de rosca. El medio fue suplementado con 13 % de suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C durante 30 min), 3 % de la mezcla de vitaminas de Diamond, 25 UI/ml de penicilina y 35 mg/ml de estreptomicina.

### **OBTENCIÓN DE ANTÍGENO TOTAL AMIBIANO.**

La obtención de antígeno total amibiano se realizó a partir de cultivos de 48 hrs. de trofozoitos de la cepa *HMI:IMSS* crecidos en el medio axénico TYI-S-33. Los trofozoitos se despegaron de las paredes de la botella sumergiendo esta en baño de hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, los trofozoitos se colectaron y concentraron mediante centrifugación sucesiva a 2000 rpm (91 g) durante 10 min a 10 °C. Con la finalidad de conservar la integridad de las amibas a lo largo del proceso todos los lavados se realizaron en baño de hielo, procurando no liberar burbujas en la suspensión de trofozoitos. Después se calculó la densidad de las amibas en cultivo mediante el uso de una Cámara de Neubauer, por último el paquete de trofozoitos se disgregó y se homogeneizó mediante choque térmico. El antígeno total amibiano en suspensión se repartió en tubos eppendorff de 1 ml y se guardó a -70 °C hasta su uso.

### **INFECCIÓN DE LOS ANIMALES Y CINÉTICA DE APARICIÓN DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS.**

Las infecciones con *E. histolytica* se realizaron en ratones C3H/HeJ machos de 4 semanas de edad, utilizando cultivos monoaxénicos de 48 hrs en los cuales los trofozoitos se cosecharon y mezclaron. Se pudo comprobar que los animales utilizados a lo largo de la cinética se hallaban libres de *Entamoeba muris* mediante inspección directa de las heces. Posteriormente, los ratones se anestesiaron con éter y se inocularon con  $5 \times 10^5$  trofozoitos, realizando un corte en la pared abdominal e inoculando las amibas en la punta del ciego con ayuda de una jeringa hipodérmica de 1 ml (Kumar, *et al.*, 1994), el sitio de la inoculación se limpió con algodón y la herida se cerró con grapas metálicas. En el caso de los animales utilizados como control se utilizó el mismo procedimiento, inoculando una cantidad equivalente de medio monoaxénico conteniendo solamente bacterias.

Con el fin de analizar la respuesta inmune humoral durante la cinética de infección en el modelo experimental, se determinaron distintos tiempos post-infección en un intervalo de entre 5 y 60 días; pasado dicho tiempo en cada punto del intervalo se sacrificó a los animales y se determinó el número de células formadoras de anticuerpos mediante la técnica de *ELISPOT* (Möller y Borrebaeck, 1985).

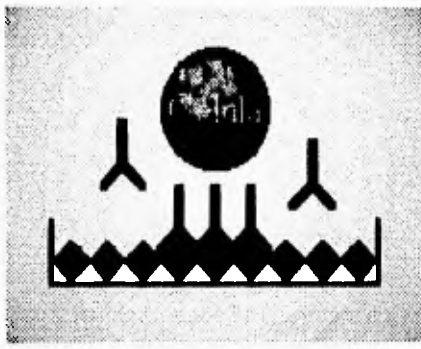
### **OBTENCION DE LINFOCITOS Y SUERO INMUNE.**

Los ratones se sacrificaron en cámara de éter, tanto el bazo como las placas de peyer se extrajeron en condiciones asépticas y se colocaron en medio RPMI pH 7.2 suplementado, en baño de hielo. Las células linfoides se obtuvieron mediante perfusión con ayuda de una jeringa hipodérmica de 1 ml y se lavaron tres veces mediante centrifugaciones sucesivas de 10 min, 2000 rpm (91 g) a 5 °C; posteriormente se les adicionó amortiguador hemolítico, se dejaron reposar durante 3 min y se lavaron 2 veces más. Finalmente, se determinó la viabilidad de las células mediante el método de exclusión por azul de tripano y se ajustaron a  $1 \times 10^7$  cél./ml.

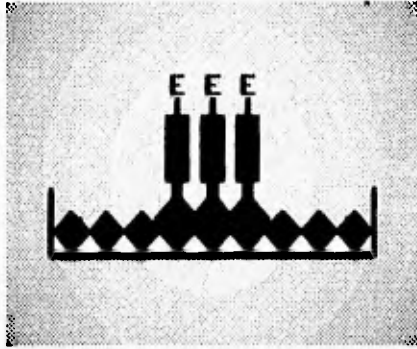
Para cada punto de la cinética los ratones se sangraron mediante punción cardiaca y se obtuvo el suero por centrifugación.

### **CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS.**

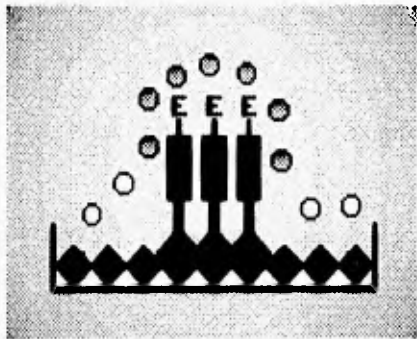
La cinética de aparición de las células formadoras de anticuerpos (CFA), se llevó a cabo mediante una modificación del método de *ELISPOT* (ver figura 2) (Möller y Borrebaeck, 1985; Sedgwick & Czerkinsky, 1992), que brevemente consiste en lo siguiente: se colocaron membranas de nitrocelulosa en placas de 96 pozos y se sensibilizaron con 10 mg de antígeno total anibiano diluido en 100  $\mu$ l PBS pH 7.2 durante toda la noche. Después de dos lavados con una solución PBS-Tween 20 0.05 %, las placas se bloquearon durante 1 hr. con una solución de Gelatina 1 %, albúmina sérica bovina 1% en PBS-Tween. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween y tres veces más con PBS pH 7.2, en cada pozo se adicionó 100  $\mu$ l de la suspensión de linfocitos, conteniendo  $2.5 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI suplementado con gentamicina (50 mg/ml) y 10% de suero bovino; las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se removieron mediante ocho lavados con PBS-Tween, se adicionaron



Las placas con fondo de nitrocelulosa son sensibilizadas con el antígeno y bloqueadas.

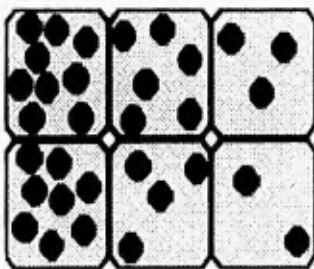


Los linfocitos B adicionados secretan anticuerpos, los cuales se unen localmente al antígeno capturado en la placa de nitrocelulosa.



Las células son removidas mediante lavados. Los anticuerpos secretados localmente son detectados por medio de un segundo anticuerpo conjugado específico para cada isotipo.

El sitio de secreción de anticuerpos es revelado mediante la adición de sustrato, lo cual resulta en la formación de un producto insoluble y colorido.



Los puntos de color representan el producto de secreción de una sola célula y pueden ser contados directamente o con bajo aumento.

FIGURA 2. MÉTODO DE ELISPOT.

(MODIFICADO DE ACUERDO A MÖLLER & BORREBAECK, 1985)

en cada pozo 100 µl de los siguientes anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa: α-IgG α-IgA α-IgM; las placas se incubaron durante 2 hr a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, después de lavar cuatro veces más las placas con PBS-Tween y tres veces con PBS pH 7.2 en dilución 1:3, se adicionó en cada pozo 100 µl de una solución filtrada de substrato (10 mg de 3,3'-diaminobenzidina, 30 mg de Cloruro de Níquel, 30 mg de Cloruro de Cobalto y Peróxido de Hidrógeno, 0.005% en 100 ml de PBS pH 7.2 en dilución 1:3); transcurridos 15 min. la reacción se detuvo con agua destilada y los puntos positivos en cada pozo se contaron a 20x en un microscópio estereoscópico. Todo el procedimiento se realizó por triplicado, tanto para los animales control como para los animales infectados.

### **ELECTROFORÉISIS.**

La separación de los componentes del antígeno total amibiano se llevó a cabo por el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras que se analizaron, se ajustaron a la concentración deseada, diluyendo con el Buffer de muestra en proporción 1:1. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida en una concentración del 10 %, utilizando un voltaje de 20 mV en el gel concentrador y de 40 mV para el gel separador, a corriente constante. De manera previa a la inmunoelectrotransferencia, se realizó la tinción de una sección vertical del gel, con la finalidad de comprobar la integridad de los antígenos separados; la presencia de bandas bien definidas de alto y bajo peso molecular indicó la ausencia de degradación de los mismos, en caso contrario fué posible observar en el gel la presencia de bandas difusas, con ausencia de aquellas de alto peso molecular.

### **INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

Con el objeto de identificar los diversos antígenos amibianos reconocidos a lo largo del desarrollo de la cinética en el modelo experimental, se llevó a cabo una serie de ensayos de inmunoelectrotransferencia de acuerdo a Towbin (Towbin, *et al.*, 1979), modificados de la manera siguiente: El antígeno total amibiano fue separado en geles de poliacrilamida al 10%. La transferencia se realizó a 24 V durante 45 minutos y la correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se verificó mediante tinción reversible con Ponceau S. Para evitar el

pegado inespecífico de anticuerpos, la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con una solución de PBS-Tween 20 0.3% y BSA 3 %. Después de tres lavados con una solución de PBS-Tween 20 0.3%, el filtro de nitrocelulosa se cortó en tiras de aproximadamente 2 mm de ancho. Las tiras obtenidas de esta manera se incubaron durante 3 hr. con el anticuerpo primario contenido en los sueros de los ratones control e infectados para los diversos días post-inoculación. Las diluciones de los sueros se determinaron con base en título de los mismos, utilizando como intervalo promedio 1:250-1:500; pasado el tiempo de incubación, las tiras se lavaron 4 veces más con la solución de PBS-Tween 20 0.3%. A continuación, se agregaron los siguientes anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa:  $\alpha$ -IgG,  $\alpha$ -IgA,  $\alpha$ -IgM y  $\alpha$ -anticuerpos totales, en una dilución de 1:2000, incubando durante 1 hr. Finalmente, después de 4 lavados más, se agregó la solución de sustrato (O-4, Cloronaftol 30 mg/ml, Peróxido de hidrógeno y Metanol en PBS), incubando durante 15 minutos, finalmente la reacción se detuvo con agua destilada.

De manera paralela al análisis de inmunoelctrotransferencia, se realizó una revisión bibliográfica de los principales antígenos de *E. histolytica*, para poder establecer de manera posterior un papel biológico putativo a los antígenos reconocidos a lo largo de la cinética de infección.



# **RESULTADOS**

## CULTIVOS DE *Entamoeba histolytica*

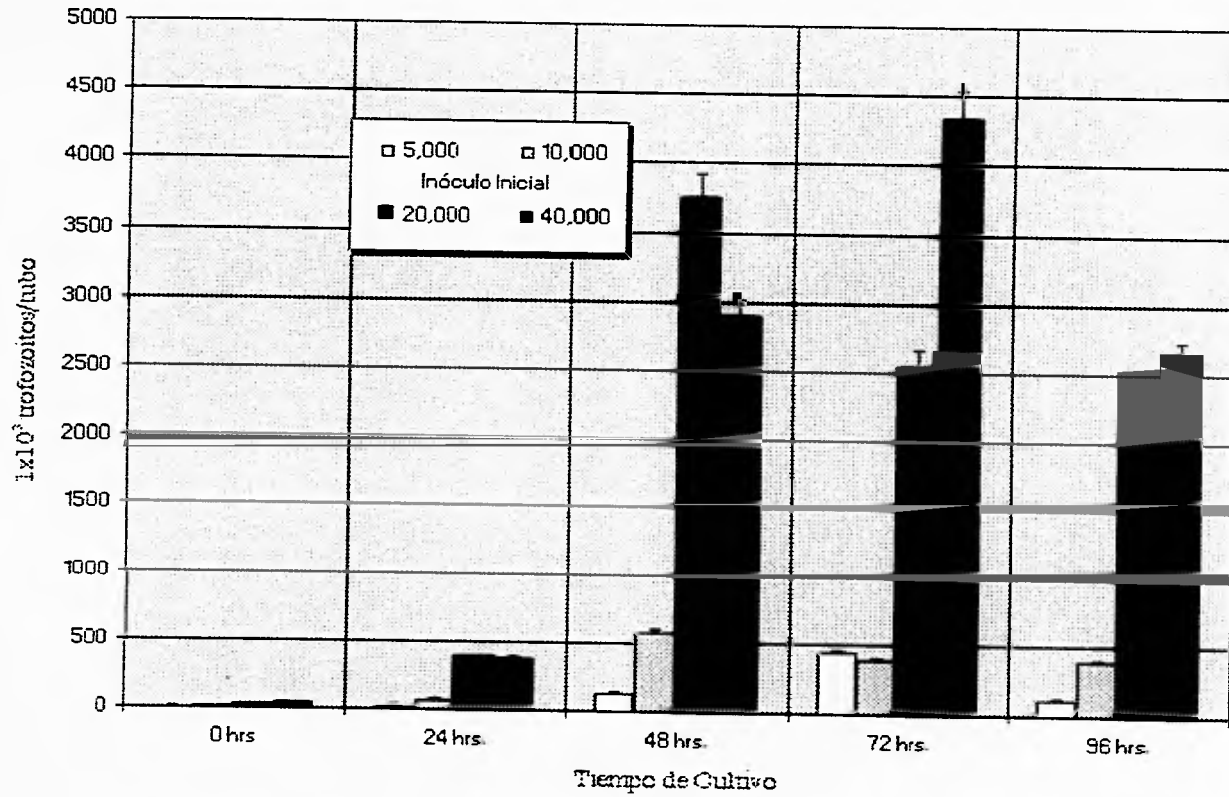
Para los diversos ensayos de crecimiento se encontró que las condiciones óptimas de cultivo en medio monoaxénico de Robinson se presentaron con un inóculo inicial de 20,000 trofozoitos (Tubos C) a 48 hrs, por lo que se decidió utilizar las mismas, como las condiciones estándar de cultivo. Para inóculos menores o mayores, la cantidad y la movilidad de los trofozoitos fué menor para todos los tubos. (Ver Tabla 2 y Figura 3)

TUBO	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
A	10000	10000	10000	10000	10000
B	10000	10000	10000	10000	10000
C	20000	20000	20000	20000	20000
D	40000	40000	40000	40000	40000
Condiciones del Cultivo		Buenas	Óptimas	Buenas	Regulares

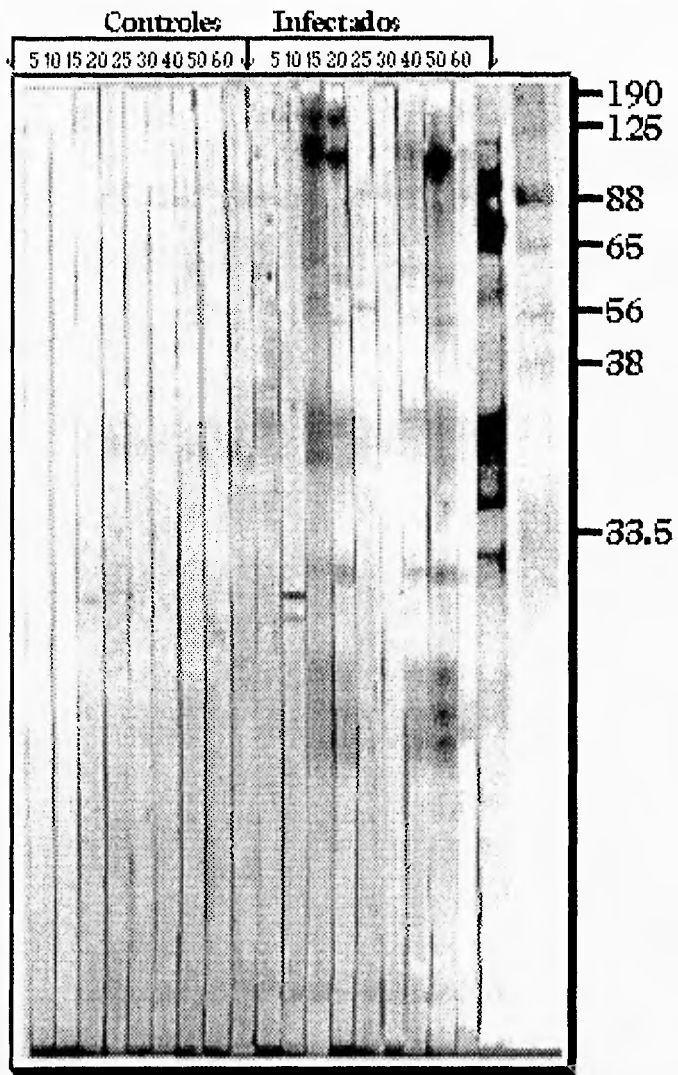
**TABLA 2.** Resultado de los ensayos de la cinética de crecimiento de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en medio monoaxénico de Robinson, cada ensayo se realizó por triplicado, los datos se expresan como trofozoitos totales por tubo.

## OBTENCION DE ANTIGENO TOTAL AMIBIANO.

El antígeno total amibiano fue separado en geles de poliacrilamida al 10 %, los resultados de dicho corrimiento se muestran en la Figura 4. Como se puede apreciar, el antígeno obtenido se encontraba libre de degradación al momento del corrimiento. El patrón de bandeo consistió en 32 bandas, con un un rango de peso molecular entre 250 y 10 KD.



**FIGURA 3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* DE LA CEPA HM1:IMSS EN MEDIO MONOAXÉNICO DE ROBINSON. LOS DATOS REPRESENTAN EL PROMEDIO DE TRIPPLICADOS.**



**FIGURA 4.** Patrón de aparición de los distintos anticuerpos para el ensayo de inmunoelectrotransferencia, los números por encima de las tiras indican el día postinfección en el cual se obtuvo el suero utilizado para cada una. Los números a la derecha indican los marcadores de peso molecular.

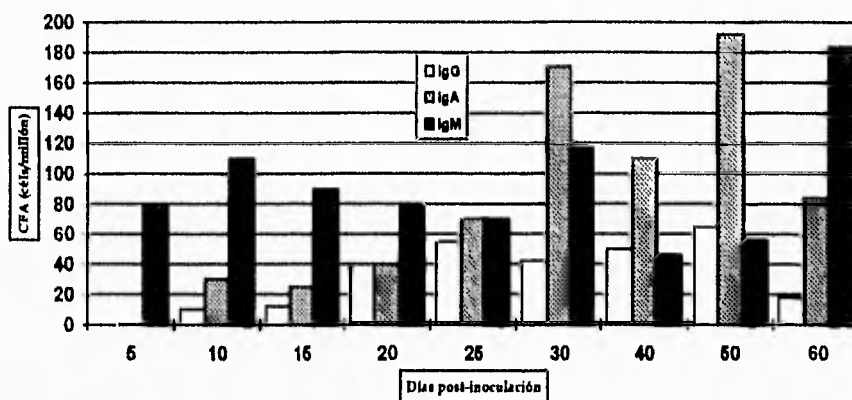
## OBTENCION DE LINFOCITOS Y SUERO INMUNE.

El rendimiento promedio de células linfoides fué de 100,000 cél/animal en el caso de Placas de Peyer y de 375,000 cél/animal para bazo. La viabilidad obtenida para los linfocitos extraídos mediante perfusión a partir de bazo y placas de peyer tuvo un promedio del 90 % para todos los ensayos.

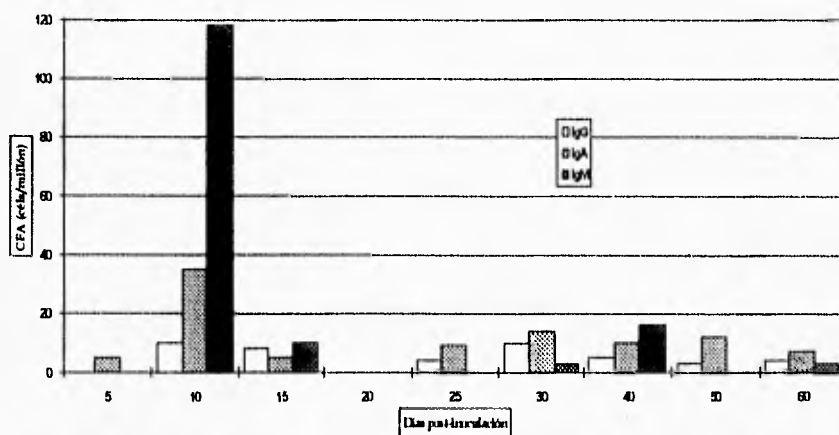
## INFECCION DE LOS ANIMALES Y CINETICA DE LA INFECCION.

A lo largo de los distintos tiempos post-inoculación pudimos encontrar trofozoitos de *E. histolytica* viables en el ciego de los ratones experimentales, algunos de los animales incluso mostraban invasión a otros tejidos por los trofozoitos, siendo los principales sitios de migración el hígado y el peritoneo. En el caso de los animales control, ninguno mostraba la presencia de amibas, ya sea en la luz del intestino o en otros tejidos.

Durante la cinética de aparición de células formadoras de anticuerpos, como puede apreciarse en la figura 5, en el caso de la IgM se observó un incremento en el día 10 post-infección, seguido de una disminución en la cantidad de CFA alrededor de los días 15-25, volviendo a subir el día 30, decreciendo los días 40-50 e incrementándose en el día 60. En el caso de las células formadoras de IgA, la respuesta comenzó a incrementarse el día 25, con un segundo pico en la respuesta al día 50 y decreciendo el día 60. Finalmente, la población de células formadoras de IgG comenzó a elevarse los días 20-25, manteniéndose un nivel constante hasta el día 60, en el cual finalmente decreció. A nivel general, la respuesta humoral en contra de *E. histolytica* mostró un incremento paulatino durante los primeros 25 a 30 días, manteniéndose hasta el día 60. Así mismo, observamos una alternancia en la aparición de células formadoras de anticuerpos para IgA e IgM, en la cual durante los días en los que la población de CFA para IgA permanece alta, la población de CFA para IgM mantiene un nivel bajo, mientras que durante aquellos días en los que la respuesta de IgM fué alta, la respuesta de IgA disminuyó; este tipo de respuesta es distinta de la observada para IgG, en la cual la respuesta se incrementa hasta el día 20 y mantiene su nivel. La respuesta humoral observada a nivel local (en placas de Peyer) fué transitoria y de poca magnitud (ver Figura 6).



**FIGURA 5. CINÉTICA DE APARICIÓN DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS PARA BAZO EN RATONES DE LA CEPA C3H/HeJ INOCULADOS CON *E. histolytica*. EN TODOS LOS CASOS SE HAN RESTADO LOS CONTROLES.**

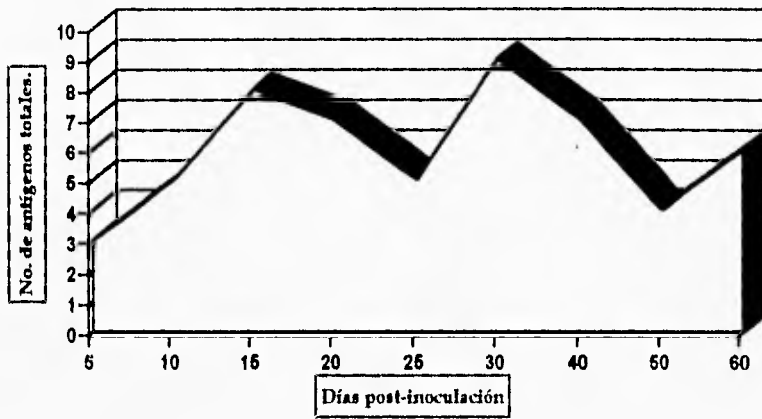


**FIGURA 6. CINÉTICA DE APARICIÓN DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS PARA PLACAS DE PEYER EN RATONES DE LA CEPA C3H/HeJ INOCULADOS CON *E. histolytica*. EN TODOS LOS CASOS SE HAN RESTADO LOS CONTROLES.**

## INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

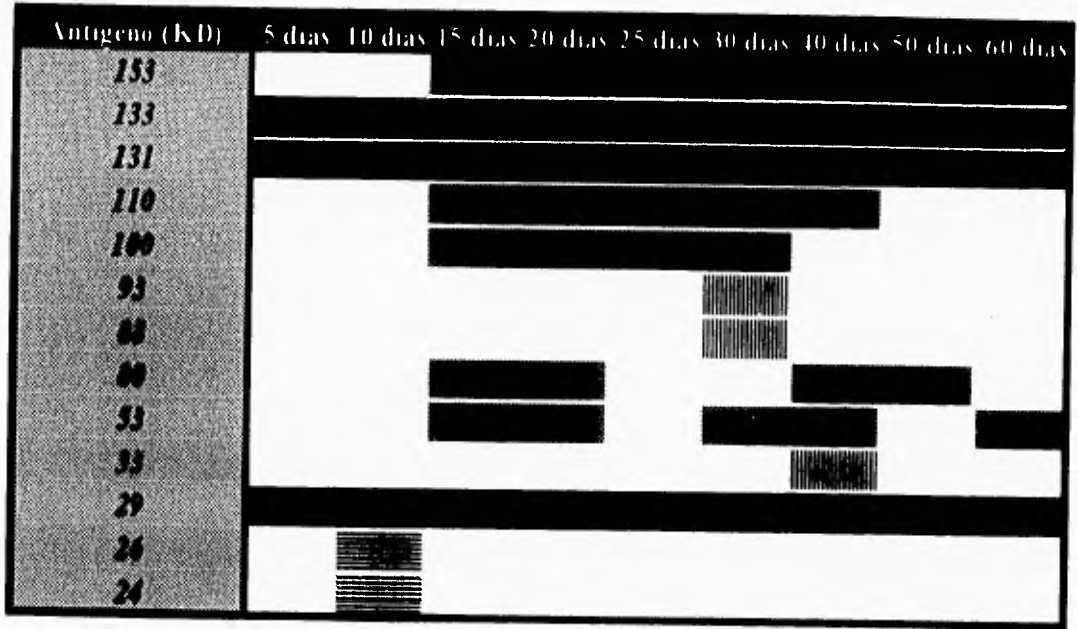
Con respecto a los ensayos de inmunoelectrotransferencia, para el caso de los tres isotipos de anticuerpos ( $\alpha$ -IgG,  $\alpha$ -IgA,  $\alpha$ -IgM) por separado, se obtuvo una reactividad nula, salvo en el caso de IgA, para el cual se obtuvo un patrón de reconocimiento de proteínas únicamente para el día 15 en los animales infectados. Sin embargo, en el ensayo realizado con anticuerpos totales conjugados con peroxidasa, se obtuvo el patrón que se muestra en la figura 4. La aparición de antígenos a lo largo de la cinética se muestra en la figura 7, fue posible detectar dos picos de máxima aparición en los días 15 y 30 de la cinética, y en los días 5, 25 y 50 con el menor número de antígenos.

Tanto los sueros de los ratones control, así como aquellos provenientes de ratones inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* mostraron reactividad a lo largo de la cinética para antígenos de 48, 44 y 29 kD. Fue posible detectar otro grupo de antígenos (153, 133, y 29 kD) para los cuales los sueros control mostraron cierta reactividad, aunque esta fué de mayor intensidad en el caso de los sueros de los ratones infectados. Entre los antígenos que fueron reconocidos de manera exclusiva por los sueros de los animales infectados (110, 131, 100, 93, 88, 80, 53, 33, 26 y 24 kD), fué posible distinguir cuatro grupos principales de antígenos (ver Tabla 3): aquellos que son reconocidos inicialmente durante las fases tempranas de la infección (26-24 KD), aquellos que aparecen en el medio (153, 110, 100, 80, 53 KD), un grupo de antígenos tardíos (93, 88, 33 KD) y finalmente, aquellos que son reconocidos a lo largo de toda la cinética (133-131, 29 KD).



**FIGURA 7. GRÁFICO DE APARICIÓN DE ANTÍGENOS RECONOCIDOS POR EL SUERO INMUNE DE RATONES C3H/HeJ A LO LARGO DE LA CINÉTICA DE INFECCIÓN CON *E. histolytica*.**





**TABLA 3.** Cinética de aparición de los distintos antígenos durante el desarrollo de la infección con *E. histolytica* en ratones C3H/HeJ (las líneas horizontales representan los días de aparición de los antígenos tempranos, las líneas diagonales indican a los inmunógenos tardíos, las barras en gris representan a los antígenos medios y finalmente, las barras en negro representan aquellos antígenos que son reconocidos a lo largo de toda la cinética).

Para los antígenos reconocidos a lo largo de la cinética fué posible establecer una cierta correlación con otros antígenos reportados en la literatura, como se muestra en la Tabla 4.

PESO MOLECULAR (kDa)	REPORTE	PESO MOLECULAR REPORTADO	DÍA DE APARICION	FUNCION BIOLÓGICA
153	Espinosa & Palomo, 1991 Rodríguez, Orozco & Arroyo, 1994	150 160	15 - 60	Desconocida
133-131	Talamas, Hernández & Romales, 1994	140	5 - 60	Adhesión a células Proteína similar a $\beta$ -1 Integrina
110	Arroyo & Orozco, 1987	112	15, 25 - 40	Adhesión a células
100	Avila & Calderón, 1993	102	15 - 30	Colagenasa de tipo 1 Proteasa asociada a membranas
93	Torian, <i>et al.</i> , 1989 Bruchhaus & Tannich, 1994	96 95	30	Desconocida Acetaldehído/Alcohol Deshidrogenasa
88	Rodríguez, Orozco & Arroyo, 1994	90	30	Adhesión a células
80	Espinosa & Palomo, 1991	80	15 - 20, 40 - 50	Desconocida
53	Stanley, <i>et al.</i> , 1990 Rodríguez, Orozco & Arroyo, 1994	52 56 50	15 - 20, 30 - 40	adhesión a células Cistein-proteasa
33	Lohia & Samuelson, 1994 Chadee, <i>et al.</i> , 1988	33 35	40	Adhesión a células Serina/Proteína Kinasa
	Santiago, <i>et al.</i> , 1994	37		Subunidad menor de la lectina con afinidad por galactosa
29	Torian, <i>et al.</i> , 1990	30	5 - 60	Receptor de Fibronectina Desconocida
26 - 24	Bruchhaus & Tannich, 1992 Rodríguez, Orozco & Arroyo, 1994	25 24	10	Colagenasa de tipo 1 Superóxido Dismutasa
				Adhesión a células

TABLA 4. Correlación de los antígenos detectados mediante inmunoelectrotransferencia con antígenos reportados previamente en la literatura.

# *DISCUSSION*

## CULTIVOS DE *Entamoeba histolytica*.

El mantenimiento de los cultivos monoaxénicos de *Entamoeba histolytica* en condiciones óptimas dependió principalmente del inóculo inicial de trofozoitos y la cantidad de antibióticos utilizada, sin embargo ambos factores se relacionan con un tercer factor clave: la regulación de la densidad poblacional de *Escherichia coli* en el medio. El papel de las bacterias en los cultivos monoaxénicos y su influencia en el desarrollo de los trofozoitos de *E. histolytica* no ha sido elucidado totalmente, algunos autores han postulado que las bacterias juegan un papel muy importante al crear un potencial negativo de oxidoreducción y por lo tanto de condiciones anaeróbicas, asimismo los productos secundarios del metabolismo bacteriano deben de ser utilizados como nutrientes por los trofozoitos. Por otra parte el sobrecrecimiento de las bacterias induce una disminución en el pH del medio y la liberación de gases nocivos para el crecimiento de las amibas.

## MODELO MURINO DE AMIBIASIS INTESTINAL.

Con base en la importancia que plantea el conocimiento de las etapas tempranas de la interacción hospedero-parásito en el desarrollo de la amibiasis, es de suma importancia para la validación de cualquier modelo *in vivo* de amibiasis intestinal realizar una caracterización de los cambios morfológicos y fisiológicos del epitelio intestinal que acompañan a la inoculación de trofozoitos de *E. histolytica* por vía intracecal.

A pesar de que la existencia de modelos *in vivo* de amibiasis intestinal se remonta a más de un siglo, la mayoría de los modelos con los que se cuenta actualmente muestran una serie de limitantes que no ha permitido la implementación de estudios sobre el desarrollo de la enfermedad desde su inicio hasta sus etapas tardías. En nuestro laboratorio contamos actualmente con un modelo *in vivo* de amibiasis intestinal para el que previamente han sido caracterizadas las lesiones que acompañan a las etapas tempranas de su desarrollo (Kumar, *et al.*, 1994); de manera breve, los resultados encontrados muestran la presencia de lesiones similares a las que han sido detectadas en biopsias provenientes de pacientes con un diagnóstico clínico de

amibiasis intestinal, incluyendo ulceraciones, erosión y perforación del epitelio (Pitman, *et al.*, 1973). La respuesta inflamatoria asociada a la infección amibiana es una respuesta mixta que incluye la presencia de neutrófilos y eosinófilos durante las fases tempranas de la misma; además, fué posible determinar al epitelio interglandular como la zona inicial de invasión a la mucosa.

La elección de un hospedero para el desarrollo de dicho modelo es un paso muy importante, pues aunque se han desarrollado modelos en animales tales como macacos, conejos, gerbos, perros y gatos, la falta de uniformidad genética y de una caracterización de la misma han sido los factores más importantes para restar reproducibilidad a tales modelos. La mayoría de los modelos propuestos hasta el momento hacen uso de la susceptibilidad del hospedero a la infección, a pesar de ello, en muchos casos no ha sido posible demostrar claramente la misma en los animales utilizados, pues existe gran variabilidad en la permisividad a la infección con *E. histolytica* entre los individuos de una misma especie.

Entre los modelos de amibiasis intestinal *in vivo* que se han reportado a la fecha, los dos tipos mejor caracterizados (ver Tabla 5) son:

El "modelo de asa cecal lavada y cerrada" (Anaya-Velázquez *et al.*, 1985), el cual utiliza como hospederos hamsters y cobayos. En este modelo se detiene el tránsito en el intestino mediante la formación de un asa a nivel de la unión ileocecal con el fin de evitar que el parásito entre en contacto con el contenido intestinal; como consecuencia de ello, los animales no sobreviven más de 72 hrs. Sin embargo este modelo ha sido de utilidad para comprender mejor las interacciones iniciales del hospedero con los trofozoitos de *E. histolytica*.

El modelo del Gerbo (*Meriones unguiculatus*) como hospedero, utiliza la susceptibilidad natural del mismo a la colonización de la luz intestinal por trofozoitos de *E. histolytica*, sin embargo, los primeros reportes no indican el tipo de inóculo empleado, mientras que las lesiones presentadas por los animales no son típicas (Chadec, *et al.*, 1985). En 1992, Martínez Palomo *et al.* reportaron el uso de cultivos monoaxénicos de *E. histolytica* asociada a *Clostridium symbiosum*, a pesar de que fue posible observar lesiones amibianas típicas, estas se delimitaron y

Modelo	Hospedero	Inóculo	Manipulación	Lesiones	Duración de la infección	Reproducibilidad	Grupo
Asa cecal lavada y cerrada	Hamster, Cobayo	HMI-IMSS asociada a <i>Clostridium symbiosum</i>	Laparotomía, Formación de la asa cecal.	Típicas	72 hrs.	Sí	Tsutsumi y col., 1985
Jerbo como hospedero	Jerbo	No especificado	Laparotomía	Características del modelo	--	No	Chadee y col., 1985
	Jerbo	HMI-IMSS asociada a <i>Clostridium symbiosum</i>	Laparotomía	Típicas	96 hrs.	No	Tsutsumi y col., 1985
Modelo murino	Ratón	HMI-IMSS asociada a <i>Escherichia coli</i>	Laparotomía	Típicas presencia de amebomas	Trofozoitos viables hasta por un año	Sí	Kumar y col., 1992 Ruiz y col.

TABLA 5. COMPARACIÓN DEL MODELO MURINO DE AMIBIASIS INTESTINAL CON LOS MODELOS *IN VIVO* REPORTADOS CON ANTERIORIDAD.

desaparecieron en un periodo no mayor a 96 hrs., lo cual sugiere que el daño no es muy intenso.

Las ventajas del uso del ratón como hospedero para el desarrollo de la infección con *E. histolytica* radica en su bajo costo, relativa facilidad de manejo y sobre todo en que el ratón, como modelo, se ha caracterizado ampliamente tanto genética como inmunológicamente, por lo que es posible investigar la participación de los factores genéticos en la respuesta inmune del hospedero. A pesar de que reportes anteriores han fallado para demostrar la susceptibilidad natural de diferentes cepas murinas a la infección con trofozoitos de *E. histolytica* (Gold & Kagan, 1978; Owen, 1987; Wijesundera, 1980), nuestros resultados muestran que la cepa C3H/HeJ es naturalmente susceptible a la infección con amibas. Esta diferencia de susceptibilidad podría encontrarse relacionada con el importante papel que desempeñan los macrófagos durante la delimitación de la enfermedad. La cepa C3H/HeJ es una cepa que responde pobremente a la inyección de lipopolisacárido (LPS), un hecho relacionado con la capacidad de activación de los monocitos y la liberación de citocinas por los macrófagos activados (Lei & Morrison, 1988), dicha respuesta atenuada con respecto a otras cepas murinas se debe a la existencia de errores en la vía metabólica de transducción de señales de los macrófagos presentes en los ratones C3H/HeJ (Abu-Lawi & Sultzer, 1994). De manera paralela, se ha propuesto que los trofozoitos de *E. histolytica* son capaces de interferir con el reconocimiento y presentación de los antígenos por los macrófagos mediante un efecto citopático y/o citotóxico (Carvajal, Ruiz & Barjau, 1983). Tanto los cultivos axénicos como los cultivos monoaxénicos son incapaces de inducir la colonización de la luz intestinal por los trofozoitos, sin embargo, la utilización de técnicas conocidas como potenciadoras de la virulencia de los trofozoitos, tales como el pasaje de los trofozoitos a través de hígado de hamster (Gold & Norman, 1979) son suficientes para que los cultivos sean capaces de inducir la enfermedad en los ratones.

Con respecto al modelo murino de amibiasis intestinal y sus ventajas con respecto a otros modelos, podemos decir que éste se trata de un modelo reproducible en el cual el uso de la susceptibilidad natural de la cepa de ratones juega un papel muy importante en el modelo, reduciendo

de manera drástica la manipulación necesaria para el establecimiento de la parasitosis; dado que fue posible encontrar trofozoitos viables en un periodo comprendido entre 5 días y un año, es clara la importancia potencial de nuestro modelo para la caracterización tanto de las interacciones iniciales hospedero-parásito así como en las etapas avanzadas de la infección.

### **OBTENCIÓN DE LINFOCITOS.**

Durante la extracción de los linfocitos a partir de bazo, fué posible determinar el tiempo de incubación con solución hemolítica (buffer de lisis) como uno de los factores cruciales para la obtención de una máxima viabilidad en las células. Si el tiempo de incubación era mayor al utilizado a lo largo de la cinética, la cantidad de células obtenidas era menor y dichas células resultaban más susceptibles a la lisis durante los lavados posteriores.

### **CINÉTICA DE INFECCIÓN.**

En el transcurso de la cinética de aparición de CFA en bazo, se logró observar una respuesta primaria de IgM, la cual es sustituida alrededor del día 25 por una respuesta constituida principalmente por células productoras de IgA. Sorprendentemente, no existe una población de CFA del isotipo IgG comprometida en la respuesta inmune sistémica durante el desarrollo de la infección. Con respecto a la respuesta observada en Placas de Peyer, se ha encontrado en experimentos *in vitro* que dichas células pueden ser inducidas para la producción de anticuerpos, aunque las observaciones *in vivo* demuestran pocas o ninguna célula productora de anticuerpos, por lo cual nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las Placas de Peyer son únicamente un sitio de presentación del antígeno para los linfocitos B, los cuales son incapaces de diferenciarse naturalmente *in situ* después del estímulo antigénico.

Estos hallazgos nos permiten proponer que la respuesta humoral tiene su origen en los nódulos linfáticos asociados a mucosas, y que la respuesta a nivel local es transitoria y de niveles muy bajos. Así mismo, el hecho de que se sustituya la respuesta de IgG (como en una respuesta clásica) por los isotipos IgA e IgM podría deberse al hecho de que las células linfoides precursoras



de IgA presentes en las placas de Peyer al ser activadas por la presencia del estímulo antigénico amibiano migran vía los conductos linfáticos, hacia el bazo y la mucosa intestinal donde llevan a cabo su maduración.

Para la cinética de aparición de CFA, fue posible establecer a las Placas de Peyer como un sitio de presentación de los antígenos amibianos, motivo por el cual la respuesta inmune humoral asociada a mucosas corresponde a una respuesta primaria de baja intensidad y corta duración. Sin embargo la respuesta sistémica corresponde a una respuesta inmune asociada a mucosas, por que aquí se propone que la respuesta inmune activada por *E. histolytica*, se inicia en Placas de Peyer, las cuales funcionan como un sitio para la presentación de los antígenos del parásito; las células linfoides una vez activadas migrarían a bazo para completar su maduración.

### **INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

A pesar de que no fué posible diferenciar de manera clara la aparición de los distintos anticuerpos  $\alpha$ -*E. histolytica* de acuerdo a su isotipo, durante la determinación de la cinética de aparición de antígenos mediante inmunoelectrotransferencia, fue posible detectar la aparición de anticuerpos totales en suero. La aparición de antígenos a lo largo de la cinética muestra dos picos de reconocimiento máximo de antígenos hacia los días 15 y 30, dichos picos corresponden aproximadamente a la duración de la respuesta primaria temprana de IgM y su substitución por la respuesta tardía de IgA.

A lo largo de la cinética de aparición de CFA, fué posible observar una distribución en la aparición de los antígenos. Durante las fases temprana y tardía de la infección fué posible observar principalmente antígenos de mediano a bajo peso molecular (24 a 33 KD), mientras que durante la fase media de la infección, se encontraron principalmente antígenos de alto peso molecular (53 a 153 KD). De acuerdo a ello, proponemos que la aparición de los antígenos detectados durante una infección con *E. histolytica* se encuentra en función del desarrollo de la parasitosis y por tanto es posible explicar la presencia de reportes para los cuales las fracciones antigénicas de *E. histolytica* se

encuentran asociadas ya sea a las proteínas de bajo peso molecular (Ximenez, C. *et al.*, 1992) o a las fracciones de alto peso molecular (Ali Khan y Meerovitch, 1970; Purnima, *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1993).

Es notorio el que la mayoría de las proteínas reconocidas por los sueros de los ratones corresponden a proteasas y proteínas involucradas en la adhesión de *E. histolytica* a su hospedero. Entre los antígenos para los cuales fué posible hacer una correlación con proteínas reportadas previamente en la literatura, destacan:

- ✓ El antígeno de 131-133 KD el cual es reconocido a lo largo de toda la cinética, y que se correlaciona con la proteína de 125 KD reportada por Tannich en 1989, que es altamente inmunogénica, razón por la cual es posible explicar su reconocimiento desde las fases tempranas de la infección y a lo largo de toda la cinética.
- ✓ En el caso del antígeno de 93 KD, podría corresponder con una proteína de 96 KD reportada previamente por Torian (Torian, Lukehart & Stamm, 1987); de manera coincidente, ambos antígenos son capaces de despertar una respuesta inmune durante las etapas avanzadas de la enfermedad.
- ✓ Durante las etapas iniciales y medias de la infección, los sueros de los ratones detectaron un antígeno con un peso aproximado de 53 KD, el cual está involucrado en los procesos de adhesión a células blanco, por lo que probablemente sea capaz de despertar una respuesta inmune desde el inicio de la infección (Stanley *et al.*, 1990).
- ✓ La proteína de 29 KD aquí reportada podría correlacionarse con una proteína de 29 KD reportada por Meraz y colaboradores en 1989, la cual ha sido propuesta por Ravdin como un antígeno protector.
- ✓ Finalmente, en la literatura se ha reportado un antígeno importante en la adhesión a células diana en el hospedero el cual presenta un peso molecular entre 24 - 26 KD. En nuestro análisis fué posible detectar este o estos antígenos en las etapas tempranas de la infección, lo cual concuerda con la idea de su posible papel en la adhesión celular.

## **REFERENCIAS**

- 1) Abu-Lawi, K. I. & Sultzer, B. M. "Differing signals requirements for the activation of macrophages from C3H/HeJ and C3H/OuJ mice." *FEMS* 10 (1994): 31-8.
- 2) Anaya-Velazquez, A. Martinez-Palomo, V. Tsutsumi, A. González Robles. Intestinal invasive amebiasis: An experimental model in rodents using axenic or monoaxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 723(1985)
- 3) Aley, S.B., Scott W.A. & Cohn Z.A. "Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*." *J. Exp. Med.* 152 (1980): 391-404.
- 4) Bruchhaus, I., Brattig, N.W. & Tannich, E. "Recombinant Expression, Purification and Biochemical Characterization of a Superoxide Dismutase from *Entamoeba histolytica*." *Arch. Med. Res.* 23 (1992): 27-29.
- 5) Caballero-Salcedo, A. Viveros, M. Salvatierra, B. Tapia-Conyer, R. Sepúlveda-Amor, J. Gutierrez, G. y Ortiz, L. "Seroepidemiology of Amebiasis in México." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (1994): 412-419.
- 6) Carbajal, R., Ruiz, B. & E. Barjau. "Immunosuppressive effect of *Entamoeba histolytica* extract on hamsters." *Z. Parasitenkd.* 69 (1983):183-189.
- 7) Capin, N. R. *et al.* "Efecto de mercaptoetanol en las reacciones serológicas de la amibiasis invasora." *Arch. Invest. Med.* 4 (1973): 177-180.
- 8) Chadee, K. y E. Meerovitch. "The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33 (1984): 47.
- 9) Cieslak, P. R., H. W. Virgin y Samuel L. Stanley Jr. "A Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mouse Model for Infection with *Entamoeba histolytica*." *J. Exp. Med.* 176 (1992): 1605-1609.
- 10) Das, P. Sengupta, K. Pal, S. Das, D. Pal, C. "Biochemical and Immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*." *Parasitol. Res.* 79 (1993): 365-371.
- 11) Diamond, L.S. "Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*." *Science.* (1961): 336.
- 12) Edman, U. Meraz, M.A. Rausser, S. Agabian, N. Meza, I. "Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J. Exp. Med.* 172 (1990): 879-888.
- 13) Espinosa-Cantellano, M. & Martinez-Palomo, A. "The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics." *Biol. Cell.* 72 (1991): 189-200.

- 14) Ghadirian, E. Kongshavn, P. "Genetic control of susceptibility of mice infection with *E. histolytica*." *Parasite Immunol.* 6 (1984): 349.
- 15) Gold, D & Kagan, I. G. "Susceptibility of various strains of mice to *Entamoeba histolytica*." *J. Parasitol.* 64 (1978): 937-38.
- 16) Guerrant, R.L. "Amoebiasis: Introduction, Current status & Research questions." *Rev. Infect. Dis.* 8 (1986): 218-227.
- 17) Gutierrez, G. "Amoebiasis intestinal." *Boletín Mensual Epidemiología* 6 (1991): 71.
- 18) Islam, A. *et al.* "The prevalence of *Entamoeba histolytica* in lactating women and in their infants in Bangladesh." *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 82 (1988): 99-103.
- 19) Jones, W.R. "The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the antiamebic properties of new compounds." *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 40 (1946): 130.
- 20) Kretschmer, R.R., ed. Amoebiasis: infection and disease by *Entamoeba histolytica*. Boston: CRC press, 1990.
- 21) Kumar, P. G., Mancilla, R. and Ortiz Ortiz, L. "Intestinal amoebiasis: Histopathologic features in experimentally infected mice." *Arch. Med. Res.* 25 (1994): 297-302.
- 22) Kumate, J. Manual de Infectología. Vol. 1. ed. Nueva Ed. México: 1985.
- 23) Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (1970): 227-236.
- 24) Lotter, H. *et al.* "Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amoebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992): 3163-3167.
- 25) Mann, B.J. & W.A. Petri Jr. "Cell Surface Proteins of *Entamoeba histolytica*." *Parasitol. Today* 7 (1991): 173-176.
- 26) Melothra, R.K. "Surface Properties, Pathogenicity and Differentiation of *Entamoeba histolytica*." *Parasitol. Today* 9 (1993): 216.
- 27) Meraz, M.A. *et al.* "Surface molecules of *Entamoeba histolytica* with immunodominant characteristics." *J. Cell Biol.* 107 (1989): 746-750.
- 28) Merino, E. *et al.* "Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces." *J. Clin. Lab. Anal.* 4 (1990): 39-42.

- 29) Miller, M.J. "The experimental infection of *Macaca mulatta* with human strains of *Entamoeba histolytica*." *J. Exp. Med.* 1 (1952): 417.
- 30) Moller, S. A. & Borrebaeck C. A. K. "A filter immuno-plaque assay for detection of antibody-secreting cells in vitro." *J. Immunol. Methods* 79 (1985): 195.
- 31) Navarro-Garcia, *et al.* "Model of Intestinal Amebiasis: Structural and Functional lesions to the rabbit colon mucosa by *Entamoeba histolytica*." *Arch. Med. Res.* 23 (1992): 197-201.
- 32) Owen, D. G. "*Entamoeba histolytica* in inbred mice: evidence of liver involvement." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (1987): 617-20.
- 33) Petri, W.A. Jr. *et al.* "Subunit structure of the Galactose and D-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*." *J. Biol. Chem.* 264 (1989): 3007-3012.
- 34) Petri, W.A. Jr. *et al.* "Monoclonal antibodies directed against the Galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence." *J. Immunol.* 144 (1990): 4803-4809.
- 35) Petri, W. A. Jr. "Invasive Amebiasis and the Galactose-Specific Lectin of *Entamoeba histolytica*." *ASM News* 57 (1991): 299-306.
- 36) Ravdin, J.I. *et al.* "Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with *Entamoeba histolytica*." *J. Infect Dis.* 162 (1990): 768-772.
- 37) Rigotherier, M.C. Vuong, P.N. & P. Gayral. "A new experimental model of cecal amebiasis in rats." *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64 (1989): 185.
- 38) Robinson, G. L. "The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae." *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62 (1968): 285-294.
- 39) Rodriguez, M.A. *et al.* "*Entamoeba histolytica* molecules involved in the target cell-parasite relationship." *Mol. Biochem. Parasitol.* 37 (1989): 87-100.
- 40) Rosales-Encina, J.L. & M. Rojkind. "The Collagenase of *Entamoeba histolytica*." In Molecular Strategies of Parasitic Invasion, ed. A. R. Liss. 559-566. 1987.
- 41) Shandil, R.K. & V.K. Vinayak. "Immunochemical characterisation of a 29-Kda surface-associated molecule of *Entamoeba histolytica* and its recognition by serum from patients with amebiasis." *J. Med. Microbiol.* 36 (1992): 41-45.
- 42) Spice, W.M. & Ackers, J.P. "The Amoeba Enigma.." *Parasitol. Today* 8 (1992): 402-406.

- 43) Stanley, S.L.Jr. *et al.* "Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990): 4976-4980.
- 44) Stanley, S.L.Jr. *et al.* "Serodiagnosis of invasive Amebiasis Using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein." *JAMA* 266 (1991): 1984-1986.
- 45) Swartzwelder, J.C. & W.H. Avant. "Immunity to amebic infection in dogs." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1 (1952): 567.
- 46) Torian, B.E. Lukehart S.A. & Stamm W.E. "Use of a monoclonal antibody to identify, characterize and purify a 96,000-Da surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J. Infect Dis.* 156 (1987): 334-343.
- 47) Torian, B.E. *et al.* "Serologic response to the 96,000-Da surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *J. Infect Dis.* 159 (1989): 794-797.
- 48) Torian, B.E. *et al.* "The 96-Kda antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica* - potential differences in pathogenic and non-pathogenic isolates." *Infect. Immun.* 58 (1990a): 753-760.
- 49) Torian, B.E. *et al.* "cDNA sequence analysis of a 29-Kda cysteine rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990b): 6358-6362.
- 50) Towbin, H. Staehelin, T. & Gordon, J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979): 4350-4354.
- 51) Triszl, D. "Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts." *Rev. Infect. Dis.* 4 (1982): 1154-1184.
- 52) Vinayak, V.K. *et al.* "Uses and limitations in the demonstration of specific circulating immune complexes in patients with amoebiasis." *J. Med. Microbiol.* 32 (1990): 55-65.
- 53) Walsh, A.J. "Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality." *Rev. Infect. Dis.* 8 (1986): 228-231.
- 54) Ximenez, C. *et al.* "Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients." *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86 (1992): 121-127.