



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA RESPUESTA
INMUNOLOGICA Y PROTECTORA DE LA
LECTINA DE 220 KDA DE
Entamoeba histolytica EN EL MODELO
EXPERIMENTAL HAMSTER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
ERENDIRA HERNANDEZ RODRIGUEZ

ASESORES:

M. en C. FEDERICO MARTINEZ GOMEZ
M. V. Z. PABLO MARTINEZ LABAT

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27-2-1999



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación de la respuesta inmunológica y protectora de la lectina
de 220 Kda de Entamoeba histolytica en el modelo experimental hámster.

que presenta la pasante: Eréndira Hernández Rodríguez
 con número de cuenta: 9256262-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 09 de Febrero de 1999

PRESIDENTE	Q.E.B. Idalia Avila Miyazawa	<u>[Firma]</u>
VOCAL	Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	M.V.Z. Pablo Martínez Labat	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	Dr. Andres Romero Rojas	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.B.P. Amparo Londoño Orozco	<u>[Firma]</u>

ESTE TRABAJO FUE ELABORADO EN LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N. EN EL LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA. BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. en C. FEDERICO MARTÍNEZ GÓMEZ CON EL APOYO DE LA CGPI BAJO EL PROGRAMA No. 961311

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional
Autónoma de México, en especial a la
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Un especial reconocimiento a mi
asesor MVZ Pablo Martínez Labat
por su enseñanza y orientación
en la elaboración de esta tesis.

Un especial agradecimiento a:
Q.B.P. Olga Ixta Rodríguez así como
También .
M. en C. Blanca R. Aguilar Figueroa..
M. en C. Carlos Ramón Bautista Garfías
De la E.N. C.B.
Dra. Patricia Talamás Rohana
Biol. Viola Leticia Perez C.
Q.F.B. Elvia Amelia
Del C.I.N.V.E S T A.V.

A todos los sinodales por dedicar su
Valioso tiempo en la revisión de esta tesis.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Agradezco y dedico este trabajo a ellos, a los cuales les doy gracias por todo su apoyo y cariño incondicional y por haberme dado tan buenos y acertados consejos.

Los Quiero Mucho.

A MIS HERMANOS: Juan, Omar y Luis

Por todo el apoyo que me han brindado.
y por los buenos ratos que pasamos
juntos los cuales extraño mucho.

A MIS SOBRINOS: Daniel, Fer, Ale y Paola

Por que me permiten pasar buenos momentos.

A ALEX:

Por todo este camino que hemos recorrido juntos en el cual aprendimos y compartimos alegrías y tristezas. Gracias por tu apoyo y tus consejos.

A Abraham y Salomé Tovar Flores
Por todo el apoyo y asesoría en la
elaboración de esta tesis.

Un especial agradecimiento a la familia:
Morales Rodríguez por todas las facilidades
otorgadas para la elaboración de este trabajo.

A Marcela: por que espero que sigamos siendo
buenas amigas como hasta ahora, gracias por
todos los momentos que hemos compartido.

A mis compañeros de generación: Gaby, Sara,
Zefe, Jacobo, Charly, Gil, Cristina,
Edith, Memo, Rocio, Pedro, Marco....
Por los momentos que pasamos juntos

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE CUADROS	
CAPITULO I. GENERALIDADES	
1.1 Morfología Del Parásito	3
1.2 Características Biológicas Del Parasito	3
1.3 Mecanismos de Patogenicidad	6
1.4 Ciclo Biológico	7
1.5 Epidemiología	10
1.6 Cuadro Clínico	12
1.7 Respuesta Inmune	14
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Biológico	21
2.2 Animales utilizados	21
2.3 Inmunización de animales de experimentación con L-220	21
2.4 Extracto amibiano para Western blott y ELISA	23
2.5 Procedimiento para ELISA	24
2.6 Inmunoelectrotransferencia	25
2.7 Diseño Experimental	29

CAPITULO III RESULTADOS

3.1 Evaluación de la respuesta inmunológica vs. <i>E. Histolytica</i> en el modelo de hamster inmunizado .	30
3.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpo anti- <i>E. histolytica</i> en sueros de hámster mediante ELISA	43
3.3 Evaluación de la Especificidad de anticuerpo anti- L-220 mediante IET.	49

CAPITULO IV DISCUSIÓN

51

CAPITULO V CONCLUSIONES

55

BIBLIOGRAFIA

56

ANEXO

59

ABREVIATURAS

ACF- Adyuvante Completo de Freund

AIF – Adyuvante Incompleto de Freund

Ac - Anticuerpo

Ag – Antígeno

Con-A – Concanavalina A

EDTA – Etilendiamino tetrazolio

E. histolytica: *Entamoeba histolytica*

ELISA - Ensayo Inmunológico ligado a una enzima

IET- Inmunoelectrotransferencia

I.P. – Intraperitoneal

IFN α - Interferón alfa

KDa - Kilodaltones

L- 170 – Lectina Galactosa de 170 kilodaltones

L- 220 – Lectina de 220 kilodaltones

PBS – Buffer de fosfatos

PMSF – Fluoruro de fenil – metil- sulfonil

INDICE DE FIGURAS

PAGINA

Fig a). Estadios en el ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	4
Fig b). Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	9
Fig 1. Búsqueda de la concentración óptima de antígeno	44
Fig 2. Evaluación de Ab vs L 220 de <i>E. histolytica</i> hámster N° 1	45
Fig 3. Evaluación de Ab vs L 220 de <i>E. histolytica</i> hámster N° 2	46
Fig 4. Evaluación de Ab vs L 220 de <i>E. histolytica</i> hámster N° 3	47
Fig 5. Evaluación de Ab vs L 220 de <i>E. histolytica</i> hámster N° 4	48
Fig 6. Evaluación de la respuesta inmunoprotectora de L 220 en hámster no inmune, retado con trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .	40
Fig 7. Evaluación de la respuesta inmunoprotectora de L 220 en hámster no inmune, retado con trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .	41
Fig 8. Evaluación de la respuesta inmunoprotectora de L 220 en hámster inmunizado con L 220 y retado con trofozoitos de <i>E. histolytica</i> .	42
Fig 9. Reconocimiento específico de L 220 por Western Blott	50

INDICE DE CUADROS

PAGINA

Cuadro N° 1. Protocolo de inmunización en hámster	23
Cuadro N° 2. Respuesta Inmunológica vs <i>E. histolytica</i> en el Modelo de hámster inmunizado con L 220 vía I.P	31
Cuadro N° 3. Control inmunizado con ACF y AIF vía I.P.	32
Cuadro N° 4. Tratado inmunizado con L 220 de <i>E. histolytica</i> + ACF y AIF vía I.P.	33
Cuadro N° 5. Control inmunizado con ACF y AIF vía I.P.	34
Cuadro N° 6. Tratado inmunizado con L 220 de <i>E. histolytica</i> + ACF y AIF vía S.C.	35
Cuadro N° 7. Control inmunizado con ACF y AIF vía S.C.	36
Cuadro N° 8. Tratado inmunizado con L 220 de <i>E. histolytica</i> + ACF y AIF vía S.C.	37
Cuadro N° 9. Control inmunizado con ACF y AIF vía S.C.	38

RESUMEN

Entamoeba histolytica, es la causante de disenteria amibiana y absceso hepático amibiano, con significantes amenazas de salud en muchas partes del mundo. Aproximadamente 40 millones de personas desarrollan la enfermedad intestinal o la mayor complicación extraintestinal de absceso hepático amibiano, y al menos 40.000 individuos mueren de amibiasis anualmente.

Uno de los problemas por resolver en la amibiasis es la producción de un antígeno representativo de *E. histolytica* ya que los antígenos localizados en la superficie de la membrana de trofozoitos de esta amiba podrían ser los primeros reconocidos por el sistema inmune en el hospedero.

Se han realizado varios estudios con animales de experimentación, en donde se han empleado lectinas de superficie a partir de lisados de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y se ha visto que ocurre una protección por no presentar abscesos los animales inmunes con dichas moléculas glicoproteicas.

Por lo que en este estudio se evaluó una lectina de superficie (L-220 Kda) la cual ha mostrado ser altamente inmunogénica al ser administrada a animales de experimentación, siguiendo un esquema de inmunización y posterior desafío vía intrahepática con una cepa virulenta de *E. histolytica* HM1:JMSS se obtuvo finalmente una protección inmunológica al no haber el desarrollo de abscesos hepáticos en los animales inmunes al igual que presentaron un elevado título de anticuerpos al ser evaluados los sueros por ELISA.

Esto ofrece la posibilidad de utilizar este conocimiento en el aislamiento de un antígeno con fines profilácticos en amibiasis.

GENERALIDADES

La amibiasis es una enfermedad cosmopolita. su mayor incidencia se presenta en climas tropicales y subtropicales en forma endémica; puede producir lesiones en el intestino grueso así como tener capacidad invasora a otros órganos, manifestándose con la formación de abscesos. (Jiménez Cardoso *et al.* 1989)

La virulencia del parásito, susceptibilidad del hospedero y factores ambientales contribuyen a la variante clínica dando como resultado la amibiasis, esto es pasando de un estado asintomático con organismos no invasivos a colitis y absceso hepático amibiano involucrando principalmente amibiasis invasiva. (Velázquez *et al.* 1997)

La invasividad se acompaña generalmente por la aparición de anticuerpos específicos. los cuales comunmente son utilizados para determinar la presencia o ausencia de amibas. no todas poseen la capacidad invasora. lo que hace difícil justificar la importancia de su presencia en el intestino. (Jiménez Cardoso *et al.* 1989)

El género *Entamoeba* incluye varias especies de parásitos del hombre: *E. histolytica* Schaudinn.1903; *E. hartmani* von Provazek. 1912; *E. coli* (Grassi.1879) Hickson, 1909. y *E. gingivalis* (Gros 1849) Smith y Barrett. 1914. De éstas. la *E. histolytica* es la única causa importante de enfermedad para el ser humano.

La clasificación de las especies de *Entamoeba* está basada en el número de núcleos de los quistes maduros. que pueden ser ocho. cuatro. o uno.

La forma clínica más frecuente es la intestinal y se observa principalmente en niños de ambos sexos a diferencia del absceso hepático amibiano que predomina en adultos del sexo masculino. (Citado por Martínez -Palomo 1986)

1.1 MORFOLOGÍA

Entamoeba histolytica se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales, el trofozoito (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (éstos dos últimos inmóviles). (Velasco-Gutierrez 1993) (Fig a)

En general, las amibas fijadas en cultivo son de forma alargada, tienen lobopodios que hacen protrusión y un uroide en la parte posterior. Las células menos activas tienden a ser esferoidales, sin lobopodios ni uroides; todas muestran aberturas pequeñas en la superficie.

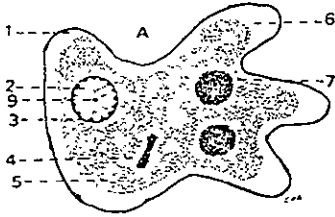
La superficie basal de los trofozoitos, que participan directamente en los fenómenos de adhesión y citólisis, no muestran caracteres morfológicos especiales, a no ser por la presencia de escasos y cortos filopodios en su borde externo.

La asociación con bacterias tiende a aumentar el número de especializaciones de superficie de estas células (Citado por Martínez-Palomo, 1983).

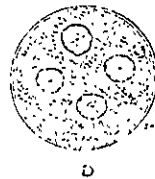
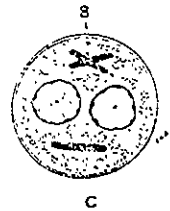
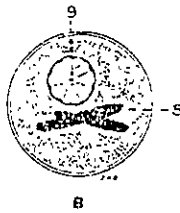
1.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL PARÁSITO

E. histolytica es, al parecer, uno de los organismos eucarióticos más primitivos. La actividad dinámica y el pleomorfismo de los trofozoitos, o formas móviles, están basados en una disposición citoplásmica sencilla, que carece de los siguientes componentes: citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplásmicos; un sistema de membranas equivalente al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico de los eucariontes superiores; mitocondrias, y un sistema de lisosomas primarios y secundarios semejante al que se encuentra en otros eucariontes.

Fig a) ESTADIOS EN EL CICLO DE VIDA DE *E. histolytica*



- A. Trofozoíto
- B. Quiste joven
- C. Quiste binucleado
- D. Quiste maduro (forma infectante)



- 1. Ectoplasma
- 2. Núcleo
- 3. Cromatina
- 4. Vacuola
- 5. Endoplasma
- 6. Seudópodo
- 7. Eritrocito
- 8. Barras cromatoidales
- 9. Endosoma

A pesar de esa simplicidad o tal vez, debido a ella este protozooario pequeño (10-40 μm) y frágil, sensible a ligeros cambios de temperatura, es capaz de colonizar el intestino grueso de un porcentaje considerable de la población mundial. Además, en circunstancias aún desconocidas, puede invadir la mucosa intestinal y eventualmente destruir prácticamente cualquier tejido del organismo humano, desde los epitelios de recubrimiento hasta órganos sólidos y huesos. Al mismo tiempo, el parásito evade con éxito las respuestas de defensas moleculares y celulares del hospedero humano y encuentra los requerimientos necesarios para su multiplicación.

No se tiene certeza sobre las bases moleculares y celulares de procesos fundamentales tales como la diferenciación del trofozoito a quiste, el cambio de comensal inocuo a invasor dañino, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, o los cambios celulares que ocurren durante la división nuclear. (Martínez- Palomo. 1982).

Los primeros en clasificar la especie *Entamoeba* sobre las bases de las propiedades electroforéticas de varias enzimas fueron Reeves y Bischoff (1968), quienes emplearon electroforesis en acetato de celulosa.

Posteriormente, Sargeant y col. (Sargeant y Williams, 1979) realizaron estudios muy valiosos con el auxilio de la técnica enzimática para analizar cultivos de *E. histolytica* provenientes de varios continentes.

Los resultados de esas investigaciones han arrojado la información siguiente:

a) Todas las especies de amibas presentes en el intestino del hombre pueden ser caracterizadas mediante patrones isoenzimáticos característicos.

b) Se han identificado más de 18 zimodemos diferentes de cepas de *E. histolytica* obtenidas en diferentes regiones del mundo.

c) Las amibas cultivadas de muestras de casos bien caracterizados de amibiasis invasora (disenteria amibiana o absceso hepático) pueden ser clasificadas en siete patrones isoenzimáticos diferentes (II, VI, VII, XI - XIV).

d) Todos los zimodemos restantes (I, III-V, VIII-X, XV-XVIII) se encuentran en amibas aisladas de posibles portadores.

1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Generalmente se acepta que existen cepas patógenas y no patógenas de *E. Histolytica*.

De hecho, la mayoría de las personas infectadas con amibas son portadoras sanas de estos protozoarios; por ejemplo, en México se ha calculado que por cada paciente con amibiasis invasora hay cuatro o cinco portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1982).

No existen diferencias microscópicas o ultraestructurales entre las cepas de amibas patógenas y no patógenas (Treviño-García 1973; Martínez -Palomo 1976).

Por esta razón, varios grupos de investigadores han explorado otras características de *E. histolytica* aparte de las morfológicas, que pudieran correlacionarse con el comportamiento biológico de las distintas cepas amibianas.

Tales características pueden dividirse en dos categorías: los "marcadores" de la patogenicidad y los "mecanismos agresivos" del parásito. Cuadro A

POSIBLES FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PATOGENIA DE LA AMIBIASIS

	Mecanismos de Agresión	
Marcadores de la patogenicidad	Membranosos	Solubles
Producción de abscesos en hamster	Colagenasa	B-N-acetil-glucosaminidasa
Aglutinación por Concanavalina A	Proteína formadora de canales iónicos o amibaporo	Factores inhibidores de la quimiotaxis
Adherencia a células epiteliales y glóbulos rojos		Citotoxinas intracelulares
Zimodemos tipos II,VI,VII,X. XI.XII.XIV.		

Cuadro A

Tomado de: Amibiasis. Martínez - Palomo (1989)

1.4 CICLO BIOLÓGICO

Su ciclo vital es sencillo ya que, a diferencia de otros protozoarios patógenos carece de etapas sexuales o de hospederos intermediarios. La forma activa, el trofozoíto, vive en el contenido intestinal y se reproduce en forma binaria. En condiciones aún desconocidas se enquista, dando así origen a la única forma infectante conocida.

Los individuos afectados eliminan quistes de *E. histolytica* en el orden de 45×10^6 al día (tamaño 8-20 μm).

Los quistes pueden sobrevivir fuera del hospedero durante semanas o meses si el medio es húmedo.

La pared de quitina del quiste confiere protección contra la acción destructiva de la acidez gástrica. El desenquistamiento produce un metaquiste cuadrinucleado, que a través de una serie compleja de divisiones nucleares y citoplásmicas culmina en la formación de ocho trofozoítos mononucleados.

Al alcanzar el intestino grueso, estas formas móviles se nutren de bacterias y partículas alimenticias. Algunas amibas son eliminadas con las heces, pero su vida exterior es efímera; aun cuando fueran ingeridas vivas no sobrevivirían el viaje ácido por la porción superior de tubo digestivo. Otros trofozoítos, sin embargo, se enquistan y al salir con las heces completarían este aparentemente simple pero muy exitoso ciclo vital. (Fig b)

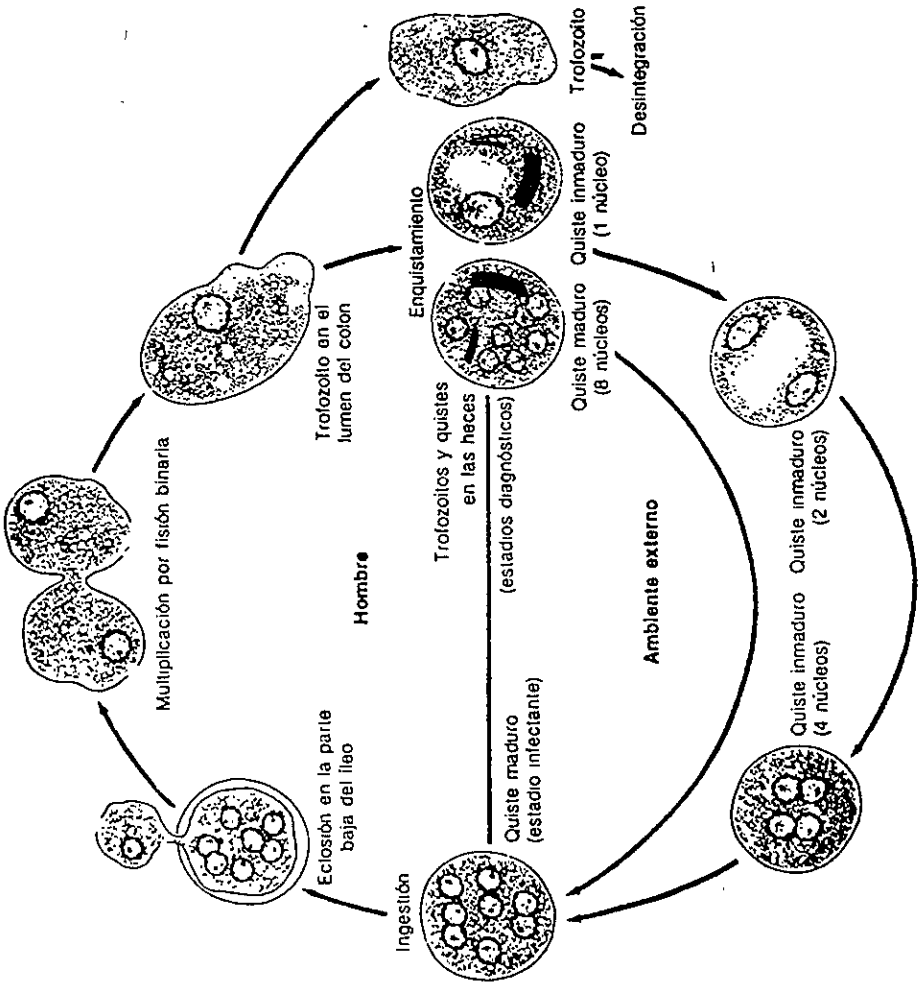
El ciclo vital de la *E. histolytica* no requiere una etapa de invasión tisular. De hecho, en la gran mayoría de los casos, las amibas viven como pacíficos comensales en el colon (amibiasis luminal). En algunos casos, sin embargo, el parásito invade la mucosa intestinal (amibiasis invasora intestinal) primero adhiriéndose al epitelio a través de un ligando con carácter de lectina.

Algunos trofozoítos eventualmente entran en el torrente circulatorio (Aikat, 1979) y pueden originar las formas invasoras extraintestinales de la amibiasis, en primer término el absceso del hígado, al que llegan por la vena porta. (Citado por Martínez-Palomo 1989)

La forma infectante de *E. histolytica* son los quistes. Los cuales permanecen viables e infectantes durante varios días en las heces y pueden sobrevivir en el suelo hasta por 8 días a temperaturas entre 28° y 34° C y durante más de un mes a 10° C; también sobreviven infectantes en agua, agua de mar, aguas hervidas y suelos húmedos, dependiendo de la temperatura.

Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y la transmisión de persona a persona. El mayor riesgo está asociado con los portadores asintomáticos de quistes, especialmente si están dedicados al manejo y preparación de alimentos. La mayoría de los individuos que alojan el parásito son portadores sanos, que por día eliminan hasta 1.5×10^7 quistes en heces.

Fig b) CICLO BIOLÓGICO DE *E. histolytica*



Se estima que en México hay un caso de amibiasis invasora por cada cuatro o cinco portadores asintomáticos. (Sepúlveda 1984).

Otro factor importante en la transmisión es la forma en que se eliminan las excretas humanas en una comunidad. La contaminación fecal de las manos por falta de higiene y la contaminación del agua a través del fecalismo al aire libre que lleva las heces hacia ríos, arroyos o depósitos de agua mal protegidos son dos formas en que las heces infectantes pueden alcanzar altas concentraciones, convirtiéndose en un factor determinante en la transmisión, ya que mientras mayor es la concentración fecal, mayor es el riesgo de transmisión. (Citado por Martínez-Palomo 1989)

1.5 EPIDEMIOLOGIA

La infección por *E. histolytica* es de distribución universal, pero la mayor incidencia ocurre en las comunidades pobres y con mal saneamiento ambiental. La mayoría de los individuos infectados son portadores asintomáticos de este protozooario, ya que *E. histolytica* actuando como comensal, no produce ningún signo o síntoma: sin embargo, como patógeno es la causante de la amibiasis invasora, cuya prevalencia varía de un país a otro. (Sepúlveda *et al.* 1984)

La infección es endémica y ocurre tanto en los países desarrollados de clima templado o frío, como en los países tropicales en vías de desarrollo; sin embargo, es más frecuente en estos últimos. La incidencia mundial de la infección por *E. histolytica* ha sido estimada en el 12 % (W.H.O. Scientific Working Group, 1980).

El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica*, aun cuando pueden encontrarse amibas morfológicamente similares en primates, perros y gatos y ha sido factible transmitir *E. histolytica* a otras especies de mamíferos.

Es importante examinar los contactos cercanos o intrafamiliares de los casos recientemente diagnosticados, ya que es frecuente identificar casos adicionales.

En 1974 el I.M.S.S. realizó una encuesta seroepidemiológica en población sana, para determinar anticuerpos contra amiba por el método de contrainmuno-electroforesis, encontrando un índice de positividad de 5.95% para toda la República Mexicana y de 4.35% para la región norte del país. (Gutiérrez *et al.* 1976)

En otro estudio realizado en El Salvador se observaron frecuencias mayores de positividad en heces (9.3%) y suero (15.7%) en los contactos intrafamiliares de individuos enfermos (caso índice con absceso hepático amibiano, trofozoítos hematófagos o presencia de quistes con prueba de hemaglutinación indirecta positiva) cuando se comparó contra familias testigo (4.4% y 9.4%, respectivamente). (Spencer 1981)

En México, durante la erupción del volcán El Chichonal en 1982, ocurrió una epidemia de amibiasis invasora en un campamento de refugiados de los indios Zoque; la tasa de infección fue del 20% y la etiología amibiana se confirmó en 26 de 96 niños con diarrea aguda- (Citado por Martínez Palomo 1989).

En población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social, la incidencia de la amibiasis ascendió paulatinamente de 2,870.7 casos por 100,000 derechohabientes en 1978 a 3,204.54 en 1982, pero a partir de ese año, la tendencia es descendente, con una tasa de incidencia de 1.833.66 en 1987; ese año se notificaron 591.911 casos que representan el 14.4% de todas las enfermedades transmisibles reportadas. (Boletín Epidemiológico, 1987)

El estudio seroepidemiológico de la amibiasis en la región norte de México obtuvo la tasa de positividad en el siguiente orden descendente: Chihuahua (4.92%), Sinaloa (4.01%) y Baja California Norte (3.78%). (Isibasi-González, 1990)

Se estudió también la prevalencia de anticuerpos contra *E. histolytica* en una población mexicana. Esto fue en 6 de los 32 estados de México, en donde la prevalencia fue mayor que el 6%, y en 10 fue menor que el 2.5%. El estado de Querétaro tuvo la mayor proporción (14.94%) y Quintana Roo la menor con un 0.46%. La prevalencia de Anticuerpos fue mayor en la región del centro de la república, y menor en el sureste. (Isibasi-Navarrete, 1995)

La contaminación directa o indirecta de manos, alimentos o bebidas, con materia fecal humana es necesaria para la transmisión, ya que los seres humanos son la única fuente de infección por *E. histolytica*. y la magnitud de la infección está determinada por el grado de contaminación fecal.

Diferentes estudios muestran una correlación positiva entre la prevalencia de infección y los siguientes factores: descuido en la eliminación de materia fecal (Otto.1980); la distancia entre el lugar de la defecación y la vivienda, así como la presencia de niños pequeños que defecan alrededor o dentro de la casa (Bray y Harris,1977).

1.6 CUADRO CLÍNICO

En general y tomando en consideración los mecanismos de adquisición de la amibiasis y las posibilidades de migración de los trofozoítos en el individuo infectado, generalmente se inicia por vía intestinal. desde el punto de vista clínico, la amibiasis se ha clasificado de la siguiente manera:

I. Amibiasis intestinal

- a) Aguda
- b) Crónica

II. Amibiasis extraintestinal

- a) Hepática
- b) Pulmonar
- c) Cerebral
- d) Mucocutánea
- e) Otras

La amibiasis intestinal aguda, es una de las formas clínicas que se observan con mayor frecuencia. Se caracteriza por la presencia de evacuaciones diarréicas. posteriormente puede evolucionar a síndrome disenteriforme caracterizado por evacuaciones mucosanguinolentas acompañadas de pujo y tenesmo, dolor abdominal que se exacerba con la palpación, disentería fulminante, pérdida de peso, deshidratación, astenia.etc.

Cuando la sintomatología tiene evolución de unos quince días se considera que el caso es agudo; en estos pacientes generalmente hay evacuaciones frecuentes, líquidas o semilíquidas con presencia de moco, sangre y amibas en fase de trofozoítos; cuando los síntomas persisten por más de un mes, en los que se alternan períodos con síntomas leves, constipación y reactivación de períodos agudos. entonces los casos se consideran crónicos, los cuales eliminarán quistes del parásito, con las materias fecales formadas.

La amibiasis intestinal crónica en casi todos los casos evoluciona asintomática y ocasionalmente se presenta en los niños.

Siempre existe el riesgo de que en cualquier momento se torne aguda o se produzca un absceso hepático amibiano.

Se ha denominado amibiasis extraintestinal cuando los trofozoítos que están en el colon, invaden y se establecen en otros órganos de la economía humana.

Como ya se mencionó, el hígado es de los que más frecuentemente son afectados produciéndose entonces la amibiasis hepática que se puede presentar con las siguientes características: microabscesos (pequeños focos necróticos) y abscesos agudos que evolucionan a la formación del absceso crónico.

Al iniciarse las lesiones se ven multitud de "abscesos" microscópicos, formados por un trofozoito o unos cuantos trofozoítos en división y zona de lisis a su alrededor.

Amibiasis hepática. Es un síndrome caracterizado por hepatomegalia, abscesos, fiebre elevada, dolor en hipocóndrio derecho y a menudo leucocitosis con neutrofilia, que se presentan en las personas infectadas por trofozoítos de *E. histolytica* que se hayan establecido en hígado, iniciando su acción lítica y destructora del parénquima hepático.

El inicio de la enfermedad puede ser brusco e inaparente, y el cuadro se suele agravar cuando el absceso hepático se complica con las siguientes maneras:

1) Por ruptura y salida del contenido hacia órganos y cavidades vecinas, estableciéndose los trofozoitos en esos sitios, siendo los más frecuentemente afectados el tórax y cavidad peritoneal: con menos frecuencia estómago, pericardio e intestinos, y eventualmente se fistulizan al exterior e invaden la piel;

2) Diseminación hematogena a partir del absceso hepático. en cuyo caso los trofozoitos de *E. histolytica* serán arrastrados con la sangre al cerebro, pulmón, bazo, riñón, etc.;

3) Puede presentarse infección bacteriana agregada.

1.7 RESPUESTA INMUNE

La adhesión de las amibas a los sustratos depende de mecanismos tanto específicos como inespecíficos. Los segundos intervienen en la adhesión a superficies inertes, mientras que los primeros pueden entrar en juego cuando las amibas se adhieren a células epiteliales en la superficie del parásito y en las de las células blanco.(Kobiler y Mirelman 1981)

No obstante estudios recientes sugieren que el mecanismo molecular de la destrucción de células blanco por los trofozoitos de *E. histolytica* incluyen la disminución de la secreción de la mucosa entérica y la adhesión de trofozoitos a la superficie de los enterocitos, seguido por la lisis de las células.

Dicha capacidad de *E. histolytica* para destruir tejidos ha sido atribuida a diferentes mecanismos histolyticos, así como a fagocitosis, enzimas hidrolíticas, secreción de toxinas y la producción de enzimas proteolíticas. (Ruy Perez - Ostoa 1987)

Numerosos grupos han estudiado las proteasas de extractos amibianos mientras que otros han purificado una o más especies moleculares con actividad proteolítica. La clase principal consiste en Cistein proteinasas. Una proteinasa similar a la Catepsina B la cual fué purificada del parásito. (Ostoa Saloma 1987)

Se dice que las moléculas que median la adhesión son Lectinas localizadas en la superficie de la amiba. Una lectina amibiana que reconoce Galactosa (L-170 Kda) ha sido propuesta como la principal molécula responsable para la adhesión de trofozoitos a mucina colonica y células epiteliales. (Carrero - Diaz 1994)

Se sabe que la respuesta inmune secretora en contra de las moléculas de superficie de la amiba juegan un papel importante cuando estas llegan a la colonización parasitaria de intestino, entonces uno de los mecanismos protectores mediados por IgA es la inhibición de la adherencia de microorganismos y una colonización de este tejido. (Carrero - Diaz 1994)

En un estudio en donde se utilizaron proteínas amibianas parcialmente fraccionadas o purificadas se demostró que la producción de una vacuna efectiva en contra de la amibiasis es posible. (Seguin - Mann 1995)

La mejor molécula candidata en la *E. histolytica* es la Lectina - Galactosa (L-170 Kda), la cual media la adherencia amibiana a mucina colonica humana y al epitelio intestinal teniendo en cuenta esto como un prerrequisito para la invasión. (Seguin - Mann 1995)

La Lectina- Galactosa amibiana es una glicoproteína heterodímera de 260 Kda compuesta de subunidades pesadas de 170 Kda y ligeras de 31-35 Kda semejantes a uniones disulfuro. (Seguin - Mann 1995)

El dominio extracelular rico en cisteína de la subunidad pesada de 170 Kda media la adherencia de *E. histolytica* a células de mamíferos y a mucinas colonicas. Esta subunidad es antigénicamente conservada y es reconocida por mas del 90% de suero inmune humano. (Seguin - Mann 1995)

In vitro la L-170 Kda estimula a los linfocitos T para la producción de IFN α , una citocina importante para los macrófagos. (Seguin - Mann 1995)

No obstante el resultado de la interacción de las amibas lumbales o las invasoras con los elementos efectores de la respuesta inmune (anticuerpos secretores y circulantes, complemento, linfocitos citotóxicos, linfocinas y leucocitos efectores) dependerá de los poderes destructivos de estos elementos y de la eficacia de los mecanismos de evasión que logren desarrollar las amibas.

Recientemente se observó la habilidad de una proteína recombinante rica en serina de *E. histolytica*. (SREHP) para obtener una respuesta inmune protectora en contra de la amibiasis invasiva. Esta es una glicoproteína de superficie amibiana altamente inmunogénica la cual posee multiples repeticiones hidrofílicas dodecapéptidas y octapéptidas.

Algunos pacientes con absceso hepático amibiano produjeron anticuerpos para (SREHP) y con el uso de un antisuero policlonal para la molécula recombinante (SREHP) se inhibió la adhesión amibiana a células de mamíferos. (Zhang *et al.* 1994)

Se ha encontrado también que un Anticuerpo monoclonal (Mab) CD6 en contra de un Antígeno de superficie de la amiba reconoció la superficie lateral de células epiteliales después del cocultivo con trofozoítos. (Leroy *et al.* 1995)

Además tanto los antígenos liberados por las amibas intactas, así como los resultantes de la desintegración amibiana son conceptualmente importantes no sólo porque podrían explicar la inmunización sin previa invasión tisular, sino también por que tales antígenos tendrían un papel importante en la posible formación de complejos inmunes.

El argumento en favor de la existencia de complejos inmunes patogénicos es más plausible teóricamente en condiciones locales, por ejemplo, en el absceso hepático amibiano ya que el líquido del absceso contiene antígenos amibianos así como anticuerpos y complemento este último en concentraciones mucho menores que en el suero,

La lectina específica de 170 Kda primero descrita como una adhesina amibiana por Ravdin *et al.* ha estado implicada en las primeras interacciones trofozoíto-enterocito y en la inmunidad mediada por células antígeno-específicas.(Leroy *et al.* 1995)

El papel esencial de la L-170 Kda en la adherencia de la amiba a células blanco ha sido demostrada con la inhibición de carbohidratos y con las células blanco deficientes en glicosilación. (Leroy *et al.* 1995)

En ensayos de adherencia *in vitro*, la unión de trofozoítos de *E. histolytica* a células ováricas de hamster chino (CHO) fué inhibida en un 90-95% por 50 mM L-170 KDa. (Mc Coy *et al.* 1994).

Significativamente, los trofozoítos también exhibieron la adherencia de L- 170 Kda a células inmunes efectoras humanas incluyendo neutrófilos y macrófagos, así como también glicoproteínas de la mucosa colónica y células epiteliales. (Mc Coy *et al.* 1994)

En modelos experimentales los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño al hígado sugieren que en los primeros estadios de la infección las amibas atraen las células inflamatorias, las cuales destruyen el parénquima hepático después de la lisis. Posteriormente, la destrucción del tejido llega a ser grande, produciendo áreas extensivas de necrosis asociadas con una cantidad de reacciones inflamatorias. (Pacheco-Yepez 1989)

En 1982, dos grupos informaron independientemente el interesante hallazgo de proteínas formadoras de poros en lisados amibianos y en el medio de cultivo en el que las amibas habían crecido.

Lynch y col. (1982) caracterizaron en forma preliminar la molécula formadora de canales como una proteína de 13.000 daltones, concentrada en una fracción que sedimenta a 150 000 x g. La proteína se incorpora espontáneamente a bicapas lipídicas artificiales y a membranas naturales, creando cambios progresivos e irreversibles en la conductancia iónica.

También ha sido reportada una proteína amibiana de 30 Kda en la cual se demostró capacidad para lisar eritrocitos y se insertó dentro de una bicapa de lípidos creando poros. (Mc Coy *et al.* 1994)

Otra proteína distinta formadora de poros de 14 Kda designada como amibaporo, se le encontró también como proteína formadora de canales iónicos. (Mc Coy *et al.* 1994)

Se ha encontrado también una amibaporo de 5 Kda la cual es la única proteína purificada en la cual la secuencia de aminoácidos han sido determinados. (Mc Coy *et al.* 1994)

JUSTIFICACIÓN

La búsqueda y caracterización de antígenos ambientales con propiedades inmunoprotectoras, es actualmente uno de los caminos más importantes en el terreno de la inmunoprofilaxis.

En el presente estudio, se pretende utilizar para su caracterización inmunológica en el modelo de hámster la lectina de superficie de 220 Kda de *E. histolytica*, la cual fue descrita en 1987 por Rosales – Encina y cuyas características son las siguientes: es una glicoproteína de superficie por que es capaz de participar en procesos de adhesión en las células hospederas por otro lado, es capaz de generar altos títulos de anticuerpos en diferentes modelos experimentales y en el ratón. suprime la proliferación de linfocitos T. *in vitro*.

Se desconoce el papel inmunoprotector que pueda desempeñar esta proteína en el modelo de hámster después de aplicar esquemas de inmunización bien definidos, por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto protector que induce la L-220 Kda utilizando dos vías diferentes de inmunización.

HIPOTESIS:

SI LA LECTINA DE 220 Kda PRESENTE EN LA SUPERFICIE DE TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica* . ES INMUNOGÉNICA EN HÁMSTERS. ENTONCES LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR DEBE PARTICIPAR TOTAL O PARCIALMENTE EN LA DISMINUCIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO PROVOCADO POR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TROFOZOITOS DE UNA CEPA VIRULENTE DE *E. histolytica*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL : OBSERVAR EL EFECTO PROTECTOR, INDUCIDO POR LA LECTINA DE 220 KDa DE *Entamoeba histolytica* EN HÁMSTERS INMUNIZADOS.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ESTABLECER UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN EN EL MODELO DE HÁMSTER PROBANDO DOS VIAS DIFERENTES DE ADMINISTRACIÓN.
- DETERMINAR EL GRADO DE DAÑO HEPÁTICO EN HÁMSTERS INMUNIZADOS CON L-220 Y RETADOS CON TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* CEPA HM1:IMSS.
- ESTANDARIZAR LA TÉCNICA DE ELISA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-L220.
- DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-L220, MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.
- EVALUAR LA CINÉTICA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS HACIA LA LECTINA

CAPITULO III.

RESULTADOS

3.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA vs *E. histolytica* EN EL MODELO DE HÁMSTER INMUNIZADO CON LA L-220.

Los resultados de efecto protector de la L- 220 KDa en animales bajo el protocolo de inmunización descrito, se muestran en los cuadros 2 -9.

En los cuadros 2-5 se presentan los resultados del grado de daño que mostraron los animales inmunizados por la vía intraperitoneal expresado como el porcentaje de lesión de acuerdo al peso en gramos del absceso amibiano, con respecto al peso total del hígado.

Como podemos ver los animales que fueron inmunizados con la L-220 (cuadros 2 y 4) se obtuvieron valores del por ciento de daño mucho menores obteniendo así un promedio de lesión del 6.38 % a diferencia de los animales controles (Inmunizados con PBS y ACF) teniendo un promedio de lesión del 38.37 % (cuadros 3 y 5).

Podemos decir que los pesos de los abscesos en ambos grupos de animales controles fueron altos ya que se obtuvieron valores de pesos de abscesos de 3.4g hasta 8.2g (figs 6.7,8)

En los cuadros 6-9 de igual forma se muestran los resultados del grado de daño hepático que tuvieron los animales inmunizados por vía subcutánea, en los grupos de animales controles se obtuvieron abscesos hasta cinco veces mayores que en el grupo de animales inmunizados con la L-220 Kda obteniendo así un promedio de lesión del 53.17 % comparado a un 3.56 % de los controles.

CUADRO 2. RESPUESTA INMUNOLOGICA VS. *Entamoeba histolytica* EN EL MODELO DE HAMSTER INMUNIZADO CON L-220 VIA I.P.

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	9	0	0
2	10	0.7	7
3	9	0.5	5
4	11.1	1.7	15.3
5	7.8	0	0
PROMEDIO			5.5

CUADRO 3. ANIMALES CONTROLES INOCULADOS CON ACF Y AIF VIA I.P. SIN L - 220

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	13	3.8	29.2
2	12.3	4.2	34.1
3	13.9	5.7	41
4	11.3	4	35.3
5	10	3.9	39
PROMEDIO			35.7

CUADRO 4. ANIMALES TRATADOS INMUNIZADOS CON L-220 + ACF Y AIF VIA I.P.

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	9.8	0.6	6.12
2	10.7	1.3	12.14
3	8.4	0.3	3.57
*Muerto en cirugía	PROMEDIO		7.27

CUADRO 5. ANIMALES CONTROLES INOCULADOS CON ACF Y AIF VIA I.P. SIN L-220

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	11.7	3.4	29.05
2	16.1	8.2	50.93
3	13.9	6.3	45.32
4	12.6	4.9	38.88
PROMEDIO			41.04

CUADRO 6. ANIMALES TRATADOS INMUNIZADOS CON L-220 + ACF Y AIF VIA S.C.

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	11.5	0	0
2	10.3	0	0
3	8.3	0.2	2.4
4	9	1.7	15.04
5	9.4	0	0
PROMEDIO			3.53

CUADRO 7. ANIMALES CONTROLES INOCULADOS CON ACF Y AIF VIA S.C. SIN L-220

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	11	32	29
2	12.3	21	17
3		53	43.8
4	10.6	44	41.5
5	11.6	32	27.6
PROMEDIO			31.8

CUADRO 8. ANIMALES TRATADOS INMUNIZADOS CON L-220+ACF Y AIF VIA S.C.

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	7	0.2	2.85
2	6.7	0.3	4.47
3	6.6	0	0
4	7.1	0.5	7.04
PROMEDIO			3.59

CUADRO 9. ANIMALES CONTROLES INOCULADOS CON ACF Y AIF VIA S.C. SIN L-220

HAMSTER	PESO HIGADO (g)	PESO ABSCESO (g)	% DE DAÑO
1	6.9	1.8	26.08
2	6	1	16.66
PROMEDIO			21.37

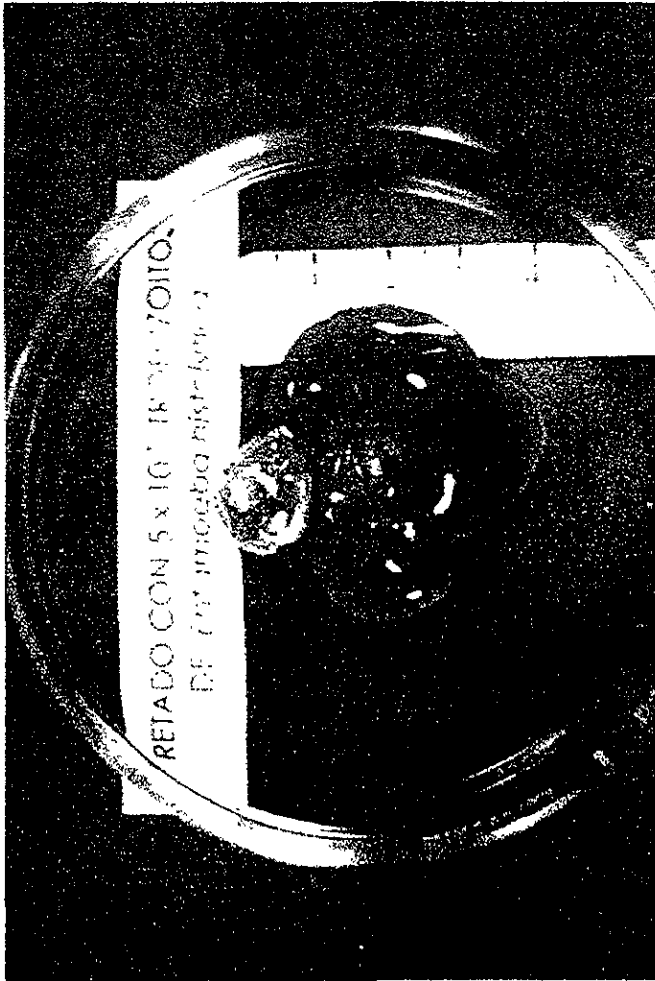
Como se puede observar los pesos de los abscesos para los grupos tratados (cuadros 6 y 8) son pequeños, en contraste a los lotes de animales controles en donde se obtuvieron daños considerables en los hígados de los animales presentando abscesos de hasta 5 g.

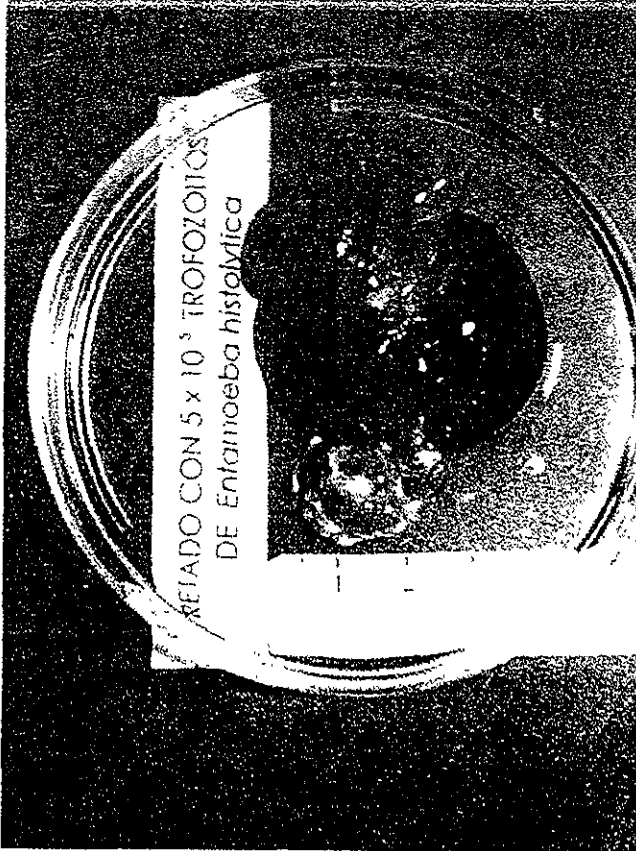
Los valores obtenidos tanto por vía subcutánea como intraperitoneal fueron similares para ambos grupos (controles y tratados) observando el efecto protector de la lectina para aquellos animales que recibieron la inmunización con esta proteína.

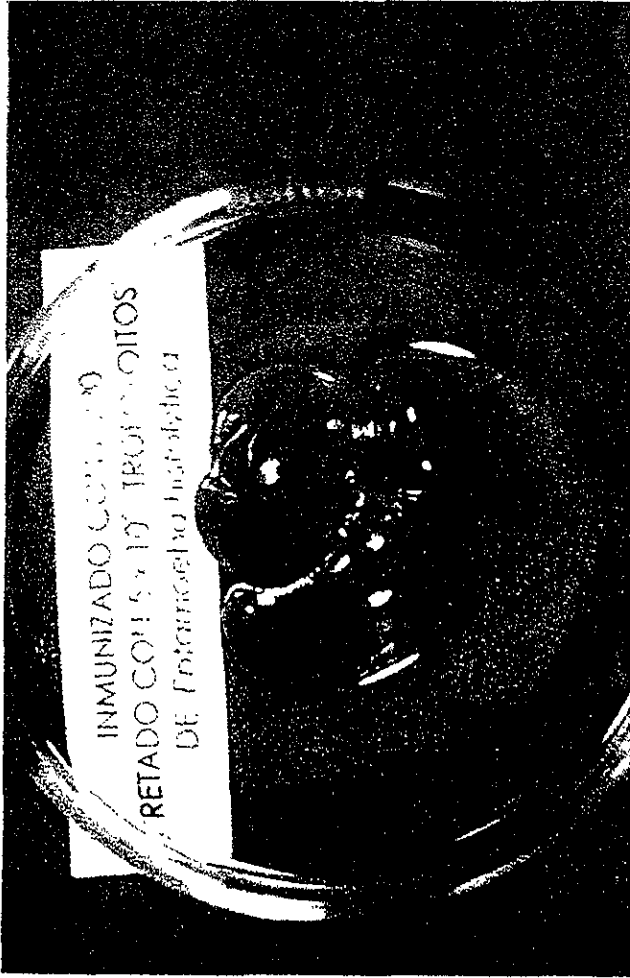
Los resultados en los grupos experimentales tanto por vía subcutánea e intraperitoneal fueron analizados para determinar su significancia estadística utilizando una prueba t student para muestras pequeñas con un porcentaje de confianza del 95 % determinando con esto los intervalos de confianza para cada variable. (Cuadro C)

Cuadro C. Intervalos de Confianza del 95% para los grupos de animales experimentales.

Animales tratados		Animales control	
Vía I.P.	Vía S.C.	Vía I.P.	Vía S.C.
6.14 ± 3.61	3.58 ± 3.07	38.08 ± 4.44	28.8 ± 7.81







3.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI- L220 DE *E. histolytica* EN SUEROS DE HÁMSTER MEDIANTE ELISA.

Para evaluar la concentración de antígeno se realizó una curva de concentración óptima de antígeno (fig 1) en donde se emplearon diferentes concentraciones del extracto de amiba, en donde al emplear una concentración de 30 $\mu\text{cg/ml}$ de dicho extracto se obtuvieron valores de absorbancia mayores a las obtenidas en las otras dos concentraciones empleadas, fue así que se utilizó esta concentración de antígeno (30 $\mu\text{cg/ml}$) para la evaluación de anticuerpos.

Desde la primera inmunización en los animales de experimentación se hizo un monitoreo de anticuerpos en todos los grupos inmunizados, mediante la técnica de ELISA y se encontraron títulos altos tanto en los inoculados por vía subcutánea como intraperitoneal. Figs. 2 - 5.

Se observa en las figs 2-4 que si elegimos un corte en 0.2 obtenemos un título de anticuerpo de 1: 8192. Obteniendo así un promedio de título de anticuerpo de 1: 6144.

Aunque en la fig. 5 las muestras de suero presentaron un título máximo de 1: 4096, no obstante la L-220 Kda fue altamente inmunogénica por los resultados obtenidos en la titulación de anticuerpos. (Tabla 1)

En los gráficos podemos observar que los sueros de hámster que llevaban mas inmunizaciones presentaron valores de absorbancia mayores a diferencia de los sueros de hámster con una o dos inmunizaciones previas.

Búsqueda de la concentración óptima de antígeno

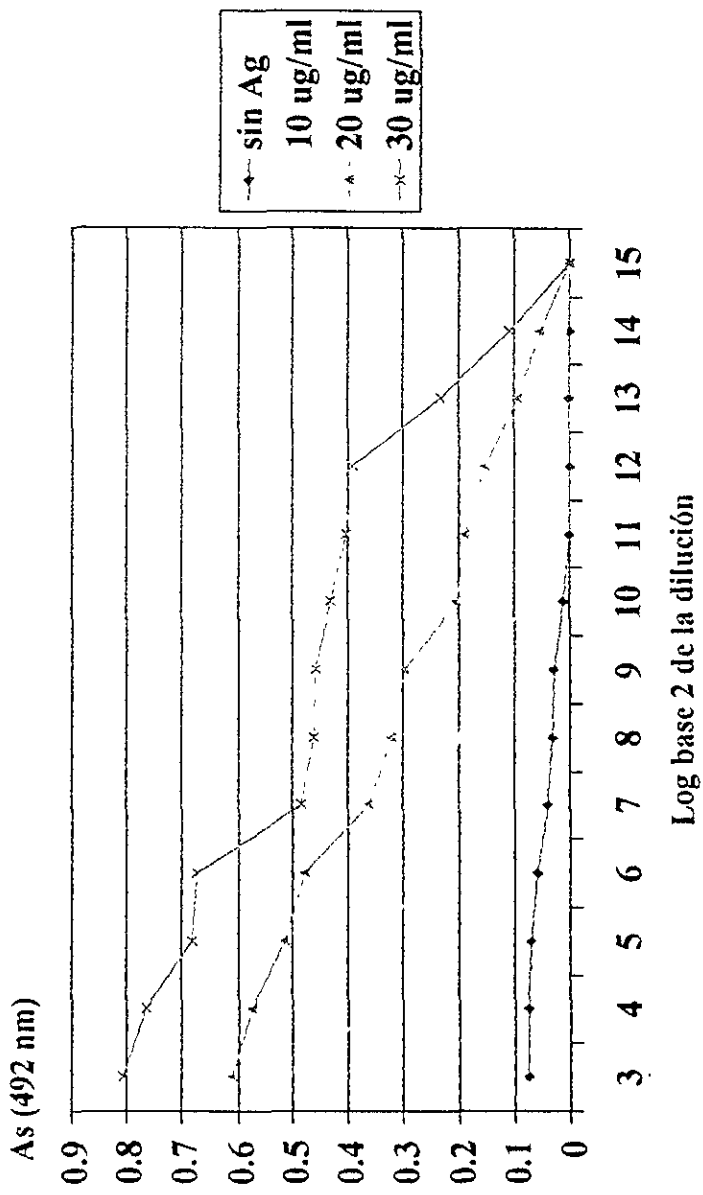


Fig. 1. Búsqueda de la concentración óptima de antígeno mediante ELISA en suero de hámster con 4 inmunizaciones. En la prueba se emplearon diferentes concentraciones de antígeno, utilizando un extracto total amibiano.

Evaluación de Ab vs L 220 de *E. histolytica*

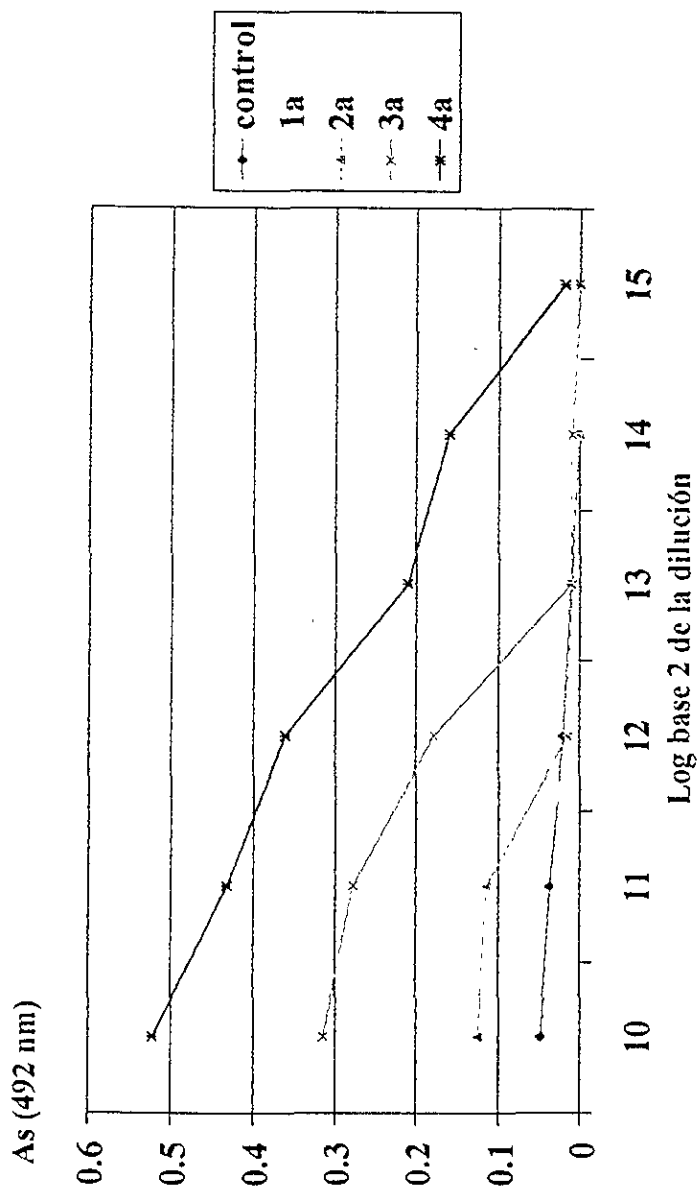


Fig.2. Título de Ab vs L220, determinados mediante ELISA en el suero de hámster 1, inmunizado por vía I.P., 4 veces con 10 µg de L 220. En la prueba, se empleó como antígeno, un extracto total amibiano.

Evaluación de Ab vs L220 de *E. histolytica*

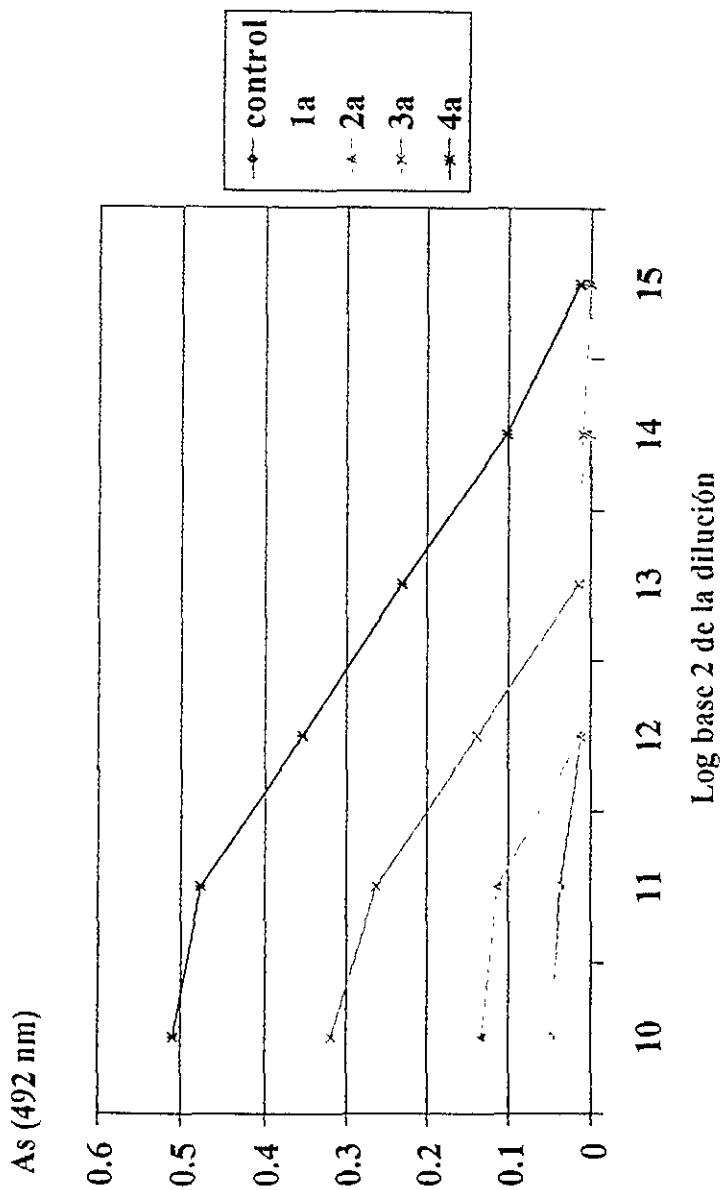


Fig.3. Título de Ab vs L220, determinados mediante ELISA en el suero de hámster, inmunizado por vía I.P.; 4 veces con 10 µg de L. 220.

En la prueba, se empleó como antígeno, un extracto total ambigiano.

Evaluación de Ab vs L 220 de *E. histolytica*

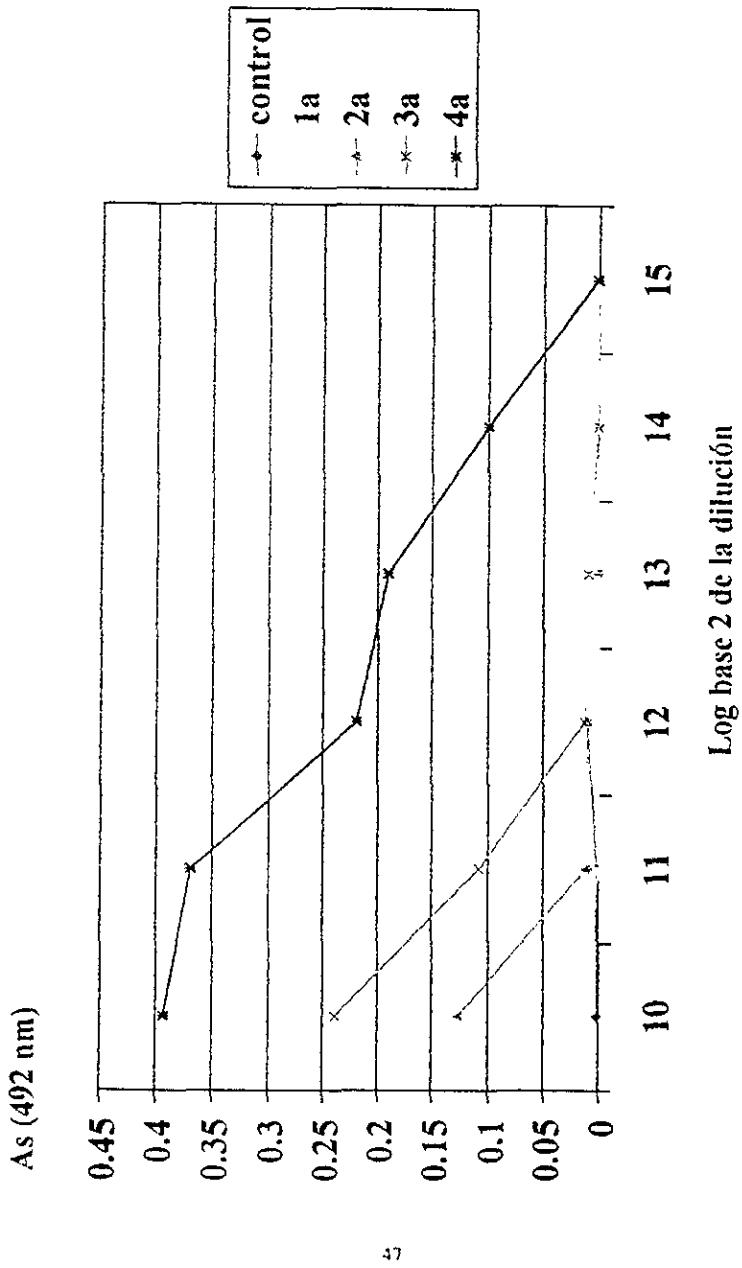


Fig. 4. Título de Ab vs L 220, determinados mediante ELISA en el suero de hámster 3, inmunizado por vía I.P., 4 veces con 10 µg de L 220. En la prueba, se empleó como antígeno, un extracto total ambigiano.

Evaluación de Ab vs L 220 de *E. histolytica*

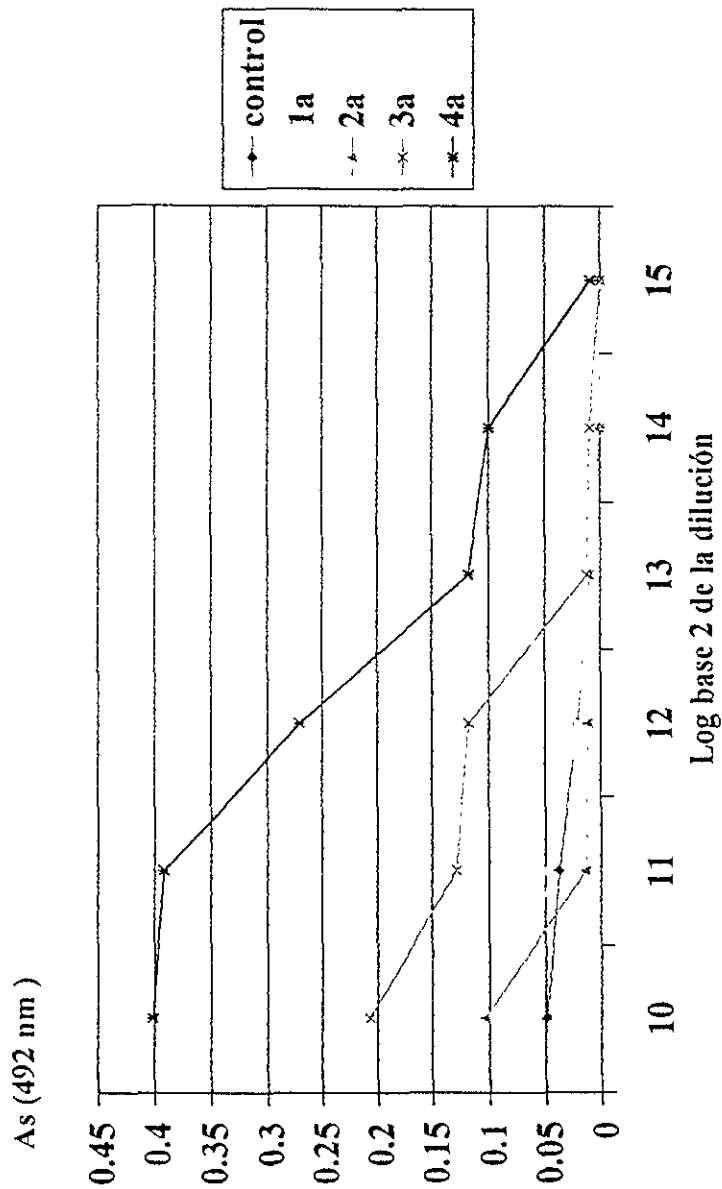


Fig. 5. Titulo de Ab vs L 220, determinados mediante ELISA en el suero de hámster 4, inmunizado por vía I.P., 4 veces con 10 µg de L 220. En la prueba, se empleó como antígeno , un extracto total ambigiano.

TABLA 1. TITULOS DE ANTICUERPOS ENCONTRADOS MEDIANTE ELISA

HÁMSTER	TITULO
1	1:8192
2	1:8192
3	1:4096
4	1:4096

3.3 EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-L220 MEDIANTE IET.

Al realizar la inmunoelectrotransferencia en donde se utilizó el extracto amibiano como antígeno primero se obtuvo una banda la cual correspondió a la de 220 Kda, posteriormente al enfrentarla con sueros problema efectivamente se observó una reacción antígeno-anticuerpo con la presencia de la reacción en el papel de nitrocelulosa. Fig 9.

Kda

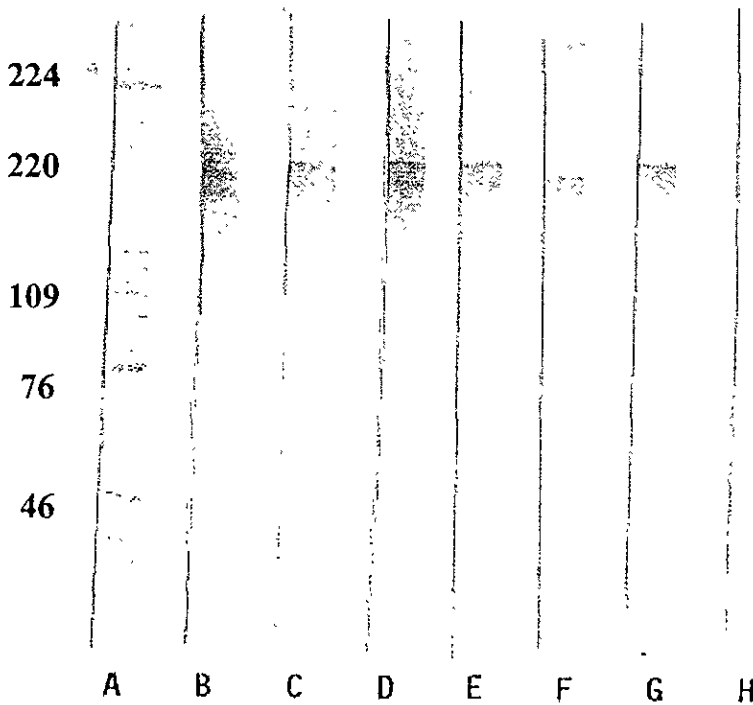


Fig.9. Reconocimiento de L-220 por sueros de hámsters inmunizados mediante Western Blot. La L-220 fue separada electroforéticamente y transferida a papel de Nitrocelulosa. Carril "A" marcadores de peso molecular, carriles "B" a "G" suero de hámster Dil (1:1000), todos los sueros de los animales de experimentación reconocieron al Ag L-220. Carril "H" suero control (No inmune).

CAPITULO IV.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la eficacia protectora de la lectina de 220 Kda obtenida de *E. histolytica* en contra del daño que ocasiona la misma amiba, para esto se utilizaron dos vías diferentes de inmunización en los animales de experimentación (hámsters). Esto se determinó ya sea con la ausencia de absceso hepático amibiano y el incremento en el título de anticuerpos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la parte experimental la L-220 Kda generó protección inmunológica hacia los grupos de animales tratados, al no haber desarrollo en estos de abscesos hepáticos a diferencia de los animales controles en donde si se tuvieron abscesos hepáticos de tamaño considerable.

Cabe mencionar que durante la inoculación intrahepática de los trofozoítos virulentos HMI: IMSS se tuvieron problemas dada la dificultad de la técnica por lo que algunos animales murieron.

En los animales inmunizados por ambas vías con el antígeno (L-220) se confirió protección inmunológica ya que no fue significativo el desarrollo de abscesos y el tamaño de lesión fue hasta cinco veces menor, esto comparado a los animales controles e inmunizados únicamente con ACF y PBS. En estos últimos se observó el desarrollo de abscesos hepáticos amibianos los cuales se caracterizan por producir extensas áreas de necrosis, reacciones inflamatorias agudas y formación de granuloma.

De manera que las dos vías de inmunización empleadas (S.C. e I.P.) resultaron eficientes para obtener finalmente una inmunoprotección.

En otro estudio realizado con la L-220 Kda en donde se probaron las mismas vías de inoculación que nosotros empleamos (S.C. e I.P.) se observó que ambas rutas de inmunización fueron igualmente efectivas para inducir protección en contra de la invasión por *E. histolytica* en animales de experimentación.

Ya que la inmunización vía I.P. protegió a cinco de cinco animales y únicamente uno de los cuatro animales desarrollaron un absceso amibiano cuando la L-220 se administró vía S.C.

En relación a la respuesta inmune humoral, se detectó un buen título de anticuerpo mediante Western blott (dilución 1:1000) después de la segunda inmunización. (Martínez-Gomez, Talamas-Rohana 1997)

Se ha estudiado también la inmunización a hámster utilizando antígenos proteicos de tres cepas diferentes de *E. histolytica* (HM1:IMSS, HJ-1, HM-531) estos antígenos fueron mezclados con ACF, en dicho estudio se produjo una respuesta humoral primaria que se incrementó, diez días después al llevar a cabo un desafío intrahepático y finalmente se demostró una correlación entre susceptibilidad e infección y la inmunidad protectora desarrollada.

De igual manera, en los animales inmunizados y desafiados se desarrolló absceso hepático, caracterizado por ser pequeño (0.3 a 1 cm de diámetro) y localizado en un lóbulo.

Se concluyó que las diferencias entre las cepas de amibas podrían deberse a concentraciones relativas de los componentes que las constituyen y que el "esqueleto antigénico" es el mismo en todas las cepas; ello da mayor posibilidad de utilizar un antígeno común para desarrollar inmunidad en el hospedero.

También se han realizado estudios utilizando una fusión de proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP) y fusionada también a una proteína unida a maltosa (MBP), todas estas igualmente combinadas con el ACF. En el primer experimento (gpo 1), los gerbos recibieron una inmunización primaria y dos promotoras intraperitonealmente; en un segundo experimento (gpo 2), los gerbos fueron inmunizados por una simple inyección intradérmica. Los gerbos inmunizados con SREHP/MBP en ambos grupos produjeron anticuerpos para SREHP.

Ocurrió una protección completa de absceso hepático amibiano de un 64 % en los animales inmunizados con SREHP/MBP en el gpo 1 y en un 100% en los animales inmunizados con SREHP/MBP del gpo 2. Y no se observó protección en ninguno de los gpos. de gerbos inmunizados con únicamente ACF ó MBP. Estos resultados indican que la molécula SREHP es una posible vacuna para prevenir la infección amibiana. (Zhang *et. al* 1994).

Como ocurre también con la Lectina - Galactosa de 170 Kda (Seguin y Mann 1995) la cual ha conferido protección del 67 a 71% para prevenir la formación de absceso hepático amibiano en el modelo de amibiasis en gerbos; esta lectina es antigénicamente conservada y es reconocida por mas del 90% de suero inmune humano.

Es así como se han realizado estudios con moléculas glicoprotéicas de superficie las cuales participan en procesos de adhesión para las células hospederas y han mostrado ser altamente inmunogénicas como lo ha mostrado también la L-200 Kda, ya que en todos estos experimentos se han encontrado bastante elevados los anticuerpos ya sea por Western bott o ELISA como lo demostró la proteína SREHP en donde se encontró un título de 1:5000.

Este experimento fue diseñado para evaluar si la ruta de Inmunización (I.P., S.C.) podría tener un efecto en la respuesta inmune en contra de la L-220 Kda después de un protocolo de inmunización. En la inmunización via intraperitoneal se protegieron cinco de cinco y cuatro de cuatro animales para cada grupo de animales de experimentación y de igual manera ocurrió con la vía de inmunización subcutánea ya que ningún animal desarrollo un absceso amibiano.

Para la evaluación del título de anticuerpo mediante ELISA se utilizó la concentración de antígeno de 30 µcg/ml. con el cual se logró detectar un título de anticuerpo elevado (1:8192) después de la cuarta inmunización.

La respuesta humoral en los animales inmunizados con el antígeno (L-220) y valorada por el título de anticuerpo se encontró alta a diferencia de los animales testigos en donde se obtuvo una menor o nula respuesta.

La inmunización en animales de experimentación provocó una respuesta sistémica humoral de pronta aparición la cual se detectó alrededor de dos semanas después de la primera inmunización.

En relación a la respuesta inmune humoral que fue evaluada por Western blot se obtuvo un título de anticuerpo alto (Dilución 1: 1000) después de la segunda inmunización, los sueros de hámster fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpo y reconocer la L-220 Kda en el extracto de trofozoítos amibiano.

Debido a los resultados obtenidos y estudios realizados con anterioridad con el uso de lectinas de superficie de *E.histolytica* se espera que este trabajo sea de ayuda para que en un futuro se pueda hacer uso de estas glycoproteínas para la elaboración de una vacuna y contrarrestar los estragos que ocasiona este parásito.

CONCLUSIONES

1. Se comprueba que la L-220 Kda es altamente inmunogénica en hámsters.
2. Induce un estado de inmunoprotección en contra de *Entamoeba histolytica*, manifestándose como una reducción del daño hepático.
3. Las vías de inoculación en esquemas de inmunización definidos, son equivalentes en eficacia.

BIBLIOGRAFIA

1. Araiza L.M., Avila M. C, Muñoz L. (1997) *Entamoeba histolytica*: Role of Surface Proteases on its Virulence. *Archives of Medical Research* 28:175-177.
2. Bayley G.B., Gilmour J.R. y McCoomer E.N. (1994) Roles of target cell membrane carbohydrate and lipid in *E. histolytica* interaction with mammalian cell. *Infect. Immun.*58: 2389-2391.
3. Carrero J.C., Díaz M. Y. y Espinosa B. (1994) Human secretory Immunoglobulin A Anti - *E histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infect. Immun.* 764-767.
4. Carvajal R., *et al.* (1983) Immunosuppressive effect of *Entamoeba histolytica* on hámsters. *Z. Parasitenkd.* 69: 183-189.
5. Cheng Thomas C. 1989. *General Parasitology* . Academic press. Pp 217.220.
6. De Meester F., Shaw E., Scholze H., and Mirelman D.(1990) Specific labeling of Cysteine Proteinases in pathogenic and Nonpathogenic *E. histolytica*. *Infect. Immun.*58:1396-1401.
7. Gadasí H., Kobilec D. (1983) *Entamoeba histolytica* : Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp. Parasit.* 55: 105-110.
8. García G. R., Arroyo R., Mena R. (1997) Involvement of the 112 Kda Adhesin in *E.histolytica* : phagocytosis. *Arch.of Med. Res.* 28 : 166-167.
9. González C.R., Isibasi A., Ortíz V., Sépulveda J., Kummate J. (1995) Prevalence of antibodies against *E. histolytica* in México measured by ELISA. *Epidem. Infect.* 115: 535-543.
10. Guerrant R. L., Brand T. H. (1987) The global problem of amebiasis. Current Status research needs and opportunities for progress. *Rev. Infect. Dis.* 8:218.
11. Isibasi A., González C., Ortíz V., Kummate J. (1990). Seroepidemiología de la amibiasis en la región norte de la República Mexicana . *Arch. Invest. Medical* 21: 163-164.
12. Jiménez C. J., Jiménez E., Bernal M.J., Kummate J. (1989) Inducción de Inmunidad protectora antiamebiana en hámster con Antígenos heterologos. *Rev. Invest. Clin.* 41: 133-140.

13. Leroy A., De Brayne G., Marcel M. Bailey G. (1995) Contact – Dependent transfer of the Galactose – Specific Lectin of *E. histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infect. Immun.* 63: 4253-4260.
14. McCoy J., Mann B. J., Petri W. A., (1994) Adherence and cytotoxicity of *E. histolytica* or how lectins let parasites stick around . *Infect. Immun.* 3045-3050
15. Mann B. J., Dodson J., Schroeder J., (1997) Structure and fuction of the Galactose / N-acetyl D- Galactosamine Inhibitable Adhesin of *E. dispar*. *Arch. of Med. Res.* 28: 168-169.
16. Martínez Gómez F., Pérez C., Talamás –Rohana. (1997) Preliminary Study of the 220 KDa Lectin- Elicited Immune Response in Hámster : Possible Vaccine Candidate. *Arch. of Med. Res.* 28 : 267-268.
17. Meza I. *et al.* (1987). Use of antibodies to characterize a 220 Kilodalton protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156: 798-805.
18. Mineko Shibayama. Campos R., Rámirez Rosales (1997) Morphological Analysis Of amebic liver abscess produced by intraperitoneal inoculation of *E. histolytica* Trophozoites in hámsters. *Arch. of Med. Res.* 28: 207-210.
19. Mineko Shibayama. Velázquez C., Tsutsumi V. (1997) Role of Neutr0ophil in the Pathogenesis of the Amebic Liver lesion in mice . *Arch. of Med. Res.* 28:
20. Martínez Palomo. Capítulos 2 – 4. 7: Amibiasis. Editorial Medica Panamericana (1989). Barcelona (España) : 17- 179.
21. Massod A. Sohail (1976) Immunogenicity of *E. histolytica* antigen fractions. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 68: 300.
22. North M. J., Mattram J.C., Coombs G.H. (1993) *Entamoeba histolytica* trofozoites : A surface – Associated Cysteine Protease. *Exp. Parasitol.* 76: 232-241.
23. Perez M.R., Ostoa-Saloma P., Velazquez M.L. (1987). Catalytic classes of proteinase of *E. histolytica*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 26: 87-98.
24. Palacio-Sanchez. Sandoval J. (1997). Epidemiological Study of amebiasis in Chihuahua, México. *Arch. of Med. Res.* 28:309-310.
25. Ravdin J.J., Croft Y.B., Guerrant R.L. (1990) Cisteine Protcinases of Parasitic Protozoa. *Parasitol. Tod.*

- 26.. Robinson G.L. (1976) }The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:285.
27. Rosales - Encina, J, L. Meza, *et al.*(1987).Isolation of a 220 kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J.Infect. Dis.* 156: 790- 797.
28. Seguin R., Mann B.J., Keller K. (1995) Identification of the galactose – adherence lectin epitopes of *E. histolytica* that stimulate tumor necrosis factor - production by macrophages. *Proced of Nat Acad Sc.* 92: 12175-12179.
29. S epulveda R. (1970) La amibiasis invasora por *E. histolytica* .*Gaceta Med. México.* 100-101
30. Sorice M., Griggi T., Nicodemo G. (1996) Evidence for the existence of Ganglioside molecules in the antigen of *E. histolytica* . *Paras. Immun.* 18: 133-137.
31. Talamás Rohana P., Schjie – Guzmán , Rosales- Encina (1995) T-cell supression and selective in vivo activation of Th2 subpopulation by the *E. histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect. Immun.* 63: 3953-3958.
32. Tay- Lara . 1993 *Parasitolog a M dica*. Mendez Editores.pp53.
33. Walsh A.J. (1986) Problem in recognition and diagnosis of analysis estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228.
34. Zhang T., Cieslak P., Stanley S.L. (1994) Protection of Gerbils from Amebic Liver Abscess by immunization with a recombinant *E. histolytica* antigen. *Infect. Immun.* 62: 1166-1170.
35. Zaman V. (1980) *Atlas de Parasitología Clínica* . Medicina Panamericana Editorial S.A.

ANEXO

REACTIVOS

- * Conjugado con peroxidasa anti- hámster (SIGMA) Catálogo N° A 0545
- * Antihámster
- * Acrilamida (SIGMA)
- * Bis- acrilamida (SIGMA)
- * Trizma base (SIGMA)
- * Acido clorhidrico (MERK)
- * Duodecil sulfato de sodio SDS (SIGMA)
- * Persulfato de amonio (GIBCO BRL)
- * N-N-N-tetrametiletildiamino (TEMED) (SIGMA)
- * Glicina (MERCK)
- * Glicerol(MERCK)
- * Azul de bromofenol (MERCK)
- * Azul de Coomasie R-250 (MERCK)
- * Metanol absoluto (MERCK)
- * Acido acético glacial (MERCK)
- * 2 -B- mercaptoetanol (MERCK)
- * Peróxido de hidrógeno
- * Marcadores de peso molecular (SIGMA) Catálogo N° SDS-6H
- * Papel de nitrocelulosa 0.45 um de poro (SIGMA)
- * Fosfato dibásico monohidratado (Químicos Monterrey)
- * Fosfato monobásico de potasio (Químicos Monterrey)
- * Cloruro de potasio (MERCK)
- * Carbón activado
- * EDTA (Químicos Monterrey)
- * PMSF (Fluoruro de fenil - metil -sulfonil) (SIGMA)
- * TLCK (N-Tosyl-lisil-clorometil-cetona) (SIGMA)
- * TPCK (N-1-Tosylamida-2-fenil-etilclorometil-cetona) (SIGMA)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

EQUIPO

- * Cámara para electroforesis (BIO-RAD)
- * Cámara para electrotransferencia (BIO-RAD)
- * Fuente de poder (BIO-RAD)
- * Potenciómetro (CORNING, M- 103)
- * Espectrofotómetro (JASCO 7800)
- * Microscopio electrónico (CARLZEISS)
- * Balanza analítica y granataria
- * Micropipetas automáticas
- * Campana de flujo laminar (ALDER)
- * Centrífuga (SOLBAT)
- * Microcentrífuga
- * Congelador de -70° C (REVCO)
- * Jeringa Hamilton
- * Agitadores magnéticos
- * Placa para ELISA'S (COSTAR)

Material de uso común en el laboratorio

- * Pipetas graduadas
- * Pipetas Pasteur
- * Vasos de precipitado
- * Matraces Erlenmeyer
- * Matraces aforados
- * Probetas
- * Frascos ambar y transparentes
- * Embudos

Otros materiales

- * Tubos eppendorf
- * Gradillas
- * Cámara de Newbawer (contador de amibas)
- * Jeringas estériles
- * Guantes desechables
- * Papel filtro poro abierto y cerrado