

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEASAS DE CISTEÍNA DE
Entamoeba histolytica Y DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS DEL
HOSPEDERO EN LA AMIBIASIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ALFONSO OLIVOS GARCÍA

MÉXICO D.F.

SEPTIEMBRE DEL 2005

0352132



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ALFONSO OLIVOS GARCIA

FECHA: 19 de septiembre - 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES RUY PÉREZ TAMAYO, IRMGARD MONTFORT HAPPEL Y ALEJANDRO ALAGÓN CANO

DEDICATORIA

A mis padres de quienes he recibido todo el amor, la comprensión, el cariño y el buen ejemplo.

A Cynthia por su amor comprensión, apoyo y todos los momentos de felicidad.

A mis hermanos Ino, Tere, Ofelia, Fermín y Manuel

A mis queridos y adorados sobrinos

A mis tíos y primos, especialmente Alicia y Mary

A mis amigos:

Carlos, Marco Antonio, Damián, Juanita, Víctor, Víctorín, Julio César, Gudiño, Pedro, Mario, Espiri, Patricia, Emma, Bety, Alexis, Ricardo, Andrés, Gloria, Rodolfo, Gabriel, Fernando, Laila, José, Vicente, Margarita, Inés, Daniel, Paco, Eliodoro, Porfirio, Marcela, †César, Jorge, Noemí, †Javier, Gabriela, Raúl, Elizabeth, Marcela, Jesús, Alfonso y demás personajes.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores:

Irmgard Montfort, Ingeborg Becker, Alejandro Alagón, Roberto Stock, Rubén Martínez y Ruy Pérez-Tamayo por su amistad, apoyo e impulso a mi desarrollo personal y académico.

A los miembros del jurado por su amabilidad y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A los técnicos académicos:

Mario Nequiz, Eusebio Tello, Pedro Balderas y Marco Gudiño por el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

Al personal del bioterio:

Ricardo Vargas y Daniel Sánchez por haberme proporcionado animales de excelente calidad.

A mis compañeros de laboratorio:

Rosario, María del Carmen y Augusto por sus consejos.

Al CONACyT por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo a través de la beca 142313.

CONTENIDO

Introducción	1
Hipótesis	8
Objetivos	9
Materiales y Métodos	10
<i>Parásitos</i>	10
<i>Extractos amibianos</i>	10
<i>Purificación de proteasas de cisteína</i>	10
<i>Zimogramas</i>	11
<i>Secuenciación</i>	12
<i>Punto isoeléctrico</i>	12
<i>Anticuerpos policlonales anti-EhCP2</i>	12
<i>Especificidad del anticuerpo anti-EhCP2</i>	13
<i>Purificación de EhCPs por afinidad a sepharosa-IgG anti-EhCP2</i>	13
<i>Efecto de los anticuerpos IgG anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica de las CP purificadas y sobre trofozoítos amibianos axénicos</i>	13
<i>Inmunolocalización de EhCP2 en el absceso hepático amibiano en hamsters</i>	14
<i>Liberación de EhCP2 purificada en el hígado de hamster</i>	14
<i>Resistencia a complemento</i>	15
<i>Citotoxicidad</i>	15
<i>Eritrofagocitosis</i>	16
<i>Actividad hemolítica de E. histolytica</i>	16
<i>Actividad proteolítica inhibible por E-64</i>	17
<i>Zimogramas de trofozoítos amibianos crecidos en E-64</i>	17
<i>Detección de actividad proteolítica intracelular en trofozoítos amibianos vivos</i>	17
<i>Resistencia eléctrica transepitelial</i>	17
<i>Absceso hepático amibiano en hamsters</i>	18
<i>Obtención de hepatocitos</i>	18
<i>Inyección de E. histolytica en hamsters leucopénicos</i>	19

<i>Isquemia focal hepática inducida con microesferas de superdex.....</i>	19
<i>Hipocomplementemia inducida con FHVC.....</i>	20
<i>Inducción de inmunosupresión química en hamsters.....</i>	20
Resultados.....	21
Discusión.....	45
<i>EhCP2.....</i>	45
<i>Inhibición de EhCPs con E-64.....</i>	49
<i>Amibas en hígados de hamster leucopénico.....</i>	50
<i>Amibas en hígado de hamster inmunosuprimido con CsA.....</i>	52
Conclusión.....	54
Bibliografía.....	55
Publicaciones.....	64

RESUMEN

La proteasa de cisteína 2 (EhCP2) se purificó mediante filtración molecular y electroelución, a partir de extractos amibianos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS. En el hígado de hamsters, la EhCP2 incorporada en microesferas inertes de liberación, causó inflamación moderada y necrosis mínima de corta duración. En cortes de hígados de hamsters con absceso hepático amibiano, el anticuerpo policlonal anti-EhCP2 obtenido de conejos, detectó a EhCP2 en la amiba y no fuera de ella, ni en las zonas de necrosis. Además, el bloqueo total de la actividad de las proteasas de cisteína de *E. histolytica* con el inhibidor específico e irreversible E-64, no tuvo influencia en su sobrevivencia, resistencia a complemento, eritrofagocitosis y citotoxicidad, en condiciones *in vitro*. Sin embargo, cuando estas amibas se inyectaron en hamsters con E-64 en circulación, no produjeron destrucción tisular y murieron en corto tiempo. Por otra parte, en el hígado de los hamsters leucopénicos (por radiación gamma), *E. histolytica* no causó destrucción tisular y murió en corto tiempo. La hipocomplementemia e isquemia en estos animales no modificaron este efecto. Además de esto, se observaron numerosos cúmulos de amibas con escaso infiltrado inflamatorio y mínima destrucción tisular, en los hígados de los hamsters inmunosuprimidos con ciclosporina A. Todo lo anterior sugiere que las proteasas amibianas no participan de manera importante en la destrucción de tejidos en el absceso hepático amibiano en hamsters; sin embargo, son necesarias para la sobrevivencia del parásito en este microambiente. Además, las células inflamatorias del hospedero son indispensables para la sobrevivencia de *E. histolytica* y al mismo tiempo, son las principales responsables de la destrucción tisular en este modelo experimental.

ABSTRACT

Amebic cysteine protease 2 (EhCP2) was purified from ethyl ether extracts of axenically grown trophozoites of *E. histolytica* strain HM1-IMSS. EhCP2 enclosed in inert microspheres of superdex caused mild acute inflammation and minimal necrosis of short duration in hamster liver. Polyclonal antibody anti-EhCP2 obtained from rabbits detected EhCP2 inside amebas in hamster liver sections with amebic abscess, but not outside of the parasites or in the necrotic structures. Despite total inhibition of EhCPs activity with E-64, a potent irreversible inhibitor of CPs, in *in vitro* conditions the parasite preserved its viability, replication rate, resistance to complement, erythrophagocytosis and cytotoxicity. However, when these amebas were injected into the portal vein of hamsters with circulating E-64, they failed to cause tissue destruction and died in short time. This situation was also observed in the liver of hamsters made leukopenic by whole-body gamma radiation and with hypocomplementemia plus ischemia. In livers of hamsters immunosuppressed with cyclosporine A, many clusters of well preserved amebas were observed with poor inflammatory infiltrate and minimal tissue destruction. All of these findings suggest that amebic cysteine proteases do not play an important role in tissue damage in experimental acute liver amebiasis. On the other hand, they are necessary for the parasite's survival. Host inflammatory cells are also necessary for *E. histolytica*'s survival and, in addition, are the principal cause of tissue destruction in this experimental model.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis en humanos es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica* (Fig. 1). Este padecimiento es de distribución mundial, tiene alta incidencia en países pobres y es la causa de aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo (Walsh, 1986; WHO, 1997).

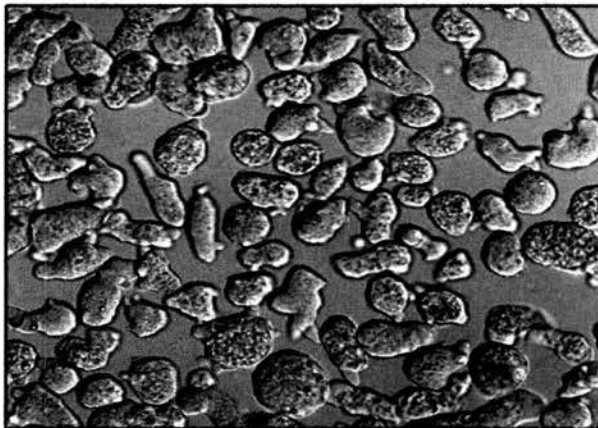


Figura 1. Trofozoitos axénicos virulentos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM-1 IMSS.

La infección se inicia cuando el hombre ingiere agua o alimentos contaminados con quistes del parásito, algunos de éstos al llegar al intestino delgado, se desenquistan y adoptan la forma de trofozoíto. A nivel de colon proliferan, se enquistan nuevamente y al salir junto con las heces están listos para reiniciar el ciclo biológico (Fig. 2). Durante el paso de la amiba por el intestino del ser humano pueden ocurrir tres situaciones: 1) *E. histolytica* no causa daño en su hospedero, lo que se conoce como colonización asintomática; 2) el parásito puede causar daño a nivel intestinal y el más frecuente de estos padecimientos es la colitis amibiana; y 3) en algunas ocasiones esta amiba perfora la mucosa intestinal y se cree que a través de la circulación puede llegar al hígado, en donde causa el absceso hepático amibiano (Huston *et al.*, 1999); además, este parásito ocasionalmente puede causar destrucción en otros tejidos como el cerebro, la piel y el pulmón (Fig. 3).

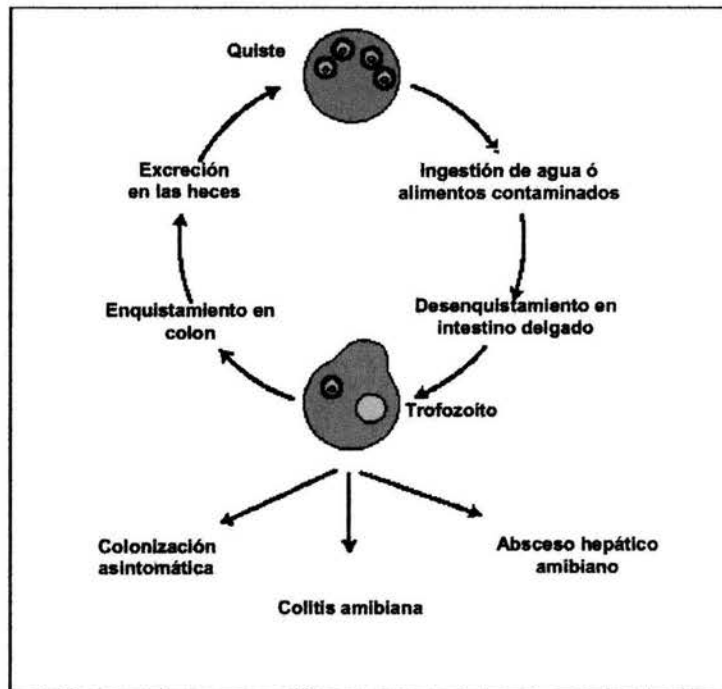


Figura 2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en humanos (Huston *et al.*, 1999).

La amibiasis causada por *Entamoeba histolytica* se caracteriza por inflamación aguda y necrosis en el intestino grueso y en otros órganos (Pérez-Tamayo 1986; Pérez-Tamayo *et al.*, 1990; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000), y lo mismo sucede en varios modelos experimentales de la enfermedad (Tsutsumi, 1988). La frecuencia y extensión de la destrucción de tejidos en humanos y en animales experimentales justifica el nombre histolytica del parásito. Los mecanismos de daño a tejidos en la amibiasis se atribuyen, en parte, a la actividad de varias moléculas presentes en el parásito (Stanley y Reed 2001): 1) amiboporos (proteínas formadoras de poros sin actividad enzimática), 2) fosfolipasas, 3) colagenasa, 4) adhesinas (alguna con actividad proteolítica) y (5) proteasas de cisteína (**CP1-CP19;CP112**

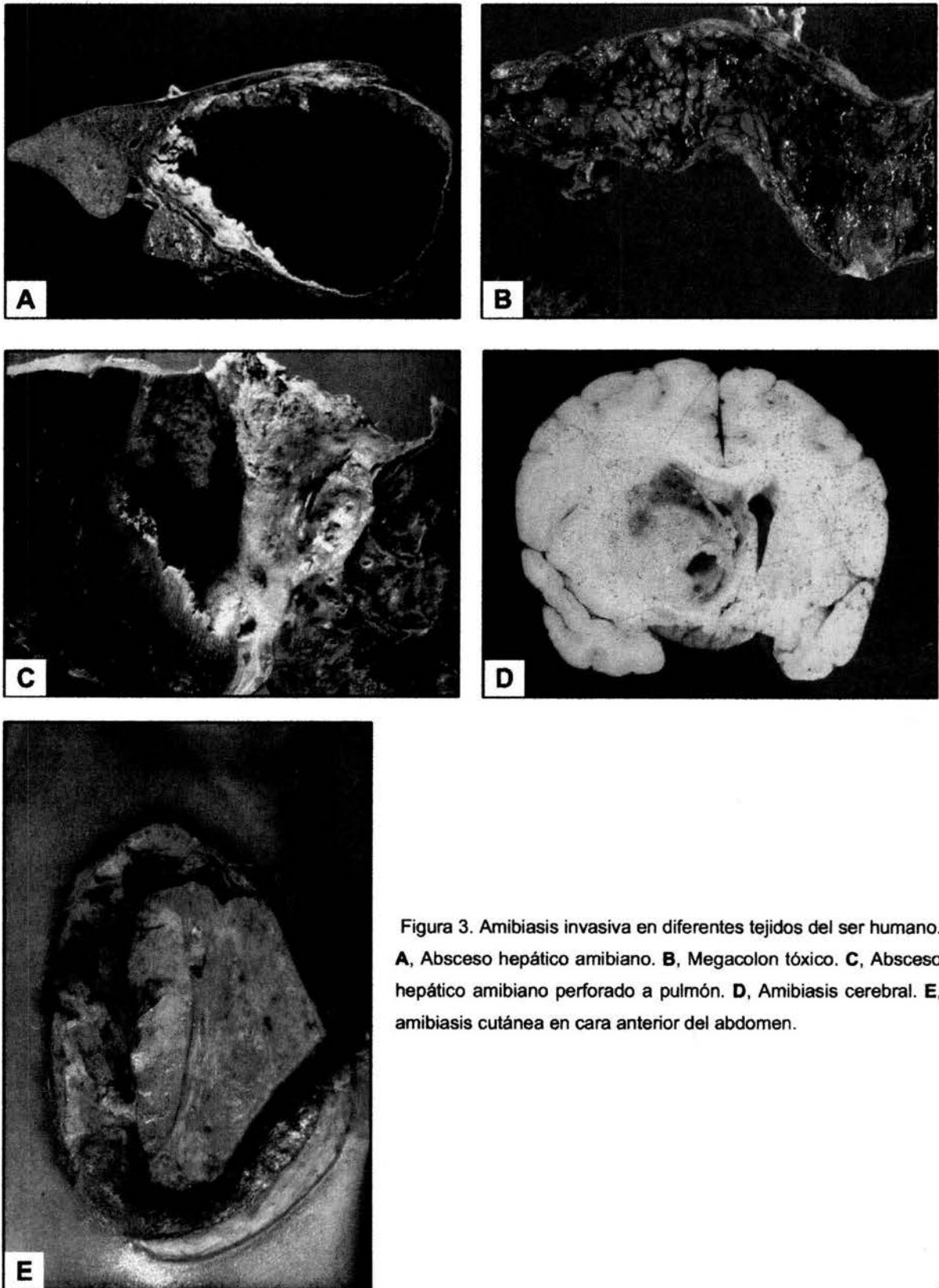


Figura 3. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. **A**, Absceso hepático amibiano. **B**, Megacolon tóxico. **C**, Absceso hepático amibiano perforado a pulmón. **D**, Amibiasis cerebral. **E**, amibiasis cutánea en cara anterior del abdomen.

(Bruchhaus *et al.* 2003)). Sin embargo los datos que apoyan el papel de cada una de estas cinco diferentes moléculas en la destrucción de tejidos no son uniformes y para algunas de ellas son indirectos. Es posible que las moléculas más ampliamente estudiadas en su capacidad para producir daño de tejidos sean las proteasas de cisteína (CPs). Los datos que se conocen hasta la fecha pueden resumirse como sigue

Experimentos in vitro

Las proteasas de cisteína purificadas tienen efecto citopático sobre monocapas de células HeLa (Lushbaugh *et al.*, 1985), células BHK (Keene *et al.*, 1986) y fibroblastos humanos, sin efecto citotóxico. El efecto citolítico sobre hepatocitos muertos de rata y hamster, causado por proteasas de cisteína de 30-kDa se bloquea con el inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64 (Montfort *et al.*, 1993). La disminución de la expresión de CP5 inducida en *E. histolytica* con ARNm antisentido se correlaciona con la disminución de fagocitosis, pero el efecto citopático y la actividad hemolítica permanecen sin cambio (Ankri *et al.*, 1998). La sobreexpresión de CP2 en *E. histolytica* y *E. dispar* da como resultado el incremento del efecto citopático producido por ambas especies (Hellberg *et al.* 2001).

Experimentos in vivo

Los trofozoítos axénicos de *E. histolytica* crecidos en presencia de E-64 (Stanley *et al.*, 1995) o laminina (Li *et al.*, 1995), tienen disminuida la capacidad para producir abscesos hepáticos en ratones inmunodeficientes (SCID). Los lisados de *E. histolytica* virulenta disminuyen la resistencia eléctrica transepitelial en ciego de gerbos y este efecto es inhibido por E-64 (Navarro-García *et al.*, 1995). La disminución de la expresión de CP5, inducida en *E. histolytica* con ARNm antisentido, se correlaciona con la disminución de la capacidad del parásito para inducir abscesos hepáticos en hamster (Ankri *et al.*, 1999). La disminución de la expresión de

CP5 inducida en *E. histolytica* se correlaciona con la disminución de la inflamación, producción de IL-2 y capacidad de las amibas para convertir próIL-1 a IL-1, en intestino humano transplantado a ratones SCID (Zhang *et al.*, 2000).

A pesar de que la información resumida anteriormente sugiere un papel importante para las EhCPs en el daño celular y tisular en la amibiasis, no discrimina entre un efecto proteolítico directo sobre proteínas de la matriz extracelular y un papel *permissivo* de tales enzimas, cuya función primaria podría ser preservar la viabilidad del parásito para permitir a otros mecanismos moleculares dañar células y tejidos. Se sabe que las proteasas de cisteína son capaces de disminuir la expresión de CD4 en linfocitos T (Molinari *et al.*, 2000); además, las CPs son capaces de degradar receptores de macrófagos, lo que podría explicar porqué los macrófagos recuperados de abscesos hepáticos de gerbos no están activados ni son activables por lipopolisacárido (LPS) y tienen disminuida su actividad amebicida, mientras que los macrófagos peritoneales y de bazo obtenidos del mismo animal responden rápidamente a LPS (Denis y Chadee, 1988). Por otro lado, en varios experimentos *in vitro*, la inhibición de las CPs interfiere con el crecimiento y sobrevida de la amiba (De Meester *et al.*, 1990), excepto cuando se usa E-64 (Stanley *et al.*, 1995). Las CPs están presentes en muchas especies de protozoarios (North *et al.*, 1990; Sajid y McKerrow, 2002) y cuando su actividad se bloquea con inhibidores, su ciclo de vida y metabolismo nutritivo se dañan gravemente (Engel *et al.*, 1998). Todo lo anterior sugiere que probablemente las CPs desempeñan papeles esenciales en la fisiología del parásito y por lo tanto se requieren para su sobrevida.

Por otra parte, se ha estudiado la participación del hospedero en la patogenia de la amibiasis experimental. Durante las etapas tempranas del absceso hepático amibiano experimental en hamsters (AHAEH), los dos principales componentes celulares son los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y los mononucleares (Fig. 4). Se cree que la rápida desintegración de los PMNs (con liberación de sus enzimas lisosomales) y otras sustancias son responsables, por lo menos en parte, del daño al tejido hepático (Tsutsumi *et al.*, 1984). También es posible

que la isquemia generada por la inflamación (Pérez-Tamayo *et al.*, 1992) y las lesiones (causadas por el parásito, hospedero o ambos) permitan la sobrevivencia de la amiba, creándole un microambiente favorable de baja tensión de oxígeno y evitándole el contacto con el complemento.

En el presente trabajo se describe un nuevo método de purificación de la EhCP2 a partir de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS cultivados en condiciones axénicas, y también una serie de experimentos *in vivo* para determinar si la proteasa EhCP2 es directamente responsable del daño del tejido en la amibiasis hepática experimental en hamsters. Además, mostramos otra serie de experimentos *in vivo* e *in vitro* para explorar el efecto de la inhibición de las proteasas de cisteína de *E. histolytica* sobre la viabilidad, resistencia a complemento, citotoxicidad y virulencia. Por otra parte, exploramos la participación de la inflamación, el complemento, la isquemia y las lesiones iniciales en la sobrevivencia de la amiba en el AHAEH. Por último, mediante la inmunosupresión en hamsters con ciclosporina A (CsA), determinamos la participación del hospedero en la destrucción tisular durante el desarrollo del AHAEH. Nuestros resultados sugieren que durante el desarrollo del AHAEH, las CPs de *E. histolytica* no participan de manera importante en la destrucción del tejido; en cambio, su función primaria parece ser el procesamiento de nutrientes, que permite la sobrevivencia del parásito *in vivo*. Además, la reacción inflamatoria del hospedero también es indispensable para la sobrevivencia de este parásito en el tejido hepático, ya que en su ausencia el parásito desaparece en corto tiempo. Finalmente, la respuesta inmune innata del hospedero es la principal responsable de la destrucción tisular en el AHAEH.

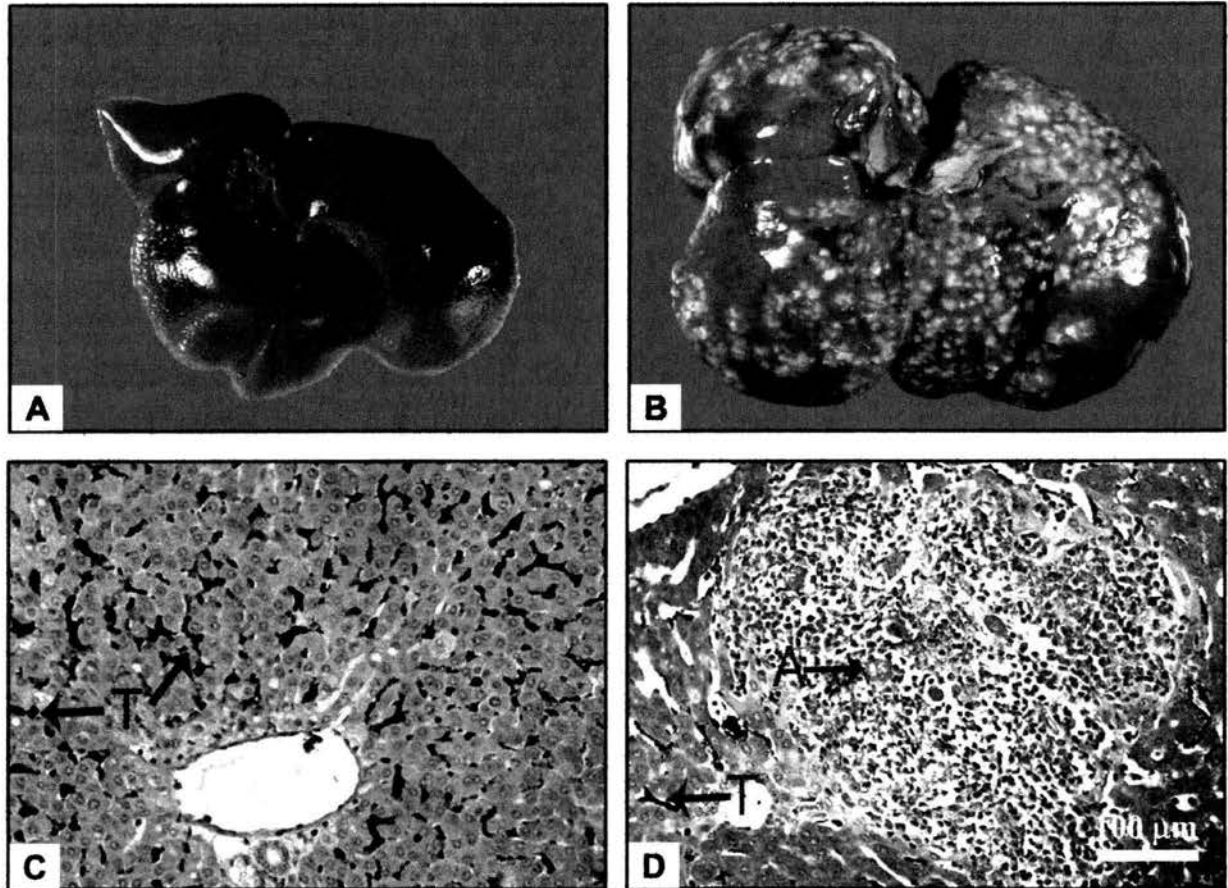
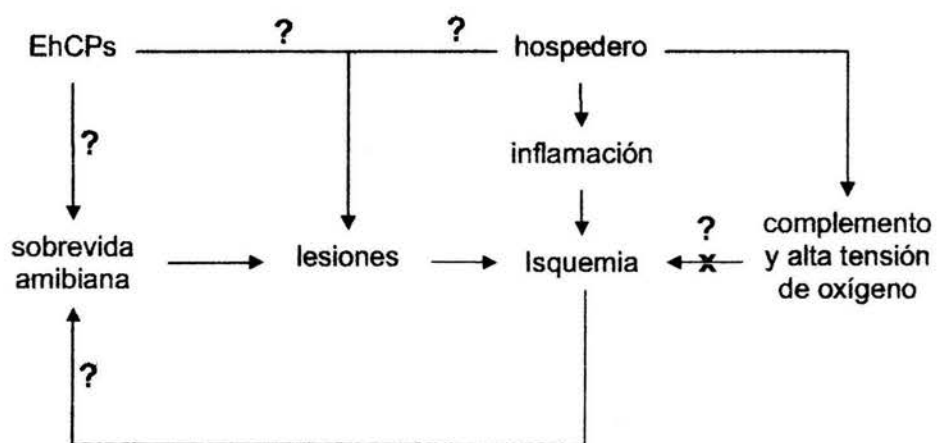


Figura 4. **A**, Aspecto macroscópico del hígado de un hamster normal y de otro con absceso amibiano de 5 días (**B**); se observa hepatomegalia y necrosis en todo el hígado. **C**, Corte histológico de un hígado normal inyectado con tinta china, nótese la tinta china (T) distribuida en todos los sinusoides. **D**, Corte histológico del AHAEH de 24 h de evolución; se aprecian amibas (A) rodeadas por PMNs y necrosis, la isquemia se demuestra por la falta de penetración de tinta china (T) en esta zona.

HIPÓTESIS

ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO AGUDO EXPERIMENTAL EN HAMSTER



Se sabe que durante la evolución del AHAEH, la supervivencia amibiana es esencial para el desarrollo de lesiones, las cuales pueden ser causadas por las CPs del parásito, moléculas del hospedero o ambas. También se sabe que estas lesiones y la inflamación generan isquemia focal y es posible que ésta sea favorable para la supervivencia del parásito al crearle un microambiente de baja tensión de oxígeno y evitarle el contacto con el complemento sérico. Finalmente, las CPs del parásito pueden ser esenciales en el procesamiento de nutrientes y de esta manera también ser esenciales para su supervivencia.

OBJETIVOS

- **Determinar la participación de la proteasa EhCP2 en la destrucción tisular durante el desarrollo del absceso hepático amibiano experimental en hamsters.**
- **Evaluar si las proteasas de cisteína de *E. histolytica* son esenciales para la sobrevivencia de este parásito en la amibiasis hepática experimental en hamsters.**
- **Analizar la participación de las células inflamatorias, la isquemia y el complemento en la sobrevivencia de *E. histolytica* en la amibiasis hepática experimental en hamsters.**
- **Explorar la participación de la amiba y el hospedero en la destrucción tisular en el absceso hepático amibiano experimental en hamsters.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS se recuperaron de un absceso hepático amibiano experimental en hamster (7 días). El cultivo axénico se inició con una densidad de 7×10^5 trofozoítos en 50 ml de medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) en cajas de plástico. Después de 72 h de incubación a 37 °C, los trofozoítos se cosecharon y se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos 15 mM pH 7.2, NaCl 0.15 M (PBS). En algunos experimentos los trofozoítos amibianos se cultivaron por 72 h en medio TYI-S-33, pero en presencia de E-64 (500 μ M). Al final del cultivo, las amibas se contaron con un hematocitómetro y se les determinó la viabilidad por exclusión de azul de Trypan.

Extractos amibianos

Los trofozoítos amibianos (3×10^9) se resuspendieron en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M, HgCl₂ 5 mM, y 250 ml de éter etílico frío. La mezcla se agitó moderadamente por 24 h a 4°C y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min; la fase acuosa se colectó y la fase orgánica se extrajo nuevamente con 100 ml del mismo amortiguador Tris-HCl. Ambos extractos se combinaron y el éter se eliminó por evaporación durante 12 h a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se centrifugó a 18,000 rpm por 30 min y el sobrenadante se almacenó a 5°C. La fase orgánica residual se volvió a extraer con 100 ml del mismo amortiguador, pero aumentando la fuerza iónica de NaCl a 2.5 M.

Purificación de proteasas de cistelina

La purificación se llevó a cabo en dos pasos:

1. Fracciones de 5 ml del extracto amibiano se pasaron por una columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, con dimensiones de 150.0 X 2.2 cm, equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.4,

NaCl 0.5M, 1 mM de HgCl₂, con flujo de 0.4 ml/min. La proteína eluída se detectó a 280 nm y la actividad proteolítica con azocaseína (Pérez-Montfort *et al.*, 1987). Las fracciones con actividad proteolítica se mezclaron, se concentraron a 3 ml (con una membrana de amicon con corte de 3 kDa) y se dializaron con una membrana de 8 kDa de corte en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7.4, HgCl₂ 1 mM.

2. Se mezclaron 2.7 ml de la muestra dializada con 2.3 ml de amortiguador de muestra no desnaturante (H₂O 5.4 ml, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 1 ml, glicerol 0.8 ml, azul de bromofenol al 0.5% 0.4 ml) y se electroeluyó en el sistema 491 Prep Cell (BIORAD), con tubo de gel de 37 mm, 7.2% de gel separador, 4% de gel concentrador, 12 Watts, flujo de 0.75 ml/min y fracciones de 6 ml. Una de cada 10 fracciones se analizó en geles no desnaturantes de acrilamida al 12%, teñidos con solución de plata. Además, también se les determinó actividad proteolítica en zimogramas de geles de acrilamida con gelatina incorporada (Laemmli, 1970). Finalmente, una de cada 3 fracciones de las dos zonas con actividad proteolítica se analizaron de la misma manera.

Los extractos 0.5 M NaCl y 2.5 M NaCl fueron igualmente procesados, excepto que el extracto 0.5 M NaCl fue precipitado con 2 ml de ZnCl₂ 2.5 M por 1 h a 37 °C, enseguida se centrifugó a 20,000 rpm y el sobrenadante se concentró a 12 ml con una membrana YM-3.

Zimogramas

Duplicados de los geles de electroforesis arriba mencionados se sobrepusieron sobre geles de sustrato (acrilamida al 10%, gelatina 0.2%, EDTA 5 mM y DTT 5 mM) y se incubaron por 12 h a 37 °C, se tñeron con solución de azul de Coomassie 0.1%, metanol 20% y ácido acético 10%, y se destñeron con la misma solución pero sin el colorante.

Secuenciación

Cuando la proteasa de cisteína parecía suficientemente pura (ver resultados), una muestra de la fracción II del extracto NaCl 0.5 M fue enviada a "The HHMI Biopolymer/W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory" en la Universidad de Yale en los EEUU, para la secuenciación de los 13 aminoácidos del extremo amino terminal de la enzima.

Punto isoeléctrico

Se determinó el punto isoeléctrico a la muestra EhCP2 purificada y secuenciada mediante isoelectroenfoque en gel preparativo y resolutivo, con intervalos de pH 3.0-10.0 y 4.0-6.5 respectivamente (Pharmacia).

Anticuerpos policlonales anti-EhCP2

El procedimiento fue similar al descrito por Montfort *et al.*, (1994). Se emulsificó 1 ml de EhCP2 hervida (200 µg) con 1 ml de adyuvante completo de Freund y esto se inyectó en un conejo por vía intramuscular y subcutánea. Después de un mes, 100 µg de la proteasa hervida se administró de la misma manera y 7 días después 100µg de la proteasa hervida se inyectó por vía intraperitoneal. Otro conejo se inmunizó de la misma manera pero con la proteasa inhibida con E-64 10 µM y sin hervir. Ambos animales se sangraron una semana después del tratamiento, se obtuvo el suero y se determinó la presencia de anticuerpos mediante doble inmunodifusión en agar, contra un extracto amibiano de éter y EhCP2 purificada. La IgG se purificó por precipitación con sulfato de amonio al 50% y mediante cromatografía de afinidad (sepharosa-proteína A). La IgG nativa (control) se obtuvo de conejos normales mediante el mismo procedimiento.

Especificidad del anticuerpo anti-EhCP2

Debido a la posibilidad de que el anticuerpo anti-EhCP2 pudiera estar dirigido contra moléculas de ubiquitina presentes en la EhCP2 purificada (ver resultados), o contra otras posibles EhCPs presentes en cantidades mínimas, realizamos inmunolectrotransferencia a la muestra EhCP2 purificada, utilizando como control EhCP5 recombinante proporcionada por la Dra. I. Bruchhaus.

Purificación de EhCPs por afinidad a sepharosa-IgG anti-EhCP2

La IgG anti-EhCP2 (10 mg) se acopló a 1 gr de sepharosa activada con bromuro de cianógeno, se empacó en una columna de 5 X 2 cm y se lavó con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M y HgCl₂ 1 mM. Se pasaron por la columna 3 ml del extracto amibiano éter NaCl 0.5 M y ésta se lavó con 100 ml del mismo amortiguador. La proteína unida se eluyó con 2 ml de amortiguador glicina-HCl 10 mM pH 2.0 e inmediatamente se neutralizó con unas gotas de amortiguador Tris-HCl pH 8.8 y se concentró a 2 ml con una membrana YM-3. A esta muestra se le determinó concentración de proteína (Bradford, 1976) y actividad proteolítica sobre azocaseína; además, el patrón proteico se examinó mediante electroforesis no desnaturizante (sin SDS) en geles de acrilamida al 12% con sus correspondientes zimogramas en geles de acrilamida con gelatina incorporada. Este procedimiento (con las mismas cantidades) se realizó para la obtención de sepharosa-IgG de conejo no inmune (control).

Efecto de los anticuerpos IgG anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica de las CP purificadas y sobre trofozoítos amibianos axénicos

Se determinó actividad proteolítica sobre azocaseína a 10 µg de proteasas de cisteína purificadas por afinidad, en presencia de diferentes cantidades de IgG anti-EhCP2 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg) y EDTA 5 mM, en tres experimentos independientes. Paralelamente, duplicados

de estas muestras se almacenaron a 4°C por 24 h. Los inmunoprecipitados se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min, se lavaron dos veces con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M y se analizaron en electroforesis-SDS al 12%. Por otra parte, se incubaron 2.5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* con 1 mg de IgG anti-EhCP2 durante 1 h, se les determinó actividad proteolítica sobre azocaseína (1mg/0.6ml, 37°C, 3h) y viabilidad por exclusión de azul de Trypan. En los experimentos control, se sustituyó la IgG anti-EhCP2 por IgG de conejo no inmune.

Inmunolocalización de EhCP2 en el absceso hepático amibiano de hamsters

Se inyectaron 2.5×10^5 trofozoítos axénicos de *E. histolytica* por vía intraportal a hamsters anestesiados. Después de 1 y 5 días los animales se sacrificaron con una sobredosis de éter, los hígados se extirparon, se fijaron con formol al 10% en PBS y mediante procesamiento histológico se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes seriados de estos hígados (4-6 μm), se incubaron con IgG anti-EhCP2 (0.04 mg/0.2 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M pre-absorbida con polvo cetónico de hígado de hamster) y se tiñeron mediante la técnica indirecta o "sándwich" usando como anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de conejo, marcado con isotiocianato de fluoresceína o peroxidasa y diaminobenzidina como sustrato. Para aumentar la sensibilidad de la reacción, en algunos cortes de tejido el anticuerpo secundario fue reemplazado por un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con oro y revelado con solución de plata (silver enhancement kit, Molecular Probes Inc.).

Liberación de EhCP2 purificada en hígado de hamster

En la búsqueda de un vehículo para liberar la EhCP2 purificada en el hígado de hamster, en diferentes sitios y concentraciones; en un principio se prepararon microesferas de gelatina de acuerdo a Yoshioka *et al.* (1981), pero experimentos preliminares revelaron que tales microesferas no son vehículos inertes. Sin embargo, cuando se inyectaron microesferas de la

resina superdex 75 (Pharmacia 24-44 μ de diámetro) en hamsters por vía intraportal, no se observó reacción inflamatoria ni daño en el tejido. Debido a que tales microesferas tienen tamaño semejante a trofozoítos amibianos, incorporan proteínas de peso molecular similar a EhCP2, con mínima interacción química entre ellas y liberan las proteínas al medio con agitación moderada, se pasaron 5 veces 60 μ l de EhCP2 purificada (5 mg/ml en PBS) a través de una microcolumna con 3.5×10^5 microesferas de superdex 75. Posteriormente 5×10^4 microesferas se inyectaron por vía intraportal en hamsters y éstos se sacrificaron a 3, 24 y 96 h; al término de cada tiempo los hígados se procesaron mediante histología para examen inmunohistoquímico.

La incorporación de la proteína EhCP2 en las microesferas de superdex 75 se demostró tificando una muestra de éstas con azul de Coomassie. La presencia de la proteína en el interior de las microesferas y sus alrededores dentro del tejido hepático, se determinó mediante la técnica de inmunohistoquímica descrita arriba.

Resistencia a complemento

Las amibas crecidas por 72 h con E-64 se incubaron con suero fresco de hamster 100 % (1×10^6 /ml) en presencia de E-64 250 μ M, a 37°C por 2 h y su viabilidad se determinó por exclusión de azul de Trypan. Estas pruebas se realizaron por duplicado en siete experimentos independientes y los resultados se compararon con amibas no tratadas con el inhibidor.

Citotoxicidad

La actividad citotóxica de los trofozoítos crecidos en presencia de E-64 se determinó *in vitro* con dos diferentes tipos de células blanco: Células Jurkat y PMNs obtenidos de la cavidad peritoneal de hamsters, inyectados previamente (6h) con 1 ml de glucógeno al 1% en PBS. El experimento se realizó incubando 1×10^5 amibas con 5×10^5 células Jurkat y 1×10^5 amibas con 2.5×10^6 PMNs en medio TYI-S-33 con E-64 250 μ M por 3 h a 37 °C y determinando la

viabilidad por exclusión de azul de Trypan. Las determinaciones se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes y los resultados se compararon con los controles (amibas normales).

Eritrofagocitosis

Se incubaron 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* virulenta crecida 72 h con E-64 (500 μ M), con 5×10^7 eritrocitos frescos de hamster durante 15 min en presencia de 250 μ M de E-64. Enseguida esta suspensión se centrifugó a 3000 r.p.m., el precipitado se resuspendió en 0.2 ml de agua destilada e inmediatamente se le adicionó 1 ml de formaldehído al 4% en PBS. El mismo procedimiento se hizo con las amibas virulentas pero en ausencia de E-64 (control). Después de dos horas los trofozoítos se lavaron con PBS y se contó el número de eritrocitos presente en cada amiba. Las determinaciones se hicieron en cien trofozoítos, por triplicado y en seis experimentos diferentes. Se consideró alta fagocitosis cuando los trofozoítos contenían 5 o más eritrocitos. Además, en ambos grupos se evaluó la eritrofagocitosis disolviendo los precipitados (amibas y eritrocitos) con 1 ml de ácido fórmico al 50% y determinando las absorbancias a 397 nm (Keller *et. al.*, 1988).

Actividad hemolítica de E. histolytica

Se incubaron eritrocitos frescos de hamster lavados con PBS con amibas cultivadas por 72 h con E-64 y en presencia de 250 μ M de E-64 o con amibas sin E-64, en 1 ml de PBS. Después de la incubación por 1 h a 37°C (1:2000 eritrocito:amiba), los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y las absorbancias de los sobrenadantes se detectaron a 570 nm. Estas observaciones se hicieron por duplicado en tres experimentos independientes (Ankri *et al.*, 1998).

Actividad proteolítica inhibible por E-64

La actividad proteolítica de 5×10^5 trofozoítos amibianos congelados en PBS, se determinó mediante la técnica de azocaseína (Pérez-Montfort *et al.*, 1987), tanto en trofozoítos control como en trofozoítos cultivados 72 h con E-64 y lavados 4 veces con PBS.

Zimogramas de trofozoítos amibianos crecidos en E-64

Amibas control y crecidas en E-64 se cosecharon, se lavaron con PBS en condiciones estériles y se incubaron por diferentes tiempos (2.5 a 48 h) en medio TYI-S-33. Los extractos congelados en PBS (2.5×10^5) de cada tiempo se sometieron a electroforesis-SDS al 12% y los zimogramas se hicieron como se señala arriba.

Detección de actividad proteolítica intracelular en trofozoítos amibianos vivos

El péptido Arg-Arg-4-metoxi-2-naftilamida (AMNP) es un sustrato de proteasas de cisteína que al ser degradado se combina con 5-nitro-2-salicilaldehído (NSA) y forma un precipitado fluorescente. Cuando se adiciona a un cultivo de trofozoítos amibianos, AMNP y NSA entran libremente a su citoplasma y la presencia de proteasas de cisteína se detecta como múltiples gránulos fluorescentes (Scholze *et al.*, 1994). Estas observaciones se hicieron a diferentes tiempos (3 a 24 h) después de adicionar 5 mM de AMNP y 2.5 mM de NSA (en 0.1 ml de PBS) a 1×10^5 trofozoítos control y crecidos en E-64, lavados previamente 4 veces con PBS.

Resistencia eléctrica transepitelial

El daño a monocapas de células MDCK se evaluó con una cámara de "Ussing", determinando los cambios en la resistencia eléctrica transepitelial 30 min después de la adición de amibas cultivadas 72 h con E-64 y en presencia del mismo inhibidor (500 μ M), con una relación de 5:1 célula:amiba, como lo ha descrito López-Vancell *et al.* (2000).

Absceso hepático amibiano en hamsters

El absceso hepático amibiano se indujo en cuatro diferentes grupos de hamsters de ambos sexos de 100 g de peso (8 animales por grupo). Se inyectaron trofozoítos axénicos de *E. histolytica* ($5 \times 10^5/0.2$ ml PBS) en la vena porta de hamsters anestesiados con pentobarbital (6.3 mg/100 g). Los animales se sacrificaron después de 5 días con una sobredosis de éter, el hígado se fragmentó en pequeños trozos, se fijó por 48 h con formaldehído al 10% en PBS y se procesó para histología. Se hicieron cortes de 4-6 μm de los bloques de parafina que contenían todos los lóbulos del hígado y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E), y mediante la reacción de Schiff (PAS). Además, dos de los grupos tratados se inyectaron cada 12 h durante todo el experimento con 2 mg de E-64 por vía intraperitoneal, ya que se ha establecido que la vida media del E-64 activo inyectado en roedores es de 12 h (Katunuma y Kominami, 1995).

Cuatro grupos experimentales de absceso hepático amibiano se prepararon como sigue: 1) hamsters no tratados + trofozoítos de *E. histolytica* no tratados (controles); 2) hamsters no tratados + trofozoítos de *E. histolytica* crecidos con E-64; 3) hamsters tratados con E-64 + amibas no tratadas; 4) hamsters tratados con E-64 + amibas crecidas con E-64 (Tabla 2). Se adicionaron 4 animales al grupo 4, dos de ellos se sacrificaron a las 8 h y los otros dos a las 20 h después de la inyección de las amibas.

Obtención de hepatocitos

Los hepatocitos se obtuvieron mediante la perfusión portal del hígado de un hamster normal y otro del grupo 4 (tratado por 5 días) con 50 ml de EDTA 0.5 mM en solución de Hanks, seguido de 100 ml de medio Williams E sin suero y con 100 mg de colagenasa bacteriana. Después de la perfusión, el hígado colapsado se filtró a través de una gasa, con medio Williams E y los hepatocitos vivos se obtuvieron en un gradiente de Percoll (Meredith, 1988).

Finalmente la actividad intracelular de proteasas de cisteína en los hepatocitos vivos se detectó con el sustrato AMNP como se describe arriba.

Inyección de E. histolytica en hamsters leucopénicos

Cuatro grupos de 4 hamsters c/u se expusieron a 800 rads de radiación gamma en un irradiador de ^{60}Co , y se determinó el número de leucocitos circulantes a las 6, 12, 24 h y 2, 3 y 7 días. Para esto, la sangre obtenida por punción cardíaca se diluyó 10 veces con una solución de ácido acético al 3% con violeta de genciana y los leucocitos (en azul) se contaron en un hematocitómetro. Después de 48 h, a cada uno de ellos se le inyectó 1 ml de glucógeno al 1% en PBS por vía intraperitoneal (para secuestrar a los leucocitos circulantes residuales), y 3 h después recibieron 0.5×10^6 trofozoitos de *E. histolytica* por vía intraportal. Posteriormente, estos grupos se sacrificaron a 3, 6, 24 48 y 96 h, los hígados se extirparon, se procesaron para histología como se menciona arriba y se tiñeron con H y E y PAS. Paralelamente, otros animales sin irradiar se trataron de la misma forma (controles). En ambos grupos (controles y radiados) antes de ser sacrificados, se cuantificó el nivel de leucocitos en sangre periférica como se menciona arriba. Para demostrar la isquemia en el hígado, todos estos animales recibieron 0.2 ml de tinta china (dializada previamente con PBS) por vía intraportal antes de ser sacrificados (Pérez-Tamayo *et al.*, 1992).

Isquemia focal hepática inducida con microesferas de superdex

Se mezclaron 1×10^6 trofozoitos axénicos con 2×10^6 microesferas de superdex 75 (farmacia) y se inyectaron por vía intraportal en cuatro grupos de hamsters leucopénicos (cuatro animales por grupo). Cada grupo se sacrificó a 6, 24, 48 y 72 h inyectando previamente 0.2 ml de tinta china por vía intraportal. Los hígados se fijaron, se procesaron por histología como arriba se menciona y se tiñeron con PAS.

Hipocomplementemia inducida con FHVC

El factor hipocomplementémico del veneno de cobra (FHVC) se purificó a partir del veneno crudo de *Naja haje* (Sigma) de acuerdo al procedimiento de Sharma *et al.* (2001), que involucra cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico. La eficiencia hipocomplementémica del FHVC se determinó por su capacidad para reducir los niveles del complemento del suero de hamster y por su actividad citolítica sobre las amibas *in vitro* (0.5×10^6 /ml durante 2 h). El suero de los animales se obtuvo 24, 48 y 72 h después de la inyección de 40 μ g de FHVC por vía intraperitoneal (Van den Berg *et al.*, 1991). El nivel de complemento se determinó en los sueros de los hamsters normales y en los que recibieron FHVC mediante la hemólisis de eritrocitos de carnero sensibilizados (UH50%) como lo describen Morrison y Kline, (1977). El experimento se realizó inyectando 1×10^8 trofozoítos de *E. histolytica* virulenta por vía intraportal en doce grupos de hamsters (cuatro animales en c/u) normales, hipocomplementémicos y leucopénicos + hipocomplementémicos. Cada grupo de animales se sacrificó a 6, 24, 48 y 72 h. Para localizar las zonas isquémicas en el hígado, a todos los animales se les inyectó 0.2 ml de tinta china por vía intraportal 5 min antes del sacrificio. Los hígados se fijaron con formol, se procesaron para histología y se tiñeron con PAS como arriba se menciona.

Inducción de inmunosupresión química en hamsters

La inmunosupresión en cuatro hamsters se indujo inyectando ciclosporina A (1 mg/100 g) diluida en aceite de olivo, por vía intraperitoneal cada 24 h durante 3 días (Carrero *et al.*, 2000). La inmunosupresión se verificó incubando las células de bazo en medio RPMI en placas de 96 pozos con 5×10^5 células y 0.1 μ g de Concanavalina A en cada pozo. La placa se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 48 h. Enseguida se adicionó ³H-Timidina (1 μ Ci/pozo) y la placa se incubó nuevamente por 18 h. Al final, las células se cosecharon y la incorporación de ³H-Timidina se determinó en un contador de centelleo. Trofozoítos de *E. histolytica* virulenta (1×10^6) se inyectaron en un grupo de hamsters normales (cuatro) y en el grupo inyectado con

CsA (3 días antes y durante la infección). Todos los animales se sacrificaron 7 días después de la inyección de los parásitos, los hígados se procesaron por histología y los cortes se tiñeron con PAS.

RESULTADOS

La actividad específica de las proteasas purificadas fue mayor en el extracto amibiano con éter, preparado con 2.5 M de NaCl (Tabla 1). La fracción proteica con actividad proteolítica eluída de la columna de ultrogel ACA 54, se encontró en una zona de aproximadamente 30 kDa. La figura 5 muestra el patrón electroforético y el correspondiente zimograma de las diferentes fracciones electroeluidas del sistema Prep Cell. Debido a que las fracciones mostraron dos intervalos bien definidos con actividad proteolítica, se separaron y se marcaron como I: fracciones 56-68 y II: fracciones 80-92 (Fig. 6). La actividad proteolítica de ambas fracciones se inhibió completamente con E-64. Para evitar agregación proteica durante la electroforesis-SDS, las fracciones se hirvieron en presencia de EDTA y iodoacetamida (Fig. 7).

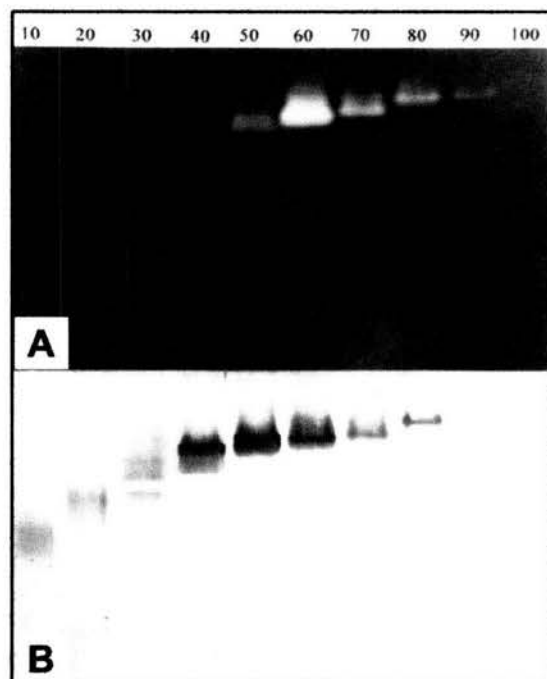


Figura 5. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes de diferentes fracciones proteicas electroeluidas en Prep Cell. Se analizó una fracción de cada 10. **A**, zimograma en gel con gelatina. **B**, migración proteica en gel al 12%.

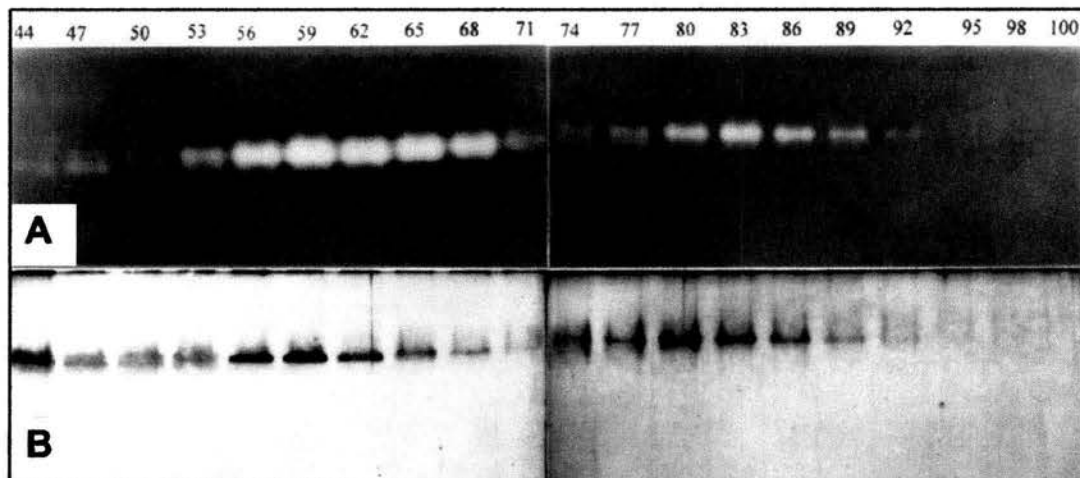


Figura 6. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes de fracciones proteicas con alta actividad proteolítica. Se analizó una fracción de cada 3. **A**, zimograma en gel con gelatina y **B**, migración proteica en gel al 12%. Se observan dos zonas positivas (56-68 y 80-92), separadas por una zona intermedia (71-77) con menos actividad.

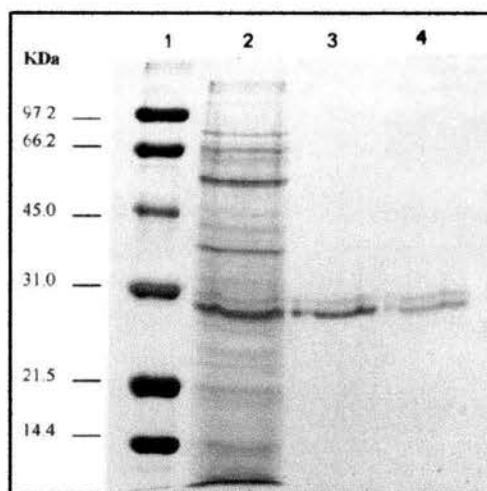


Figura 7. Electroforesis al 12% con SDS del extracto amibiano éter NaCl 0.5 M. 1, marcadores moleculares. 2, extracto amibiano éter. 3, fracción I de la electroelución en Prep Cell. 4, fracción II de la electroelución en Prep Cell. Las fracciones I y II tuvieron actividad proteolítica inhibible con E-64.

La determinación del punto isoeléctrico (pI) de la fracción II del extracto amibiano éter NaCl 0.5 M, reveló una banda proteica en la zona ácida del gel preparativo, que en el gel resolutivo mostró un pI de 5.14 (Fig. 8A), que es cercano al pI teórico de EhCP2 (5.13), pero lejano del pI de EhCP5 (8.41). El análisis de la inmunoelectrotransferencia reveló una banda de aproximadamente 30 kDa en presencia de DTT, EDTA y iodoacetamida, y una banda semejante a 26 kDa en las mismas condiciones, pero sin DTT (Fig. 8B). El control con la EhCP5 recombinante fue negativo (no mostrado).

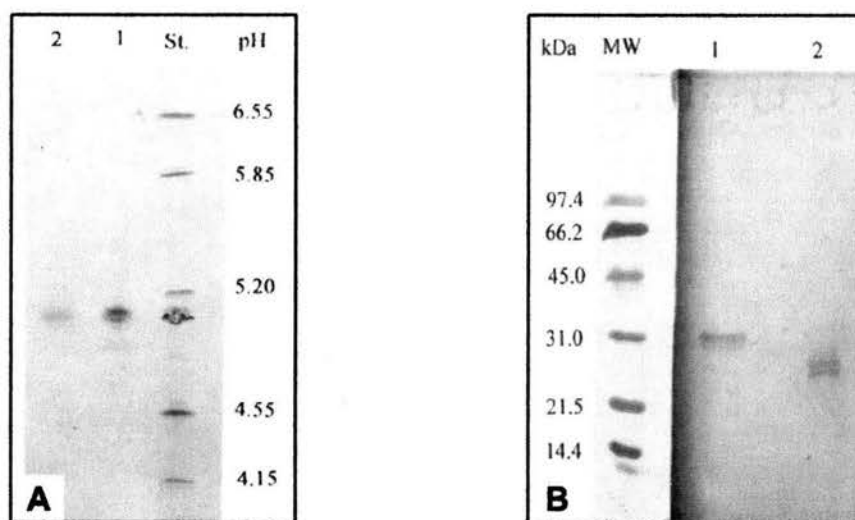


Figura 8. **A**, Isoelectroenfoque en gel resolutivo de pH 4.0-6.5 de EhCP2 purificada. St = standars; 1 y 2 son diferentes diluciones de la muestra EhCP2 y muestran un valor de 5.14. **B**, Inmunoelectrotransferencia de EhCP2 purificada detectada con anticuerpos anti-EhCP2. 1, hervida en presencia de DTT, EDTA y iodoacetamida. 2, hervida en presencia de EDTA y iodoacetamida sin DTT.

Tabla 1.

Resumen del procedimiento de purificación de las proteasas de cisteína de *E. histolytica*. Obsérvese en negritas la gran cantidad y recuperación de proteasas de cisteína.

	Extracto éter 2.5M NaCl	Electroelución		Extracto éter 0.5M NaCl	Electroelución	
		I	II		I	II
Proteína (mg)	29.10	0.347	0.827	664.50	1.625	3.834
Actividad total (D.O.336 nm)	1608	91	216	6209	268	716
Actividad específica (U/mg/prot)	55.25	262.24	261.18	9.34	164.92	186.75
Recuperación (%)	100	5.65	13.43	100	4.31	11.53

La secuenciación NH₂-terminal de la proteína de la fracción II purificada a partir del extracto éter NaCl 0.5M, mostró que es una mezcla de dos moléculas; una es precursor de la CP2 de *E. histolytica* (aminoácidos 94-106: ALA-PRO-GLU-SER-VAL-ASP-X-ARG-LYS-GLU-GLY-X-VAL) y la otra es ubiquitina(s) de *E. histolytica* (aminoácidos 1-13: MET-GLN(ó ASP)-ILE(ó LYS)-PHE(ó ALA)- VAL-(ó TYR)-LYS-THR(ó GLY)-LEU-THR-GLY(ó MET ó ILE)-X-THR-ILE). Los aminoácidos en paréntesis indican posibles sustituciones.

El efecto de dos IgGs anti-EhCP2 obtenidas de diferentes conejos sobre la actividad proteolítica de EhCPs purificadas por cromatografía de afinidad se muestra en la Figura 9. La IgG control inhibió la actividad proteolítica de manera dependiente de la concentración; por otro lado, uno de los anticuerpos anti-EhCP2 inhibió menos y el otro, por el contrario, mostró un incremento de la actividad proteolítica por arriba de la actividad de la enzima control, de manera dependiente de la concentración. Resultados similares se obtuvieron cuando la actividad proteolítica de trofozoítos axénicos vivos se determinó en presencia de IgG de conejo normal y con los dos anticuerpos anti-EhCP2. Con la IgG normal la actividad proteolítica fue 58.16% respecto a los trofozoítos control, mientras que para los anticuerpos específicos ésta

fue de 99.48% y 128.06% respectivamente. La viabilidad de los trofozoítos no se modificó por la presencia de los anticuerpos anti-EhCP2.

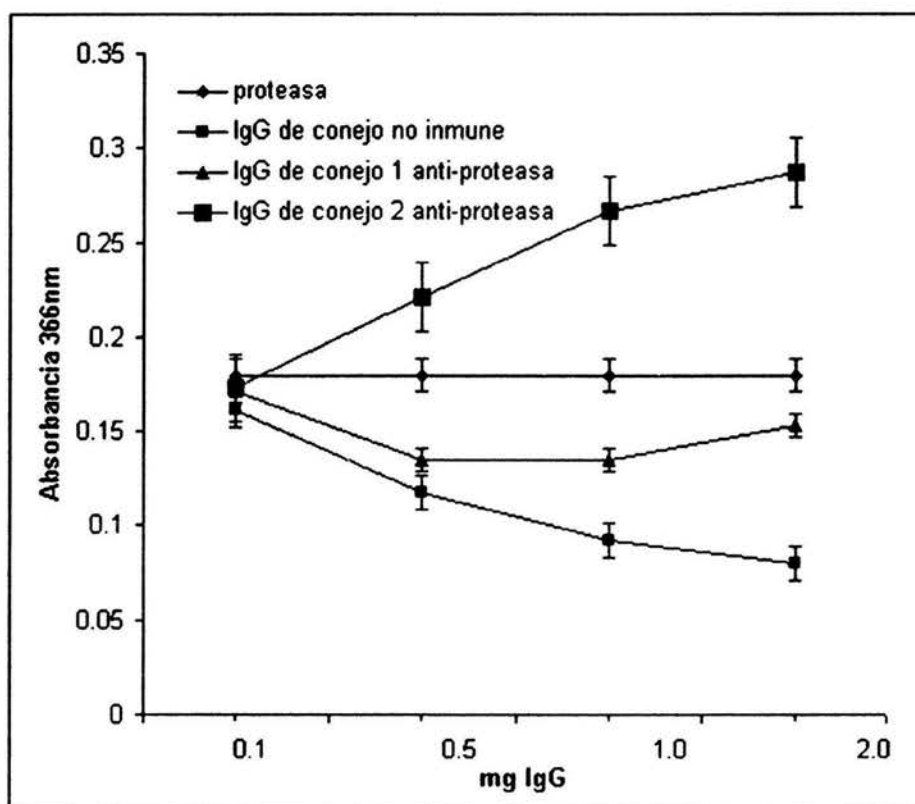


Figura 9. Efecto de dos diferentes anticuerpos anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica sobre azocaseína de EhCPs. La actividad proteolítica se redujo en presencia de IgG normal, con uno de los anticuerpos se disminuyó y con el otro esta actividad se incrementó de manera dependiente de la concentración.

Experimentos preliminares con microesferas de gelatina inyectadas en la vena porta de los hamsters revelaron (en el hígado), intensa reacción inflamatoria en sus alrededores después de 24 h y por esta razón no se usaron. En cambio, las microesferas vacías de superdex 75 no mostraron reacción inflamatoria a su alrededor después de 3 y 24 h de la inyección intraportal (Fig. 10A) y sólo algunas de ellas se rodearon de pocas células mononucleares después de 96 h. Las microesferas de superdex 75 con la EhCP2 incorporada, teñidas con azul de Coomassie, mostraron que la incorporación fue heterogénea (Fig. 10B). Después de inyectadas en la vena porta de los hamsters, éstas presentaron una moderada infiltración de leucocitos polimorfonucleares a 3 h (Fig. 10C) y a 24 h algunas de ellas tuvieron un reducido e irregular halo de células hepáticas necróticas y células inflamatorias (Fig. 10D). A las 96 h solo se observaron algunas microesferas rodeadas de lesiones residuales. En los cortes de estos hígados, mediante inmunohistoquímica con IgG anti-EhCP2, la EhCP2 se observó dentro de las microesferas de superdex 75, hasta 1 hr después de la inyección intraportal. No se observó tinción positiva en los alrededores de las microesferas. Por otra parte, los cortes de hígados de hamster con abscesos amibianos de 1 y 5 días de desarrollo, que se incubaron con IgG anti-EhCP2 y se revelaron con peroxidasa, mostraron trofozoítos amibianos positivos sin tinción en la zona de necrosis ni en los bordes con el tejido sano (Fig. 11 B y C). La inyección local de la proteasa EhCP2 purificada en el hígado de hamster con absceso de 5 días, permitió visualizar a la enzima en la zona de necrosis y en los sinusoides del tejido sano (Fig. 11D). En la inmunolocalización de EhCP2 revelando con un segundo anticuerpo marcado con oro y en presencia de sales de plata encontramos la misma localización de la enzima que nos mostró la inmunohistoquímica revelada con peroxidasa, solo que más intensa (Fig. 11F).

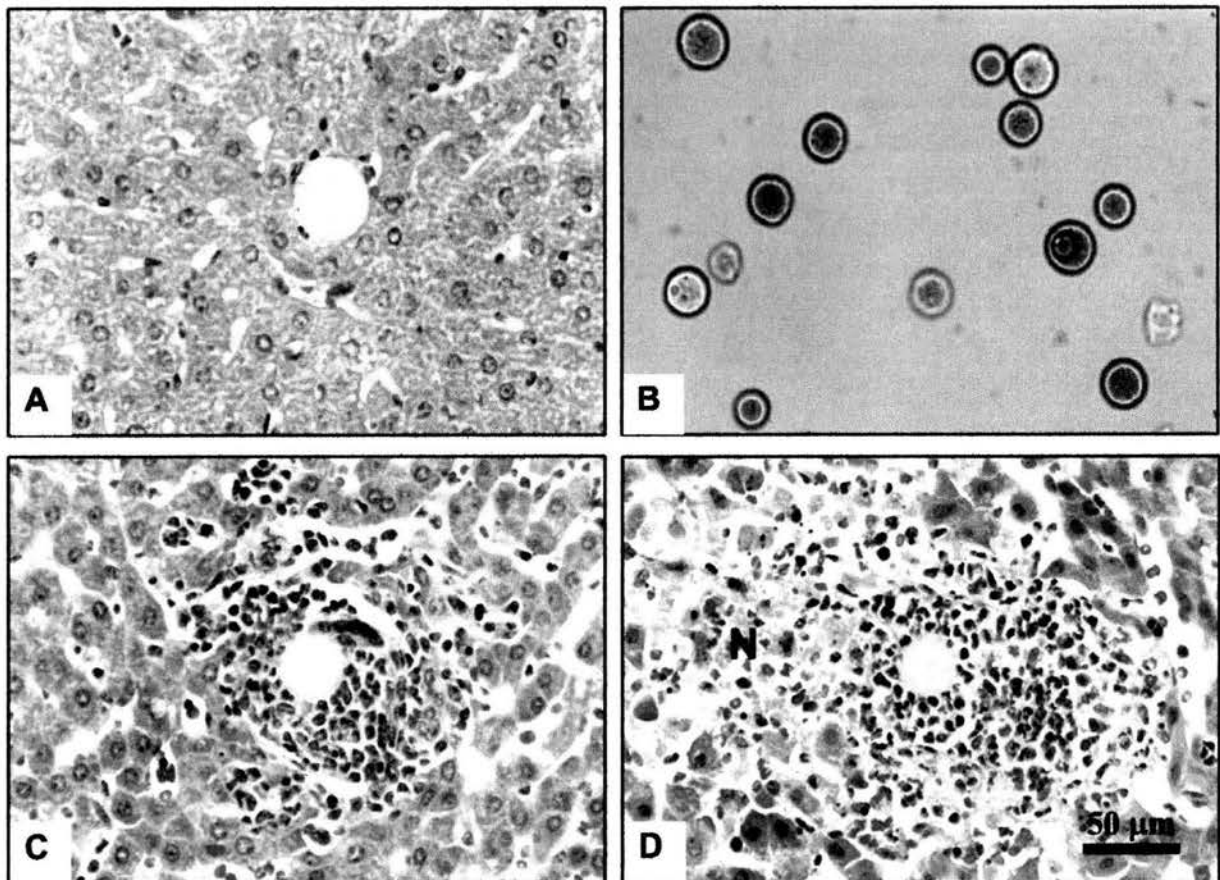


Figura 10. Inyección intraportal en hamsters de microesferas de superdex, con EhCP2 incorporada. **A**, microesferas vacías (control) 24 h después de la inyección. No se observa reacción inflamatoria. **B**, microesferas con EhCP2 incorporada y teñidas con azul de Coomassie. **C**, microesferas con EhCP2 incorporada 3 h después de ser inyectadas. Se observa infiltrado inflamatorio (PMNs) alrededor de la microesfera sin destrucción celular. **D**, microesferas con EhCP2 incorporada 24 h después de ser inyectadas. Además de inflamación (PMNs) se observa destrucción de algunas células hepáticas (N).

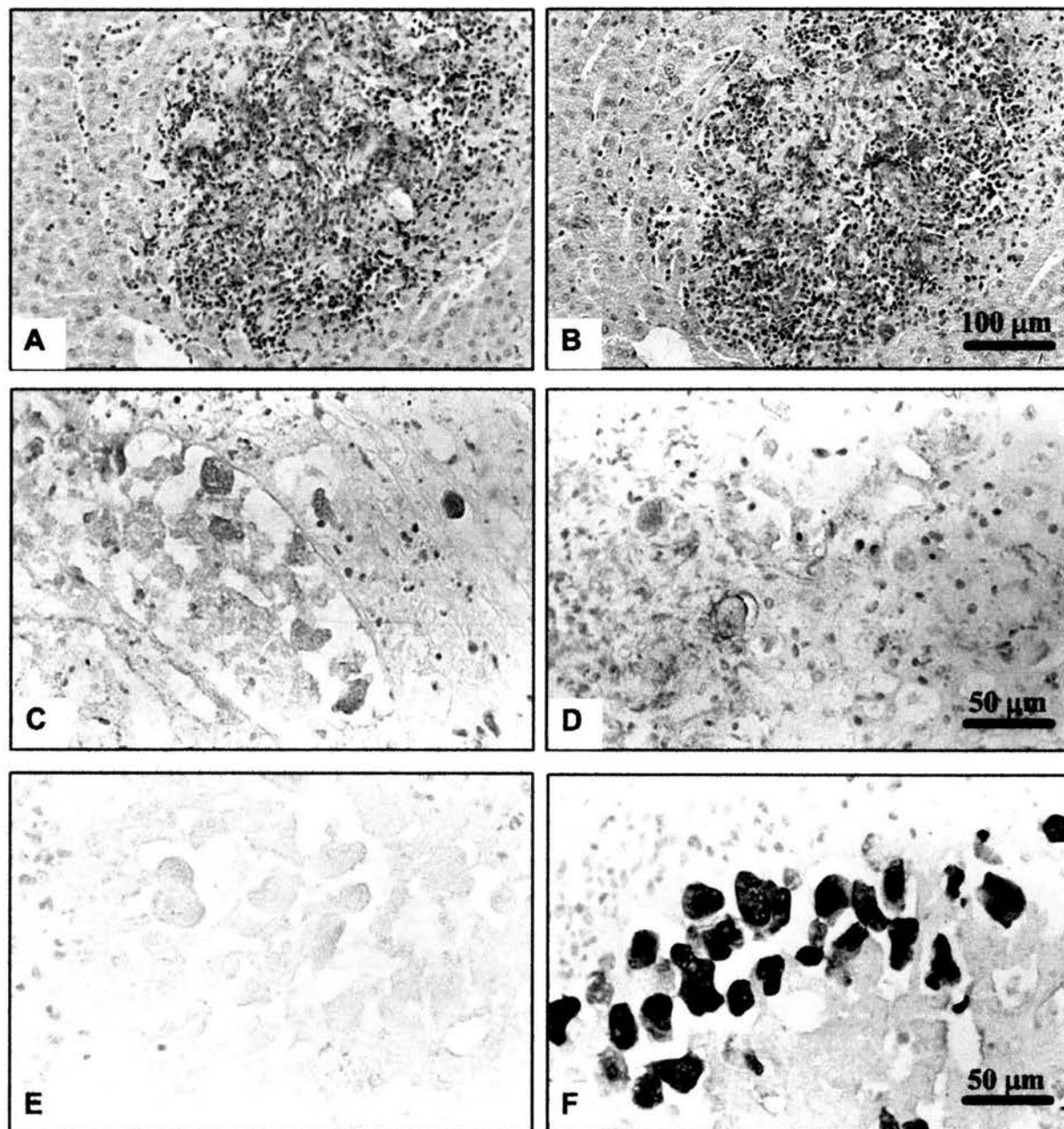


Figura 11. Inmunolocalización de EhCP2 en cortes de AHAEH. **A**, AHAEH de 24 h incubado con IgG normal (control). **B**, AHAEH de 24 h incubado con anti-EhCP2. **C**, AHAEH de 5 días incubado con anti-EhCP2. **D**, AHAEH de 5 días, inyectado previamente con EhCP2 purificada e incubado con anti-EhCP2. **E**, AHAEH de 5 días incubado con IgG normal (control). **F**, AHAEH incubado con anti-EhCP2. Inmunohistoquímica revelada con peroxidasa (**A-D**) y con oro-plata (**E-F**). En presencia de anti-EhCP2, los trofozoítos se tiñen intensamente y no se observa tinción en la zona de necrosis ni en la periferia con el tejido sano, excepto cuando la EhCP2 purificada se inyecta previamente (**D**).

Los trofozoitos de *E. histolytica* tratados 72 h con E-64 500 μ M, no mostraron diferencias en crecimiento, viabilidad, resistencia a complemento y citotoxicidad, con respecto a los trofozoitos control. En cambio, se inhibió su capacidad de disminuir la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células MDCK (Fig. 12). Por otra parte, la actividad proteolítica de los trofozoitos crecidos en medio TYI-S-33 con E-64, se inhibió gradualmente durante las 72 h de cultivo (Fig. 13). Resultados similares se obtuvieron con los zimogramas en gel de gelatina (Fig. 14), así como también con la actividad proteolítica de cisteína intra-citoplásmica, en trofozoitos amibianos vivos, visualizada con el sustrato AMNP (Fig.15). Al incrementar las concentraciones de E-64, se observó una disminución general en el número de gránulos citoplásmicos fluorescentes y un incremento en el número de amibas completamente negativas. Cuando las amibas crecidas por 72 h en E-64 se lavaron y se cultivaron nuevamente sin E-64, se recuperó el 50% de la actividad de proteasas de cisteína en aproximadamente 24-48 h (detectada con azocaseína, Fig.13).

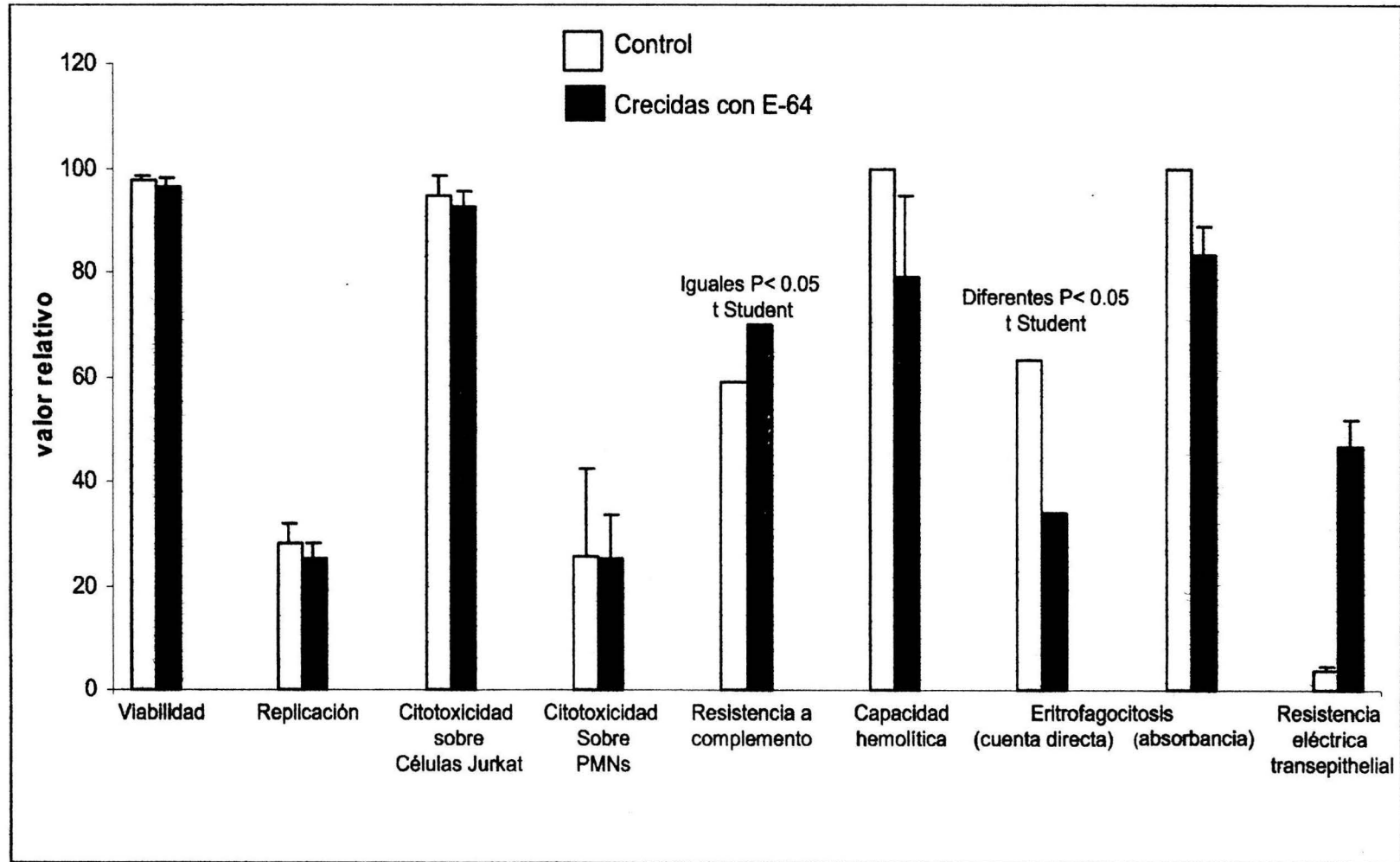


Figura 12. Efecto del crecimiento de *E. histolytica* con E-64 (72 h), sobre diferentes funciones *in vitro*.

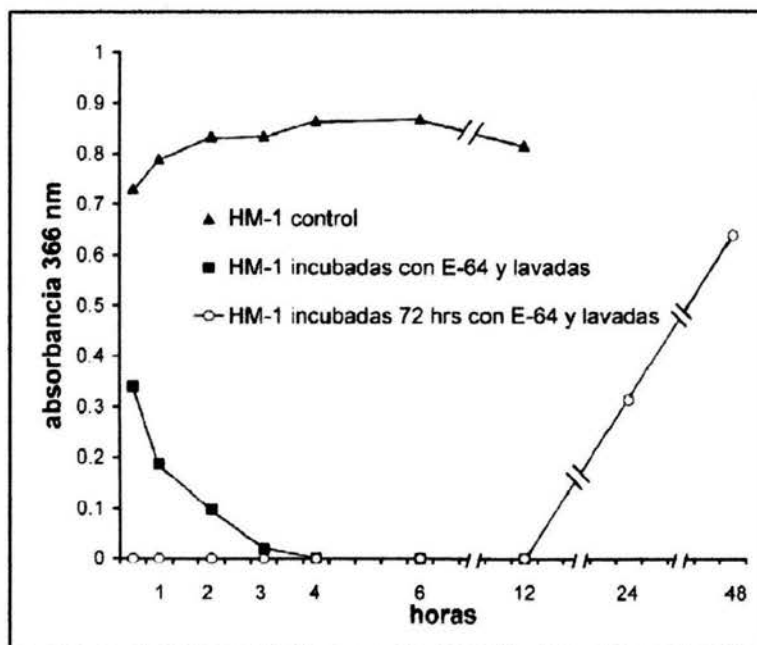


Figura 13. Actividad proteolítica sobre azocaseína de homogenados amibianos después de varios periodos de incubación en presencia de E-64. La actividad desaparece después de 4 h de incubación con E-64 y reaparece 12 h después de quitar el inhibidor.

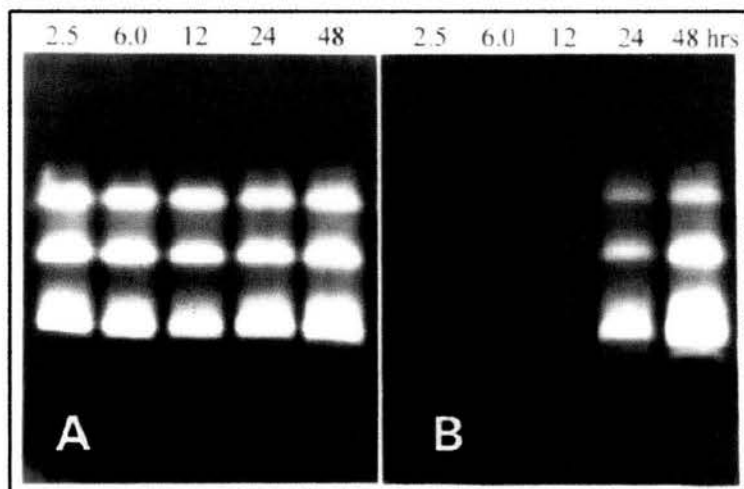


Figura 14. Zimogramas de homogenados amibianos control (A) y de los que recuperaron la actividad proteolítica (B), correspondientes al experimento mostrado en la figura 13. La actividad proteolítica se visualiza (con esta técnica) 6 h después de retirar el inhibidor

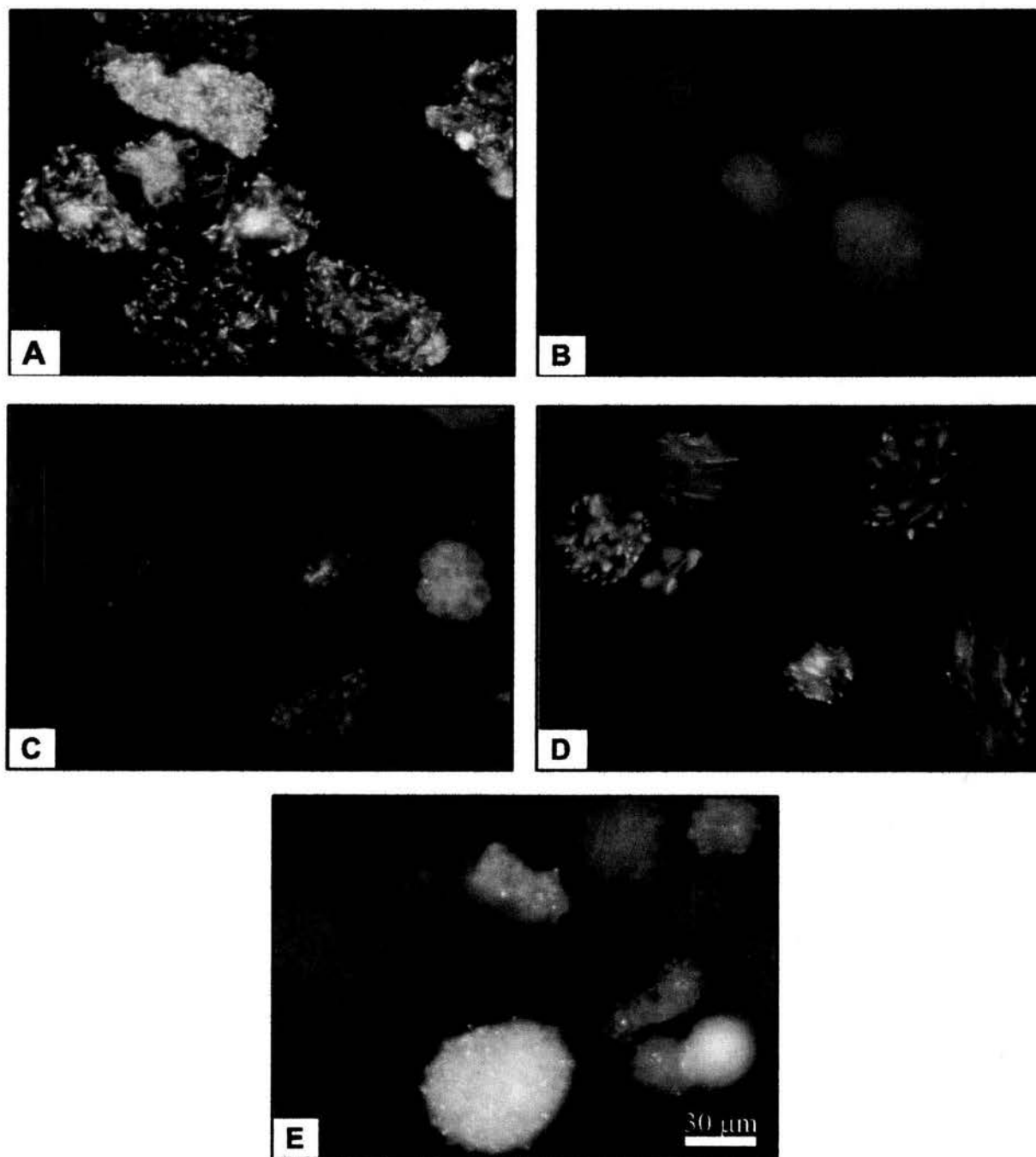


Figura 15. Actividad intracelular de proteasas de cisteína en amibas vivas, detectada mediante la técnica de AMNP. **A**, control 72 h de cultivo; **B**, 72 h de cultivo en presencia de E-64, lavadas e incubadas en medio sin E-64, tiempo 0; **C**, igual que B pero 3 h después; **D**, igual que B, pero 6 h después; **E**, igual que B pero 24 h después. No se detecta actividad a tiempo 0. Sin embargo, a 3 h comienza a reaparecer actividad irregular y a las 24 h la recuperación es total.

En los experimentos *in vivo* con E-64, los abscesos hepáticos amibianos fueron iguales en los grupos 1, 2 y 3 (Tabla 2; Fig. 16). Un día después de la inyección de los trofozoítos, todos los hígados de éstos animales mostraron múltiples lesiones con poca necrosis, y a los 5 días se observaron áreas extensas de necrosis con poco infiltrado inflamatorio y con algunos trofozoítos viables.

Tabla 2.

Tratamiento de los 4 diferentes grupos de hamsters inyectados con amibas. Ninguno de los hígados de los animales del grupo 4 presentó lesiones (0/8).

Grupos	1	2	3	4
Amibas	normales	crecidas 72 h con E-64	normales	crecidas 72 h con E-64
Hamsters	normales	normales	con E-64 cada 12 h	con E-64 cada 12 h
AHAEH/hamster	8/8	8/8	8/8	0/8

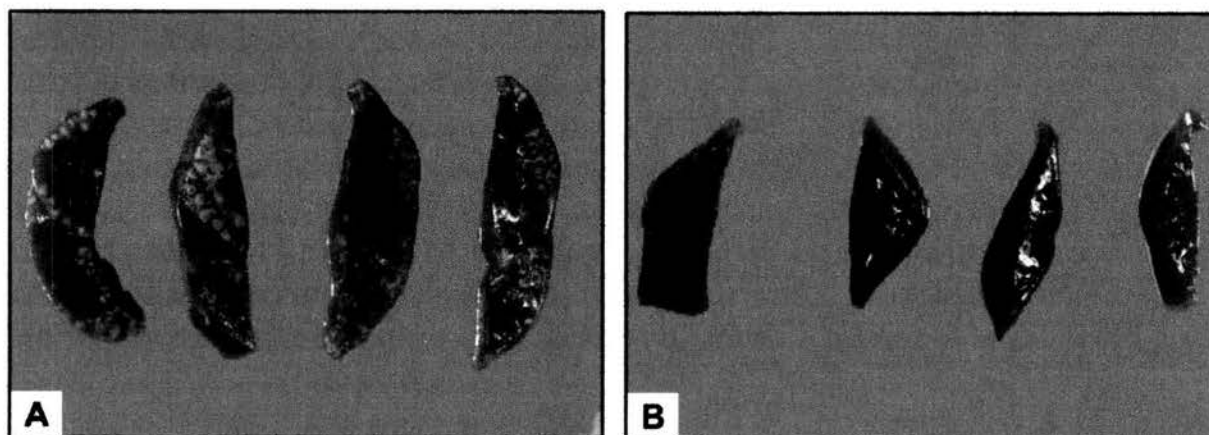


Figura 16. Aspecto macroscópico de los hígados de hamster inyectados con amibas. **A**, imagen representativa de los grupos 1, 2 y 3 ; se aprecia hepatomegalia y múltiples lesiones distribuidas en todos los lóbulos. **B**, Imagen del grupo 4; se observan lóbulos de tamaño normal y sin lesiones.

Por otra parte, no se observaron lesiones en ningún hígado de los animales del grupo 4 al cabo de 5 días y los hepatocitos no mostraron actividad intracelular de proteasas de cisteína (Fig. 17). Además, no se detectaron amibas en los cortes de tejido teñidos con PAS.

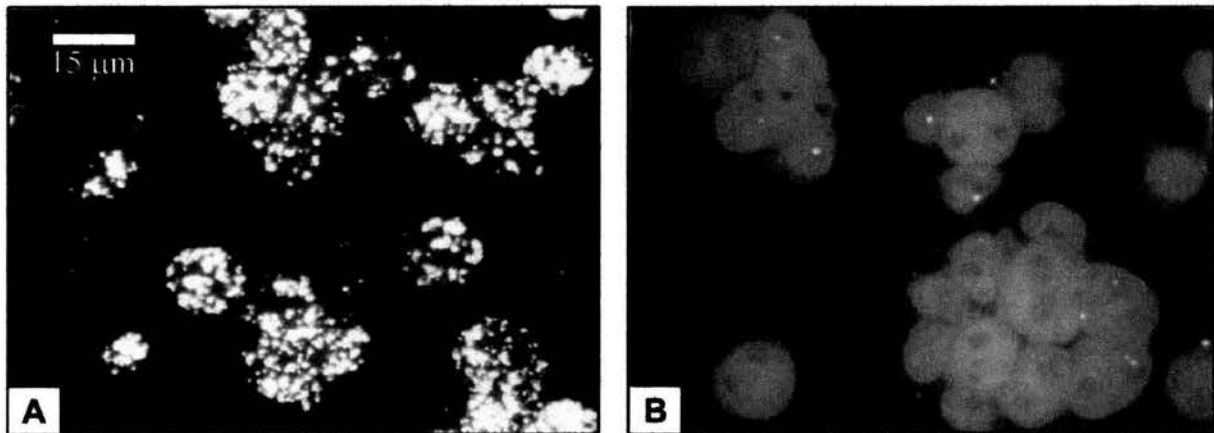


Figura 17. Actividad de CPs en células hepáticas, detectada mediante la técnica de AMNP. **A**, hepatocitos de hamster normal (control). **B**, hepatocitos de un hamster del grupo 4 (inyectado durante 5 días con E-64). Se observa inhibición de la actividad de CPs en células hepáticas del animal tratado con E-64.

En los animales del grupo 4 (especialmente preparados para detectar lesiones y amibas a tiempos cortos), 8 h después de la inyección de los trofozoítos, se observaron pequeños grupos de PMNs con pocas amibas fragmentadas. Después de 20 h los parásitos desaparecieron; solo estuvieron presentes restos de PMNs (polvo nuclear) y células gigantes ocasionales, en las lesiones involutivas de este tiempo (Fig.18).

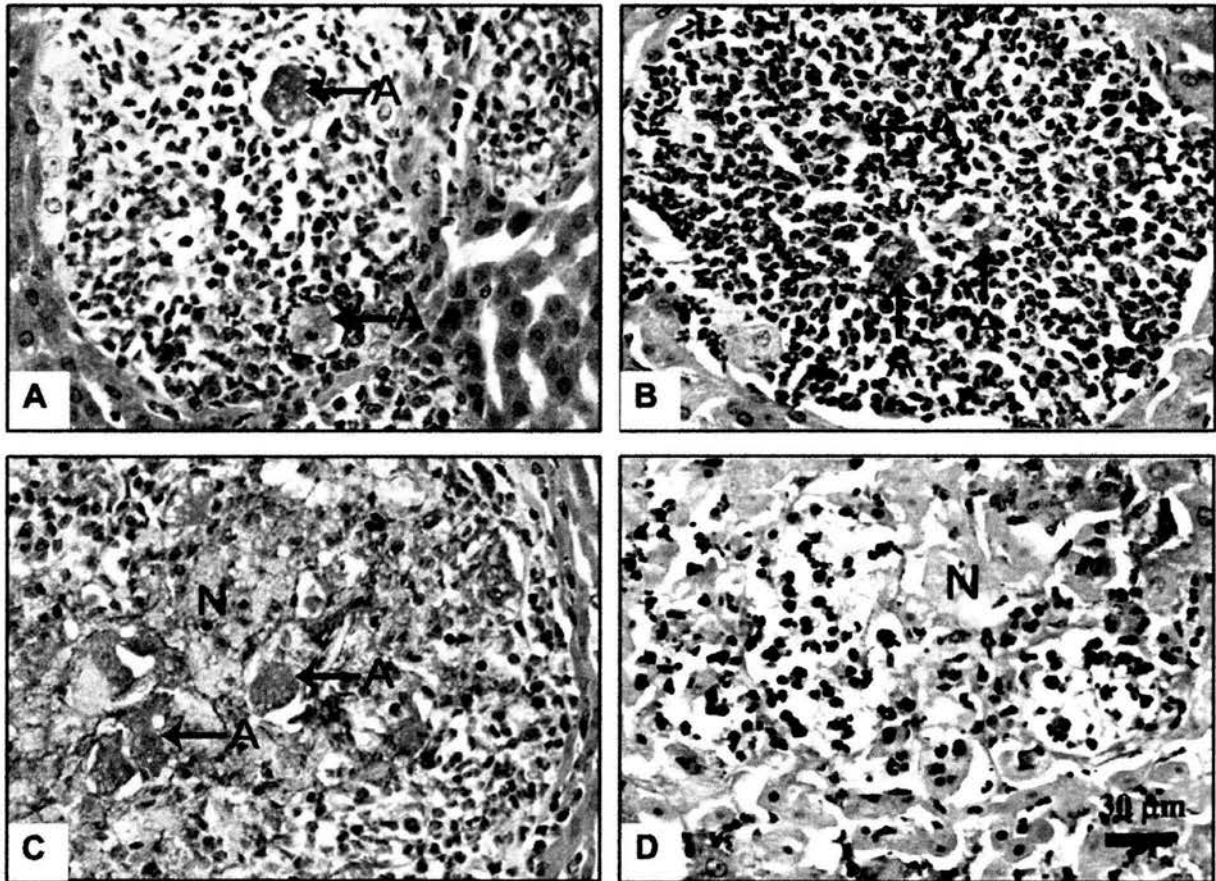


Figura 18. Histología de los hígados de los animales del grupo 4 (inyectado continuamente con E-64 + amibas crecidas en presencia de E-64). **A.** control 8 h, amibas bien conservadas (A) rodeadas de PMNs y con mínima destrucción tisular, **B** grupo 4 a 8h, restos amebianos (A) con inflamación aguda; principalmente PMNs y escasa necrosis. **C.** control 20 h, múltiples amibas con inflamación y destrucción tisular (N). **D** grupo 4 a 20 h; mínimo daño celular hepático (N) con fragmentación de PMNs y sin amibas.

La irradiación de los hamsters causó disminución de los leucocitos circulantes, de $10429 \pm 1512/\text{mm}^3$ a $287 \pm 216/\text{mm}^3$ en 48 h y permaneció en este nivel hasta 7 días después, en que los animales mueren (Fig. 19). La inyección del glucógeno en la cavidad peritoneal ocasionó el secuestro de los leucocitos periféricos residuales. Los animales controles inyectados con amibas mostraron leucopenia periférica temporal a las 6 h, que evolucionó a leucocitosis a las 96 h; en cambio en los animales radiados la leucopenia se mantuvo durante

la infección (Fig. 20). Por otra parte, en los cortes de los hígados de los animales normales inyectados con amibas, a las 3 y 6 h posteriores se observaron amibas bien conservadas, rodeadas por PMNs sin destrucción tisular y con isquemia; a las 24 h la necrosis se sumó a este proceso. En los animales leucopénicos 3 y 6 h después de la inyección, se observaron amibas bien conservadas en ausencia de células inflamatorias, sin daño celular y tisular en sus alrededores y sin isquemia, ya que la tinta china se encontraba en todos los sinusoides, en cambio a las 24 h se observó lo mismo, sólo que con amibas fragmentadas que desaparecieron en 48 h (Fig. 21)

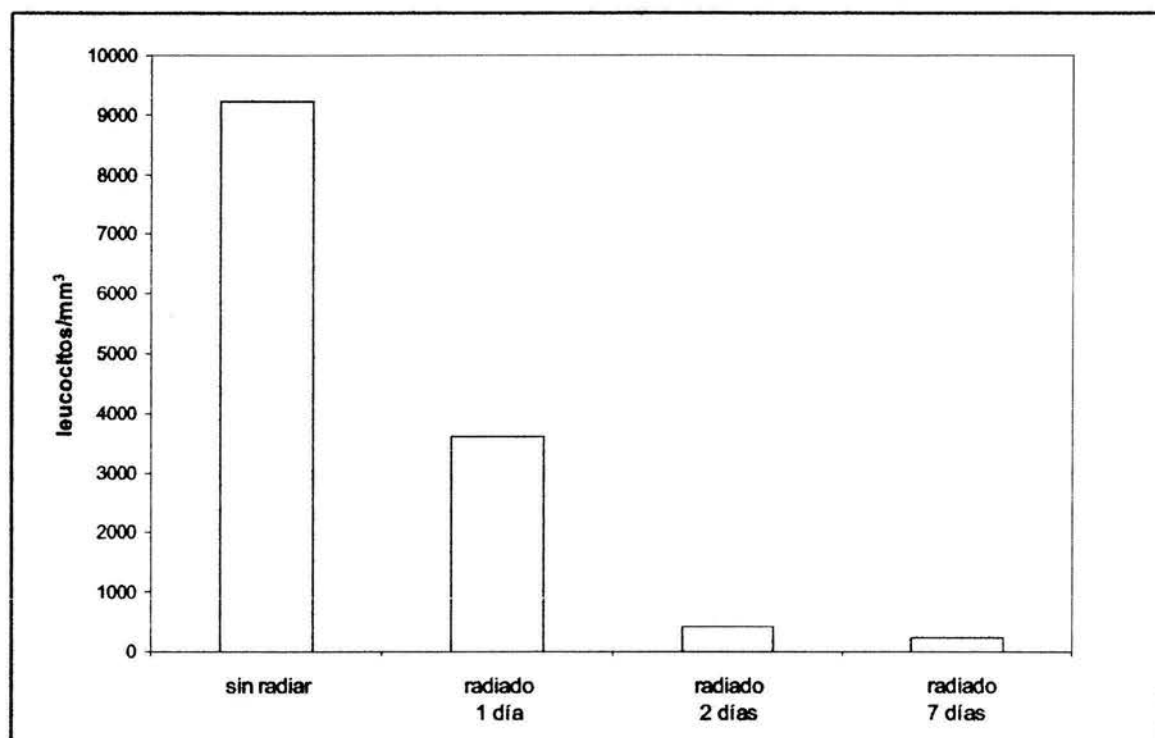


Figura 19. Leucocitos de sangre periférica de hamsters normales y expuestos a 800 rads de radiación gamma (^{60}Co). Se observa que 24 h después de la radiación, permanece aproximadamente el 30% de los leucocitos y a partir de las 48 h la leucopenia es casi total y se mantiene en este nivel hasta los siete días.

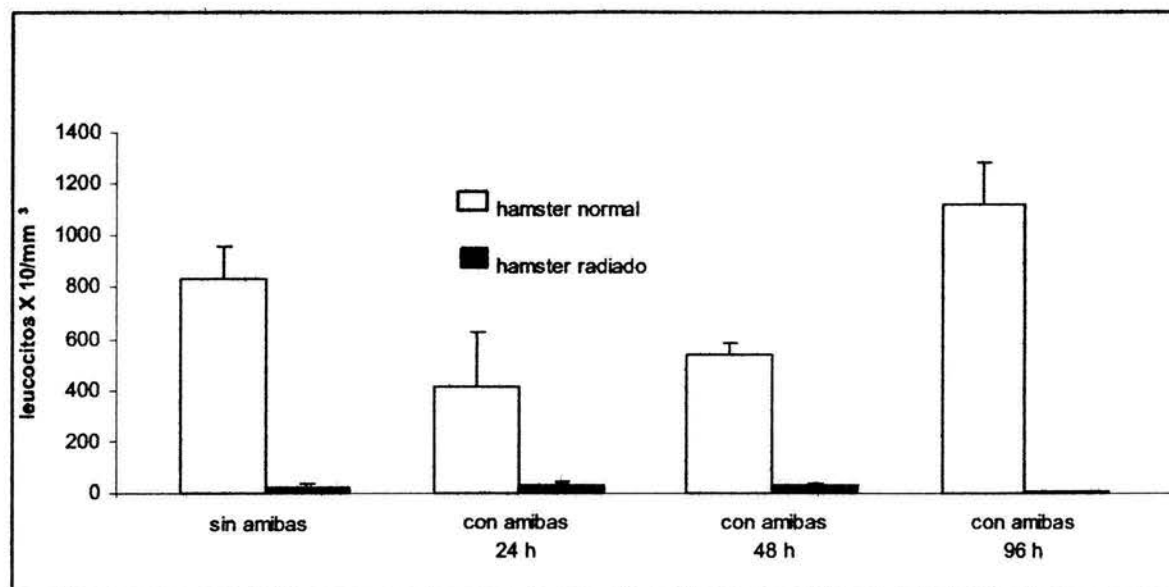


Fig. 20. Leucocitos en sangre periférica de hamsters normales y radiados inyectados con amibas. En los hamsters normales con amibas se observó una leucopenia parcial a 24 h que evolucionó a leucocitosis a las 96 h. En cambio, en los hamsters radiados con amibas, la leucopenia permaneció durante todo el experimento.

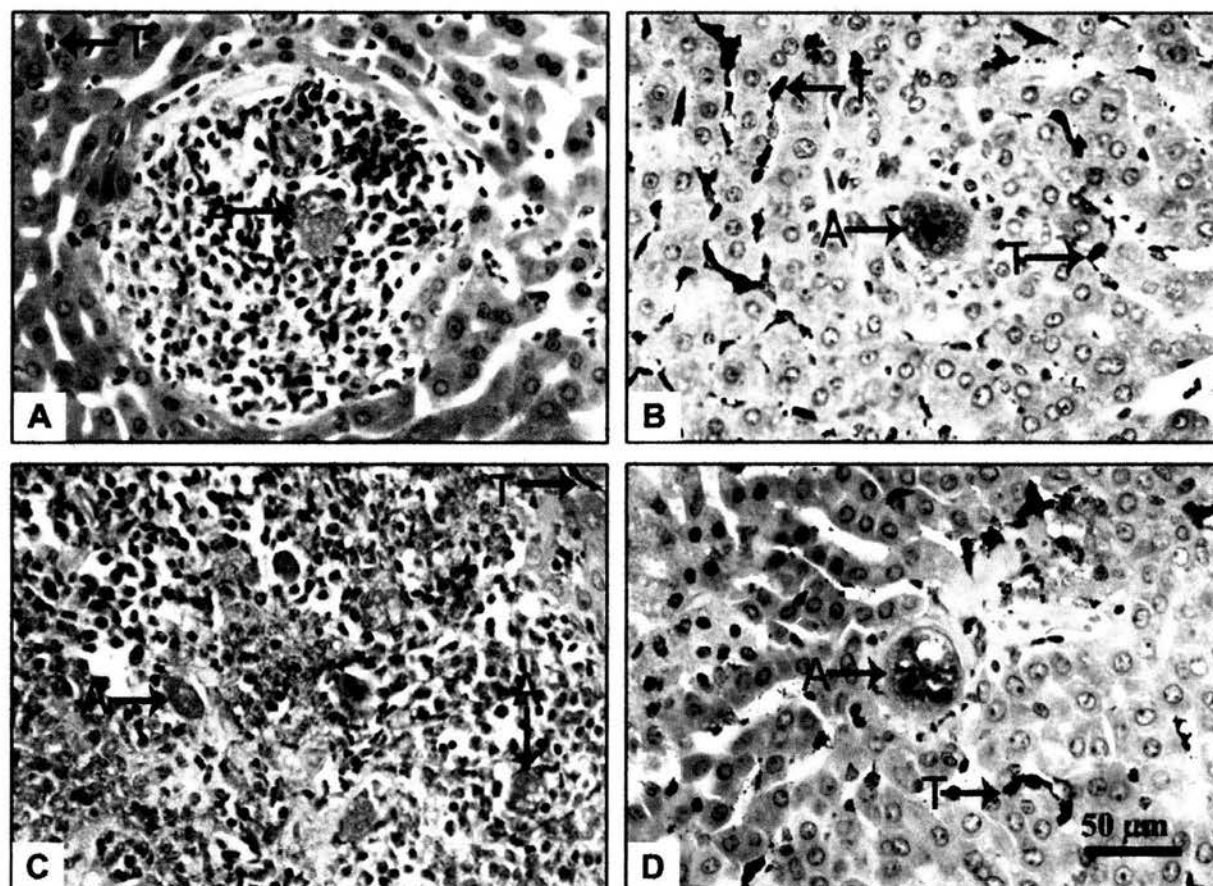


Figura 21. Histología de los hígados de los animales leucopénicos inyectados con amibas. **A**, control 6 h. **B**, leucopénico 6 h. Amibas bien conservadas. **C**, control 24 h. **D**, leucopénico 24 h, se observan restos de amibas (A). En los animales leucopénicos (**B** y **D**); nótese la ausencia de isquemia (presencia de tinta china (T) en sinusoides), células inflamatorias y destrucción tisular en la vecindad de las amibas (A).

Las microesferas de superdex mezcladas con amibas e inyectadas en el hígado de hamster leucopénico produjeron múltiples sitios de isquemia focal y la tinta china inyectada por vía intraportal antes del sacrificio fue incapaz de penetrar en estas áreas. Las amibas se observaron bien conservadas dentro de las zonas isquémicas hasta las 6 h (Fig. 22) y después de este tiempo desaparecieron.

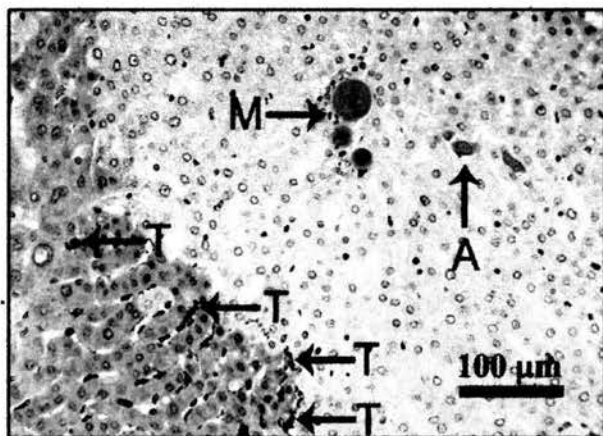


Figura 22. Aspecto microscópico del hígado de hamster, inyectado con amibas (A) mezcladas con microsferas de superdex (M). El área de isquemia se demuestra por la decoloración (en rosa) y por la falta de penetración de la tinta china (T) en esta zona. Se observan amibas bien conservadas sin células inflamatorias y sin necrosis (6 h).

Se purificaron 1.04 mg de FHVC a partir de 450 mg de extracto crudo de *Naja haje* (Fig. 23). La administración intraperitoneal del FHVC en hamsters indujo la baja del complemento en más del 95% y permaneció en este nivel durante por lo menos 72 h. El efecto citolítico amibiano del suero de hamster se bloqueó con la inyección intraperitoneal del FHVC, este efecto permaneció durante 72 h (Fig. 24). La inyección intraportal de amibas en hígados de hamsters leucopénicos + hipocomplementémicos permitió ahora la sobrevivencia de las amibas hasta por 24 h (Fig. 25), sin embargo, después de este tiempo los trofozoítos desaparecieron. Los hígados de los hamsters inyectados con amibas 2 h después de la radiación, mostraron a las 24 h lesiones similares a los controles, es decir; amibas bien conservadas, isquemia, leucocitos y necrosis (Fig. 26). Después de este tiempo, que es cuando se observa leucopenia casi total, las amibas desaparecen. El resumen de estos experimentos *in vivo* se puede observar en la Tabla 3.

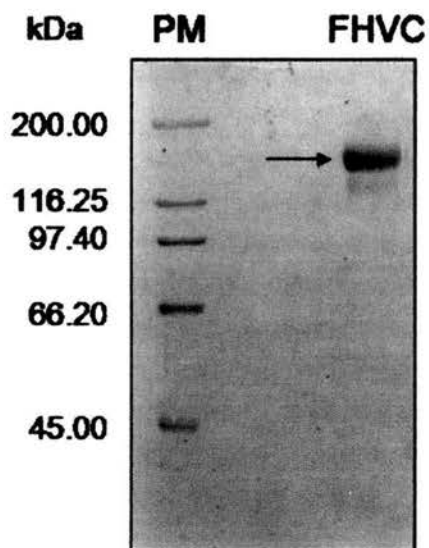


Fig. 23. Purificación del factor hipocomplementémico del veneno de cobra (FHVC) a partir de extracto crudo de *Naja haje*. Se aprecia principalmente una banda de proteína de ~ 144 kDa. (→) Esta proteína disminuyó los niveles de complemento de hamsters normales en más del 95%.

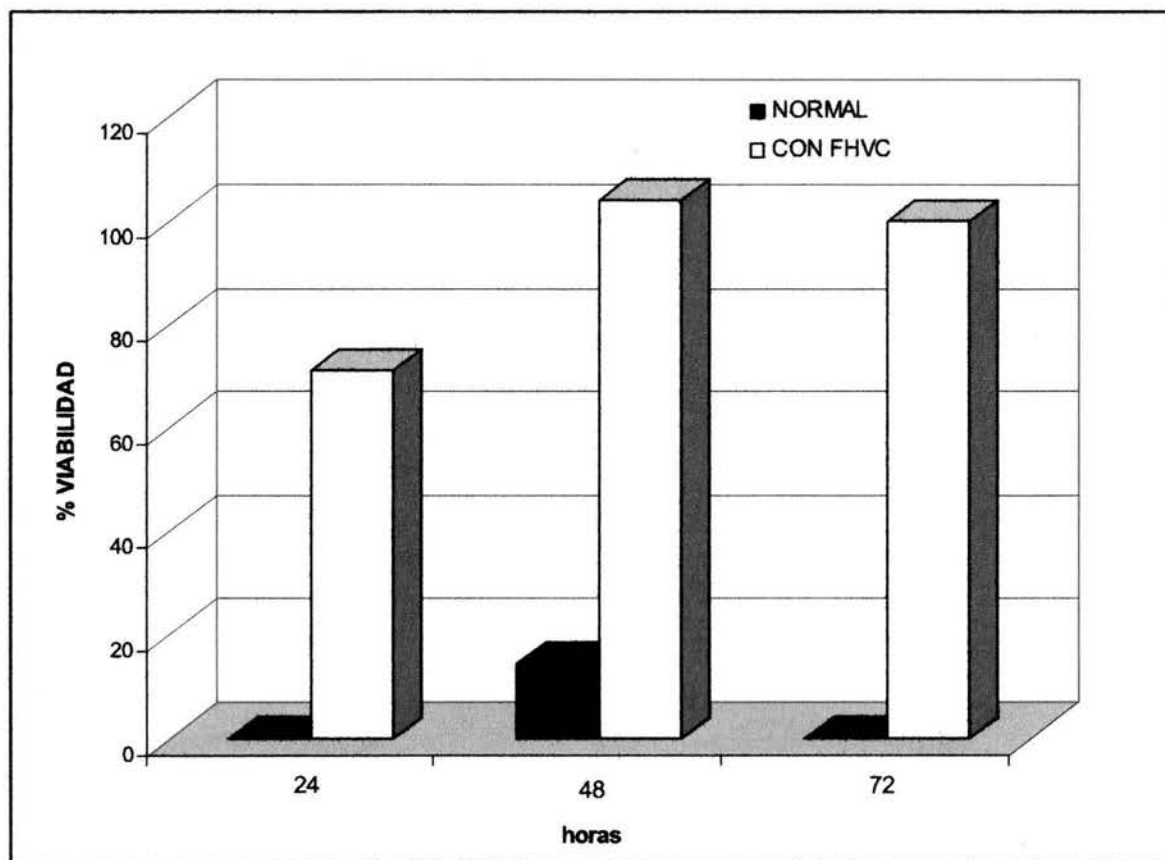


Figura 24. Capacidad amebicida del suero de hamster normal y del inyectado con FHVC. El suero normal es citotóxico para las amibas y el FHVC bloquea este efecto hasta por 72 h.

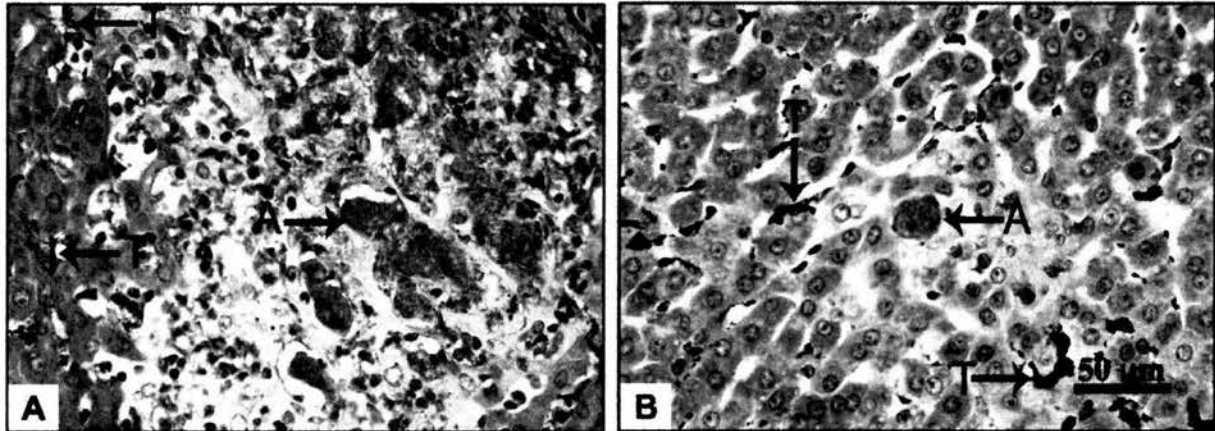


Figura 25. Efecto combinado de la leucopenia + hipocomplementemia en el desarrollo del AHAEH. **A**, control hipocomplementémico 24 h; se observan trofozoítos bien conservados (A) con infiltrado inflamatorio, necrosis e isquemia (demostrada por la ausencia de tinta china (T) en esta zona). **B**, leucopénico e hipocomplementémico 24 h; se observa una amiba (A) bien conservada sin infiltrado inflamatorio, sin necrosis y sin isquemia (la tinta china (T) está en los sinusoides).

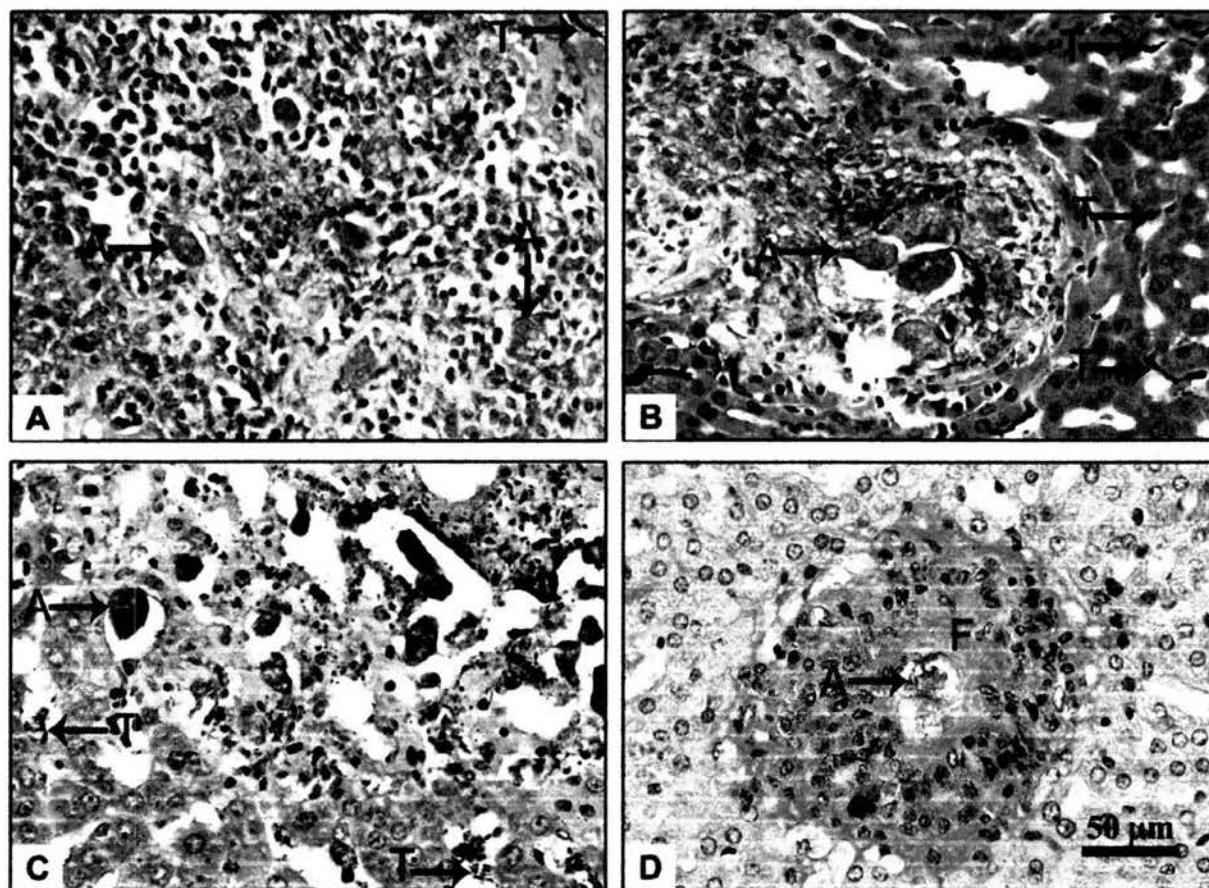


Figura 26. Histología de los hígados de los hamsters normales y de los inyectados con amibas, 2 h después de la radiación. **A**, control 24 h; muestra abundantes amibas (A), infiltrado inflamatorio, isquemia (sin tinta china (T)) y necrosis. **B**, radiado 24 h; se observan amibas bien conservadas (A) rodeadas de mínimo infiltrado inflamatorio y necrosis, la isquemia se demuestra por la ausencia de tinta china (T) en esta área. **C**, control 7 días; muestra amibas (A) en zonas de isquemia (sin tinta china (T)) y de necrosis con escaso infiltrado inflamatorio. **D**, radiado 7 días; se observan restos de amibas (A) inmersos en una malla de fibrina (F) y rodeadas por macrófagos.

Tabla 3.

Resumen de los experimentos que examinan el papel de la inflamación, complemento e isquemia en el AHAEH. *(amibas inyectadas 2 h después de la radiación), nd (no determinado), + (presencia de amibas bien conservadas), - (ausencia de amibas).

Tiempo de sacrificio	Control	Radiados	Radiados con microesferas	Hipocomplementémicos	Hipocomplementémicos y radiados	Radiados*
30 min						
amibas	+	+	nd	nd	nd	nd
lesiones	-	-	nd	nd	nd	nd
3 h						
amibas	+	+	nd	nd	nd	nd
lesiones	-	-	nd	nd	nd	nd
6 h						
amibas	+	+	+	+	+	nd
lesiones	-	-	-	-	-	nd
1 día						
amibas	+	-	-	+	+	+
lesiones	+	-	-	+	-	+
2 días						
amibas	+	-	-	+	-	nd
lesiones	+	-	-	+	-	nd
3 días						
amibas	+	-	-	+	-	nd
lesiones	+	-	-	+	-	nd
6 días						
amibas	+	nd	nd	nd	nd	-
lesiones	+	nd	nd	nd	nd	-

La administración intraperitoneal de CsA en los hamsters inyectados con amibas causó una inmunosupresión que se mantuvo hasta el sacrificio de los animales (Tabla 4).

Tabla 4.

Proliferación de células T de bazo (estimuladas con Con-A) de animales normales e inmunosuprimidos, inyectados con amibas (7 días).

	Incorporación de ³ H-timidina en células T (proliferación)
Hamster normal	76,094±19,468
Hamster con CsA	800±173

El aspecto macroscópico de los hígados de los hamsters inyectados con CsA mostró mínimas lesiones, con respecto al control (sin CsA). En la histología de los hígados control se observaron algunas amibas bien conservadas dentro de zonas con necrosis extensa e infiltrado inflamatorio. En cambio en los hígados de los animales tratados con CsA se observaron múltiples cúmulos de amibas bien conservadas, rodeadas de mínimo infiltrado inflamatorio y sin necrosis (Fig. 27)

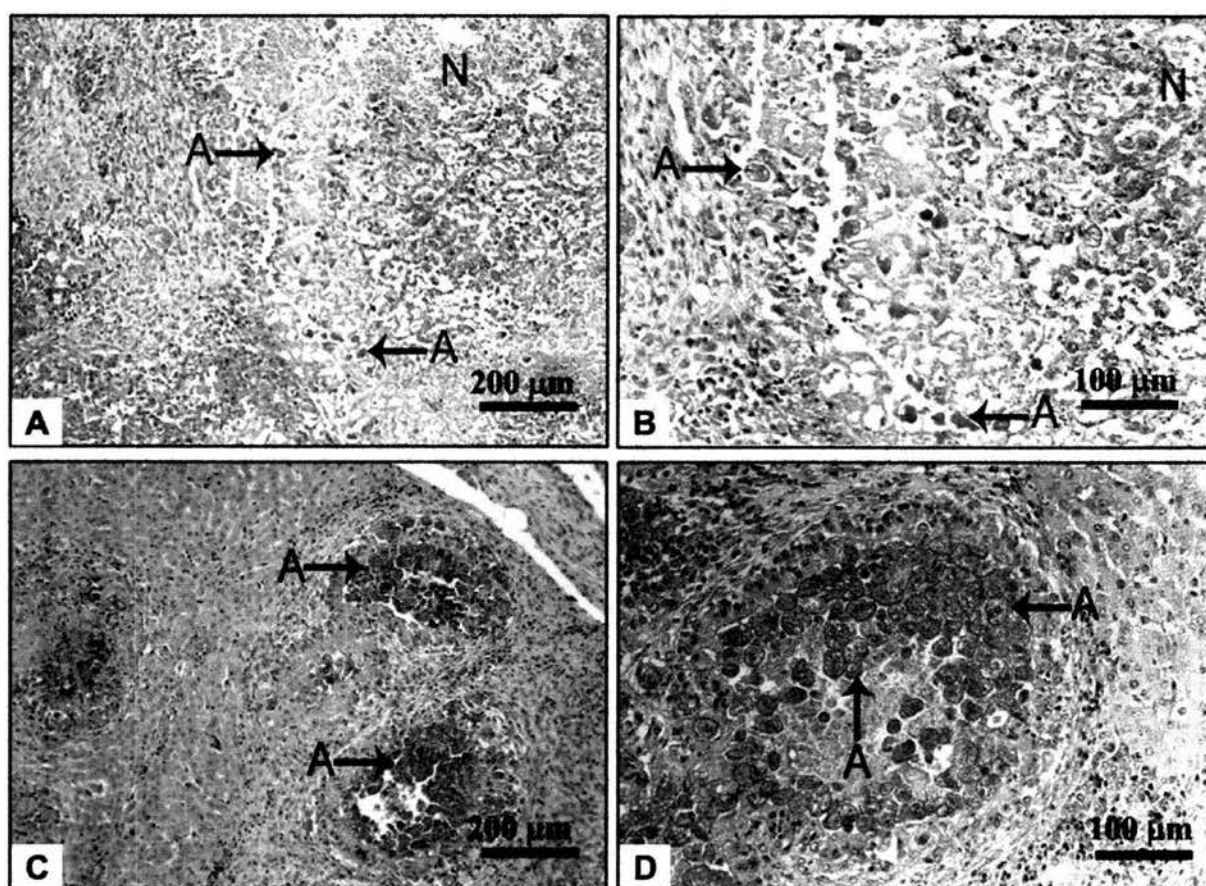


Figura 27. Efecto de la inmunosupresión con CsA sobre el desarrollo del AHAEH (7 días). **A**, hígado de hamster control; se observa necrosis extensa (N) y a mayor aumento **B**, se aprecian algunas amibas (A) bien conservadas, polvo nuclear y escaso infiltrado inflamatorio. **C**, hígado de hamster inmunosuprimido con CsA; se observan dos cúmulos de amibas (A) y a mayor aumento **D**, se aprecian abundantes amibas (A) bien conservadas, con escaso infiltrado inflamatorio y sin necrosis.

DISCUSIÓN

EhCP2

La purificación de EhCP2 en dos etapas, descrita en este trabajo, tuvo un rendimiento satisfactorio (Tabla1), mucho más alto del descrito previamente para una proteasa de 30 kDa con un protocolo diferente (Montfort *et al.*, 1994). Durante la extracción se evitaron los detergentes y en su lugar se usó éter, que es fácil de eliminar. La adición de ZnCl₂ al extracto amibiano y la primera etapa de purificación por filtración molecular eliminó muchas proteínas y la segunda etapa por electroelución en Prep-Cell completó la purificación. La secuenciación de la fracción II de la proteína purificada mostró que el producto final es una mezcla de EhCP2 y Eh-Ubiquitina(s), que puede ser una de las formas en que tales moléculas existen normalmente en el parásito. La mayor parte de la proteína purificada en nuestra preparación es EhCP2 y la(s) Eh-ubiquitina(s) están presentes en cantidades mínimas, debido a que nunca se observó alguna banda cercana a 8.5 kDa en electroforesis-SDS (Wostmann *et al.*, 1992), a pesar de teñir el gel con solución de plata.

Durante todo el procedimiento de purificación, la actividad proteolítica inhibible con E-64 se mantuvo y se asoció con proteínas de masa molecular de 30 kDa. Cuando la proteína purificada se examinó en electroforesis-SDS, se observaron bandas de diferente masa molecular con actividad proteolítica, que regresaron a una banda proteica de aproximadamente 30 kDa cuando la muestra fue hervida en presencia de EDTA, DTT y iodoacetamida. Debido a que casi todos los genes clonados hasta la fecha codifican para proteínas con masa molecular de aproximadamente 30kDa (Bruchhaus *et al.*, 1996), la existencia de CPs provenientes del mismo parásito con masas moleculares de 16-96 kDa (Avila y Calderón, 1993; Keene *et al.*, 1986; Luaces y Barrett, 1988; Lushbaugh *et al.*, 1985; McLaughlin y Faubert, 1976; Montfort *et al.*, 1994; Navarro-García *et al.*, 1995) debe tener una explicación post-traducciona. Se ha sugerido que durante la electroforesis-SDS las EhCPs de bajo peso molecular provienen de sus precursores por autoproteólisis (López-Revilla *et al.*, 1993). Por otra parte, Hellberg *et al.*

(2000) cortaron del gel de electroforesis-SDS las bandas proteicas de 35 y 48 kDa con actividad proteolítica, y las secuenciaron; éstas resultaron ser EhCP2 y EhCP1 respectivamente, que son codificadas por genes con productos de 30kDa. Lo anterior sugiere un fenómeno de oligomerización/agregación, con el que estamos de acuerdo.

El efecto estabilizante de las IgG anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica de los trofozoítos vivos y las EhCPs purificadas por afinidad, fue un resultado interesante. Aunque no tenemos explicación para este fenómeno, éste ya ha sido observado con otros anticuerpos anti-enzima (Jafri *et al.*, 1993; Khan e Iqbal, 2000) y frecuentemente se atribuye a cambios en la conformación de la enzima causados por el anticuerpo, sin alteración del sitio catalítico. Con el objeto de estimular la producción de anticuerpos protectores a la amibiasis experimental, algunas moléculas amibianas han sido utilizadas como inmunógenos (Cheng *et al.*, 1999; Marinets *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994). Ciertas CPs de 56-66 kDa secretadas por *E. histolytica* y purificadas parcialmente, se usaron para tal propósito por Gupta *et al.* (1999) y no observaron correlación alguna entre títulos de anticuerpos y protección. En 83% de los pacientes humanos con amibiasis invasiva se detectaron anticuerpos anti-proteasas, mientras que en los infectados con *E. dispar* éstos estuvieron ausentes (Reed *et al.* 1989). La clase de Ig puede ser importante ya que anticuerpos IgA anti-EhCPs inhiben eficientemente la actividad proteolítica *in vitro* (Guerrero-Manríquez *et al.* 1998). La frecuencia y el efecto de los anticuerpos anti-EhCPs estabilizantes producidos por el hospedero durante el desarrollo de lesiones amibianas experimentales, todavía no han sido estudiados.

La inyección intraportal en hamsters con proteasa EhCP2 incorporada en microesferas de liberación lenta (de tamaño semejante a los trofozoítos de *E. histolytica*) y el estudio inmunohistoquímico e histológico del hígado a 3, 24 y 96 h después de la inyección, mostró que EhCP2 es capaz de inducir una reacción inflamatoria moderada, acompañada ocasionalmente de necrosis en los alrededores de algunas microesferas, que desaparecen a las 96 h. Admitimos que esta "amiba sintética" es un modelo muy crudo del parásito real, sin

embargo representa el primer intento de examinar la participación de un solo componente molecular de *E. histolytica* en el daño del tejido, en un modelo de amibiasis *in vivo* en ausencia de otros posibles elementos amibianos participantes. Dos de los principales problemas en esta situación experimental, son el desconocimiento de la cantidad de enzima liberada, tanto de las microesferas inertes como de los trofozoítos en las lesiones *in vivo*, y el hecho que una sola dosis de la enzima debe tener un efecto bioquímico muy breve. Sin embargo, se saben dos cosas: primero, que la cantidad de enzima incorporada y liberada por cada microesfera es variable (semejante a los trofozoítos amibianos) y segundo, que cualquier cantidad que ésta sea, la mayor parte es proteína con actividad proteolítica. A pesar de estas limitaciones, los resultados sugieren que EhCP2 es capaz de inducir una moderada reacción inflamatoria y mínima necrosis en el tejido hepático. Se ha demostrado que las EhCPs activan C3 (Reed y Gigli 1990) con la consecuente liberación de péptidos quimiotácticos (C3a y C5a) y rápida llegada de PMNs, que en lesiones experimentales agudas se desintegran, liberan enzimas lisosomales y dañan células vecinas y elementos intercelulares (Tsutsumi y Martínez-Palomo 1988; Tsutsumi *et al.* 1984). Es probable que los cambios morfológicos observados alrededor de las microesferas con EhCP2 incorporada, después de llegar al tejido hepático, pueda explicarse por este mecanismo, a pesar de que las amibas pueden causar daño en tejidos de animales leucopénicos (Velázquez *et al.*, 1998).

La correlación del nivel de actividad proteolítica en *E. histolytica* con la virulencia es controversial (Gadasi y Kobilier 1983; Ankri *et al.* 1998; Hellberg *et al.*, 2001; Montfort *et al.*, 1992). Experimentos *in vitro* han mostrado que las amibas secretan proteasas al medio de cultivo (Reed y Gigli 1990; Leippe *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1996) y se ha sugerido que tales proteasas son responsables, por lo menos en parte, de la extensa destrucción de tejidos que caracteriza a esta enfermedad. Ventura-Juárez *et al.* (1997) tiñeron lesiones amibianas experimentales iniciales mediante inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales anti-extractos amibianos totales y mostraron que además de la tinción positiva de los trofozoítos

amibianos, había difusión de material positivo alrededor de éstos. Por otra parte, Stanley *et al.* (1995) tiñeron los trofozoítos amibianos en cortes de hígados de ratones SCID con abscesos amibianos, utilizando un anticuerpo policlonal anti-EhCP1 y afirman haber detectado tinción positiva fuera de los parásitos. En nuestros estudios inmunohistoquímicos en abscesos hepáticos amibianos experimentales, frecuentemente detectamos EhCP2 en la amibas y nunca hemos observado tinción positiva de EhCP2 fuera de la amiba. Tal resultado negativo podría explicarse por la no secreción de EhCP2 ó por muy baja concentración de la enzima en el espacio extra-amibiano, por debajo del límite de detección de las técnicas utilizadas. Hellberg *et al.* (2001) inyectaron en hígados de gerbos, trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* que por transfección fueron diseñados para sobre-expresar 2.8 veces más EhCP2; siete días después, no observaron diferencias con respecto a los controles (*E. histolytica* y *E. dispar* sin transfectar), i.e., la virulencia de *E. histolytica* no aumentó y *E. dispar* permaneció no patógeno. Estos resultados podrían explicarse si la sobre expresión no se acompañara de secreción de la enzima. El anticuerpo anti-EhCP2 no presentó reacción cruzada con EhCP5, sin embargo no ha sido probado con las otras EhCPs, pero resulta poco probable que éstas contribuyan al desarrollo de la extensa y rápida destrucción del tejido alrededor del parásito, ya que las lesiones amibianas no disminuyeron en los hamsters del grupo 3 (hamsters tratados con E-64 + amibas virulentas) en los que el inhibidor de EhCPs estuvo activo y en circulación durante todo el experimento. Esto último se demostró por la ausencia casi completa de actividad de proteasas de cisteína en los hepatocitos de los animales de este grupo (Fig. 17). El trabajo de Hellberg *et al.* (2001) y estos resultados comparten la sugerencia que EhCP2 no es secretada y no está directamente involucrada en la destrucción del tejido en la amibiasis hepática experimental en hamsters.

Inhibición de EhCPs con E-64

Los resultados de los experimentos *in vitro* con amibas crecidas por 72 h en E-64 mostraron que la inhibición total de sus proteasas de cisteína (demostrada por tres técnicas diferentes), no tuvo efecto sobre su crecimiento, viabilidad, resistencia a complemento, capacidad hemolítica y efectos citotóxicos. En cambio, la eritrofagocitosis y resistencia eléctrica transepitelial sobre monocapas de células MDCK sí se redujeron. La conservación de la viabilidad y otras propiedades de las amibas *in vitro* a pesar de la completa y prolongada ausencia de actividad de proteasa de cisteína, sugiere que el medio debe contener todos los elementos requeridos para su metabolismo. Por otra parte, la actividad de CPs parece ser un requerimiento esencial de las amibas para su supervivencia en condiciones *in vivo*, por lo menos en el modelo experimental AHAEH. La causa de la desaparición de las amibas se desconoce, pero se puede sospechar que ocurre pocas horas después de la inyección. Los animales del grupo 2 (hamsteres normales + amibas crecidas en E-64), desarrollaron lesiones iguales al grupo 1 (control). En esta situación, la inyección de las amibas en la vena porta es equivalente a la eliminación del inhibidor del medio de cultivo, con la recuperación progresiva de la actividad de proteasa de cisteína por las amibas en las siguientes 3-24 h. Tal como fue observado *in vitro*, cuando las amibas crecieron en E-64 y posteriormente se incubaron en medio sin el inhibidor (actividad detectada con el sustrato AMNP (Fig. 15)).

El grupo 3 (hamsteres tratados continuamente con E-64 + amibas no tratadas) desarrolló lesiones similares a las del grupo 1 (control). Este resultado requiere una explicación más elaborada que debe incluir por lo menos dos elementos: 1) la incapacidad del E-64 para afectar la capacidad citotóxica de las amibas cuando se adiciona al cultivo a tiempo 0 ó durante las 72 h del cultivo, demostrado en los experimentos *in vitro* de coincubación con células blanco; 2) el rápido desarrollo de isquemia en pequeñas lesiones hepáticas amibianas experimentales podría prevenir el contacto de las amibas con el inhibidor de proteasas de cisteína presente en

la sangre. Es probable que el efecto combinado de estos dos elementos pueda explicar la sobrevida de los parásitos y el desarrollo del daño tisular en el grupo 3.

Los trofozoítos amibianos que crecieron en presencia de E-64 y se inyectaron en la vena porta de los hamsters tratados continuamente con el mismo inhibidor (grupo 4), produjeron pequeñas lesiones hepáticas de rápida involución que desaparecieron en aproximadamente 20 h. La ausencia de amibas y lesiones en el tejido hepático del grupo 4, puede sugerir que la actividad de proteasa de cisteína está relacionada directamente con el inicio de la inflamación y daño del tejido, ya que en ausencia de ésta no se desarrollan lesiones. Pero este punto de vista ignora el hecho de que la total inhibición de la actividad de proteasas de cisteína no influye en la citotoxicidad amibiana *in vitro* ni en la inflamación inicial *in vivo*, y además no explica la rápida desaparición de las amibas cuando no hay destrucción celular ni tisular. Una explicación alterna podría ser que al inicio de la infección, la actividad de proteasas de cisteína del parásito sea indispensable para su sobrevida y que ésta a su vez sea necesaria para el desarrollo de las lesiones del tejido, causadas por moléculas amibianas diferentes a EhCPs, o por moléculas del hospedero hasta ahora desconocidas, o ambas. Por otra parte, la inflamación puede favorecer la sobrevida de la amiba en el tejido hepático, ya que debido a la rápida isquemia generada por ésta, los abscesos hepáticos crean las condiciones anaeróbicas que los trofozoítos requieren para crecer *in vitro* y simultáneamente aíslan al parásito de componentes séricos peligrosos, como el complemento.

Amibas en hígados de hamster leucopénico

Los dos principales resultados de los experimentos con hámsters leucopénicos son: 1) En ausencia de células inflamatorias, los trofozoítos de *E. histolytica* virulenta no causan daño en el hígado de hamster. Esta propuesta fue sugerida por primera vez por Tsutsumi *et al.* (1984) y por Tsutsumi y Martínez-Palomo (1988) a partir de estudios con el microscopio electrónico del AHAEH. Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que en otras condiciones

experimentales, las amibas causan destrucción tisular en ausencia de PMNs (Rivero-Nava *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 1998). Lo anterior sugiere que los factores que contribuyen al daño celular y tisular en distintas especies y órganos, pueden ser diferentes. 2) *E. histolytica* desaparece del hígado de hamster en ausencia de una respuesta inflamatoria. Las amibas permanecieron bien conservadas en el hígado por 6 h; a las 24 h disminuyeron en número y después de este tiempo se observaron destruidas. La sugerencia de que en estas condiciones, el complemento eliminó a las amibas debido a la ausencia de isquemia que la inflamación normalmente crea, no es apoyada por nuestros experimentos con el FHVC, ya que las amibas desaparecieron del hígado de hamsters leucopénicos + hipocomplementémicos, al mismo tiempo que de los animales leucopénicos que tienen niveles normales de complemento sérico. Capín *et al.* (1980) informaron que las lesiones amibianas hepáticas (20 días) fueron más grandes en hámsters hechos hipocomplementémicos con el FHVC, pero estos animales no eran leucopénicos. Ellos interpretaron sus resultados como la consecuencia del incremento en la sobrevivencia de las amibas. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, hecho para explorar el mecanismo(s) de resistencia natural de la rata a la infección con la misma *E. histolytica* virulenta utilizada en el presente trabajo, se descartaron las células inflamatorias y el complemento pero no se analizó la causa de la rápida desaparición de las amibas de los hígados de los animales leucopénicos e hipocomplementémicos. El posible papel de la isquemia (generada por inflamación durante el AHAEH en los animales normales) como creadora de un microambiente anaeróbico local que debiera ser favorable para el parásito no es compatible con nuestros resultados de isquemia focal hepática inducida por la inyección intraportal de trofozoítos virulentos mezclados con microesferas de superdex. En ausencia de inflamación, la isquemia no preserva a las amibas mas allá del tiempo en que los parásitos desaparecen del hígado de los animales leucopénicos o hipocomplementémicos + leucopénicos. Los dos puntos anteriormente discutidos pueden resumirse como sigue: en el AHAEH la inflamación es necesaria tanto para el daño del tejido como para la sobrevivencia

amibiana. No es claro por qué las amibas son incapaces de sobrevivir en ausencia de células inflamatorias. La idea actual acerca de que las amibas sobreviven debido a que resisten y modulan los mecanismos citotóxicos de PMNs y macrófagos (Campbell y Chadee, 1997) es inadecuada para explicar nuestros resultados. En cambio, por contradictorio que pueda parecer, es posible que las células inflamatorias proporcionen a las amibas nutrientes o algún tipo de estímulo necesario para sobrevivir y multiplicarse en el hígado. Es claro que el AHAEH es un proceso biológico complejo en el que hospedero y parásito desempeñan funciones cambiantes pero antes de abordar este difícil tema debemos centrarnos en los problemas aparentemente simples presentados en el AHAEH como son, "los requerimientos básicos para la sobrevivencia de los trofozoítos una vez que entran en la vena porta".

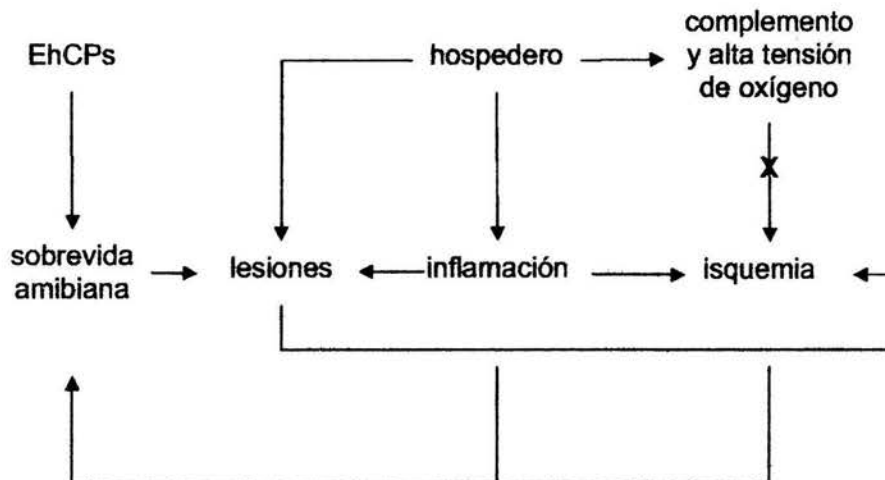
Amibas en hígado de hamster inmunosuprimido con CsA

La ciclosporina A es un compuesto que tiene acción inmunosupresora en el hombre y en algunos roedores, ya que se une a la ciclofilina de los linfocitos T, este complejo interrumpe la transcripción de algunos genes, como el de IL-2, involucrados en procesos como señalización y replicación celular (Clipstone y Crabtree, 1992). En los hígados de los hamsters inyectados con CsA, la presencia del gran cúmulo de amibas viables rodeadas por mínimo infiltrado inflamatorio, apoya la idea de que las células inflamatorias son necesarias para la sobrevivencia de la amiba, ya que a diferencia de lo que ocurre con los hamsters leucopénicos, en los que las amibas mueren y desaparecen, esa cantidad de células inflamatorias son suficientes para proporcionar (directa o indirectamente) algún estímulo o nutriente que las amibas necesitan para sobrevivir. Además, la escasa destrucción tisular en presencia de grandes cúmulos de amibas viables observada en los animales tratados con CsA, apoya la idea de que la respuesta inmune del hospedero sea la principal responsable del daño al tejido en el AHAEH. El daño tisular ocasionado por el hospedero se observa durante el desarrollo de la tuberculosis, la leishmaniasis y la tripanosomiasis (Soares *et al.* 1999; Engwerda *et al.* 2004; Eruslanov *et al.*

2005). Es probable que en el AHAEH las colagenasas, proteasas, citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, participen en el proceso de destrucción tisular y además favorezcan la sobrevivencia amibiana. Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de algunas funciones amibianas como eritrofagocitosis y actividad proteolítica, causan la disminución de los abscesos durante la amibiasis hepática experimental (Tsutsumi *et al.* 1992; Ankril *et al.* 1999). Sin embargo, al final del experimento con CsA, las amibas fueron viables, cultivables, y su actividad proteolítica y de eritrofagocitosis no se modificaron, por lo que la interferencia de la CsA en estas funciones queda descartada.

CONCLUSIÓN

ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO AGUDO EXPERIMENTAL EN HAMSTER



Durante el desarrollo del absceso hepático amibiano agudo experimental en hamsters, las proteasas de cisteína de *E. histolytica* son indispensables para su supervivencia. Por otra parte, las células inflamatorias del hospedero son las principales responsables de la destrucción tisular y al mismo tiempo son indispensables para la supervivencia del parásito y progresión de las lesiones.

REFERENCIAS

1. Ankri, S., Stolarsky, T., Mirelman D., 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular Microbiology* 28(4), 777-785
2. Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., Mirelman, D., 1999. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infection and Immunity* 67(1), 421-422
3. Avila, E., Calderón, J., 1993. *Entamoeba histolytica* Trophozoites: A surface-associated cysteine protease. *Experimental Parasitology* 76:232-241
4. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
5. Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., Tannich, E., 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Molecular Microbiology* 22(2), 255-263
6. Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall N., Tannich E., 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell* 2, 501-509
7. Campbell D., Chadee K., 1997. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitology Today* 13(5), 184-190
8. Capín, R., Capín, N.R., Carmona, M., Ortiz-Ortiz, L., 1980. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. *Archivos de Investigación Médica (México)* 11 S1, 173-180
9. Carrero, J.C., Petrosian, P., Olivos, A., Sánchez-Zerpa, M., Ostoa-Soloma, P., Laclette, J.P., 2000. Effect of cyclosporine A on *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 31, S8-S9

10. Cheng, X., Tachibana, H., Kaneda, Y., 1999. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 85, 78-80
11. Clipstone N.A., Crabtree G.R., 1992. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697
12. De Meester, F., Shaw, E., Scholze, H., Stolarsky, T., Mirelman, D., 1990. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 58(5), 1396-1401
13. Denis, M., Chadee, K., 1988. *In vitro* and *In vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. *Infection and Immunity* 56(12), 3126-3131
14. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 72, 431-432
15. Engel, J.C., Doyle, P.S., Palmer, J., Hsieh, I., Bainton, D.F., McKerrow, J.H., 1998. Cysteine protease inhibitors alter golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science* 111, 597-606
16. Engwerda C.R., Ato M., Kaye P.M., 2004. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology* 20(11), 524-530
17. Eruslanov E. B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Majorov K.B., Scheglov I.V., Orlova M.O., Apt A.S., 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infection and Immunity* 73(3), 1744-1753
18. Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 318-331
19. Gadasí, H., Kobilier. D., 1983. *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Experimental Parasitology* 55, 105-110

20. Guerrero-Manríquez, G., Sánchez-Ibarra, F., Avila, E., 1998. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 106, 1088-1094
21. Gupta, S., Naik, S., Naik, S.R., 1999. Vaccine potential of 56-66 kDa protease secreted by *Entamoeba histolytica*. *Indian Journal of Medical Research* 109, 141-146
22. Hellberg, A., Leippe, M., Bruchhaus, I., 2000. Two major higher molecular mass proteinases of *Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105, 305-309
23. Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E., Bruchhaus, I., 2001. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction *in vitro* but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cellular Microbiology* 3, 13-20
24. Huston, C. D., Haque, R., Petri W.A., 1999. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Exp. Rev. Mol. Med.* 22 March, <http://www.expertreviews.org/99000599h.htm>
25. Jafri, F., Husain, S., Saleemuddin, M., 1993. Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 18, 401-408
26. Katunuma, N., Kominami, E., 1995. Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods in Enzymology* 251, 382-397
27. Keller, F., Walter, C., Lohden, U., Hanke, W., Bakker-Grunwald, T., Trissl D., 1988. Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *Journal Protozoology* 35, 359-365
28. Khan, S.A., Iqbal, J., 2000. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 32, 89-94

29. Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S., McKerrow, J.H., 1986. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* 163, 536-549
30. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
31. López-Vancell, R., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2000. Galactose-specific adhesion and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 86, 226-231
32. Leippe, M., Sievertsen, J., Tannich, E., Hortsman, D., 1995. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 111, 569-574
33. Li, E., Yang, W.G., Zhang, T., Stanley, S.L., 1995. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infection and Immunity* 63(10), 4150-4153
34. López-Revilla, R., Canto-Ortiz, L., Jiménez-Delgadillo, B., Chávez-Dueñas, L., 1993. Proteinases resistant to sodium dodecyl sulfate-induced autoproteolysis of *Entamoeba histolytica* HK-9 trophozoites. *Parasitology Research* 79, 168-171
35. Luaces, A.L., Barrett, A.J., 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biochemistry* 250, 903-909
36. Lushbaugh, W.B., Hofbauer, F., Pittman, F.E., 1985. *Entamoeba histolytica*: Purification of Cathepsin B. *Experimental Parasitology* 59, 328-336
37. Marinets, A., Zhang, T., Guillén, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., Scheiner, O., Wiedermann, G., Stanley, S.L., Duchene, M., 1997. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on a surface of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* 186(9), 1557-1565

38. Meredith, M., 1988. Rat hepatocytes prepared without collagenase: Prolonged retention of differentiated characteristics in culture : *Cell Biology and Toxicology* 4, 405-425
39. McLaughlin, J., Faubert, G., 1976. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Canadian Journal of Microbiology* 23, 420-425
40. Molinari, J.L., Mejia, H., White, A.C., Garrido, E., Borgonio, V.M., Baig, S., Tato, P., 2000. *Taenia solium*: A cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes *in vitro*. *Experimental Parasitology* 94, 133-142
41. Montfort, I., Olivos, A., Pérez-Tamayo, R., 1992. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 23(2), 177-179
42. Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., González, C.A., García de León, M.C., Olivos, A., Tello, E., 1993. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the citopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *Journal of Parasitology* 79(1), 98-105
43. Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., Pérez-Montfort, R., González, A., Olivos, A., 1994. Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 80, 607-613
44. Morrison, D., Kline, L.L., 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Journal of Immunology* 118, 362-368
45. Navarro-García, F., Chávez-Dueñas, L., Tsutsumi, V., Posadas del Rio, F., López-Revilla, R., 1995. *Entamoeba histolytica*: Increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Experimental Parasitology* 80, 361-372

46. North, M.J., Mottramand, J.C., Coombs, G.H., 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 6(8), 270-275
47. Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez-Medina, L., Montfort, I., Becker, I., 1987. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 26, 87-98
48. Pérez-Tamayo, R., 1986. Pathology of amebiasis. *In Amebiasis*, Martínez-Palomo A (ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p.45-49
49. Pérez-Tamayo, R., Becker, I., Montfort, I., Pérez-Montfort, R., 1990. Pathobiology of amebiasis. *In Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica*, Kretchmer R (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 123-157
50. Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Tello, E., Olivos, A., 1992. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *International Journal for Parasitology* 22(1), 125-129
51. Reed, S.L., Keene, W., Mckerrow, J., 1989. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Journal Clinical Microbiology* 27(12), 2772-2777
52. Reed, S.L., Gigli, I., 1990. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *Journal of Clinical Investigation* 86, 1815-1822
53. Rivero-Nava, L., Aguirre-García, J., Shibayama-Salas, M., Hernández-Pando, R., Tsutsumi, V., Calderón, J., 2002. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-deleted mice. *Experimental Parasitology* 101,183-192
54. Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology* 120, 1-21
55. Scholze, H., Tannich, E., 1994. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods in Enzymology* 244, 512-523

56. Serrano, J.J., De la Garza, M., Reyes, M., León, G., Tovar, R., Muñoz, M.L., 1996. *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitology Research* 82, 200-205
57. Sharma, S., Jabeen, T., Singh, R.K., Bredhorst, R., Vogel, C.W., Betzel, C., Singh, T.P., 2001. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallographic Section D: Biol Crystallographic* 57, 596-598
58. Soares M.B., Santos R.R., 1999. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 S1, 257-262
59. Stanley, S.L., Shang, T., Rubin, D., Li, E., 1995. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity* 63(4), 1587-1590
60. Stanley, S.L., Reed, S.L., 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *American Journal Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280, 1049-1054
61. Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A., 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *American Journal of Pathology* 117, 81-90
62. Tsutsumi, V., 1988. Pathology of experimental amebiasis. *In Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*, Ravdin JI (ed.). John Wiley & Sons, New York, 147-165
63. Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A., 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *American Journal of Pathology* 130, 112-119
64. Tsutsumi V., Ramirez-Rosales A., Lanz-Mendoza H., Shibayama M., Chavez B., Rangel-López E., Martínez-Palomo A., 1992. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86(2), 170-172

65. Velázquez, C., Shibayama-Salas, M., Aguirre-García, J., Tsutsumi, V., Calderón, J., 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunology* 20, 255-262
66. Van den Berg, C.W., Aerts, P.C., Van Dijk, H., 1991. In vivo anti-complementary activities of the cobra venom factors from *Naja naja* and *Naja haje*. *Journal Immunology Methods* 136, 287-294
67. Ventura-Juárez, J., Campos-Rodríguez, R., Ramirez-Rosales, A., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., 1997. Early *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with hepatic parenchymal and inflammatory cells of hamster. *Archives of Medical Research* 28, 211-213
68. Walsh, J.A., 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases* 8, 228-238
69. World Health Organization., 1997. Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiologic Record* 72, 97-100
70. Wostmann, C., Tannich, E., Bakker-Grunwald, T., 1992. Ubiquitin of *Entamoeba histolytica* deviates in six amino acid residues from the consensus of all other known ubiquitins. *FEBS Letters* 308(1), 54-58
71. Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., 1981. Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano- and microspherical carriers of gelatin. *International Journal of Pharmacology* 81, 131-141
72. Zhang, T., Cieslak, P.R., Stanley, S.L., 1994. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infection and Immunity* 62(4), 1166-1170

73. Zhang, Z., Ya, L., Wang, L., Seyde, K.B., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D., Stanley, S.L., 2000. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Molecular Microbiology* 37(3), 542-548

PUBLICACIONES

Alfonso Olivos-García · Augusto González-Canto
Rosario López-Vancell · María del Carmen García de León
Eusebio Tello · Mario Nequiz-Avedaño
Irmgard Montfort · Ruy Pérez-Tamayo

Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters

Received: 24 August 2002 / Accepted: 5 September 2002 / Published online: 27 February 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract Amebic cysteine protease 2 (EhCP2) was purified from ethyl ether extracts of axenically grown trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HM1-IMSS. The purification procedure involved molecular filtration and electroelution. Sequence analysis of the purified product revealed EhCP2 and ubiquitin(s). Electrophoretic migration patterns, isoelectric point determination and Western blot studies failed to reveal other EhCP molecules. Polyclonal antibodies against the purified EhCP2 prepared in rabbits either stabilized or enhanced the enzyme activity in a dose-response manner. Purified EhCP2 was enclosed within inert resin microspheres (22–44 μm in diameter) and injected into the portal vein of normal hamsters. In the liver, the microspheres caused mild acute inflammation and occasional minimal necrosis of short duration. Sections of the liver were immunohistochemically stained with the anti-EhCP2 antibody and the microspheres were positive for only a very short period (1 h) after injection. Sections of experimental acute (1 day, 5 days) amebic liver abscess produced in hamsters were also stained with the anti-EhCP2 antibody; and amebas were intensely positive but no staining was observed at any time in the surrounding necrotic structures. It is suggested that EhCP2 plays either a minor or no role in the causation of tissue damage in experimental acute liver amebiasis.

Introduction

The human disease caused by *Entamoeba histolytica* is characterized by acute inflammatory and rapidly necrotizing lesions in the large intestine and other organs (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000; Pérez Tamayo 1986; Pérez Tamayo et al. 1990); and the same is true of various experimental models of the disease (Tsutsumi 1988). The constancy and extension of tissue destruction in both human and experimental amebic lesions easily justifies the name *histolytica* for the parasite. The mechanisms of tissue damage in amebiasis are currently attributed in part to the activity of various molecules present in the parasite (Stanley and Reed 2001): (1) the amebopore (the only non-enzymatic, pore-forming protein), (2) phospholipases, (3) collagenase, (4) adhesins (some have enzymatic activity) and (5) cysteine proteinases (CP1–CP7, CP112). The evidence supporting the role of each of these five different types of molecule in tissue destruction in amebic lesions is not uniform and, for several of them, it is indirect. Perhaps the amebic molecules more extensively studied in their capacity to cause tissue damage are the CPs. The data currently available may be summarized as follows.

In vitro experiments

Purified amebic CPs have a cytopathic effect on monolayers of HeLa cells (Lushbaugh et al. 1985), BHK cells (Keene et al. 1986) and human fibroblasts (Luaces and Barrett 1988), without cytotoxic effect.

The cytolytic effects of purified 30-kDa amebic CPs on dead rat and hamster liver hepatocytes are inhibitable with E-64 (Montfort et al. 1993).

The decreased expression of CP5 induced in *E. histolytica* by antisense mRNA correlates with decreased phagocytosis but the cytopathic effect and hemolytic activity remain unchanged (Ankri et al. 1998).

A. Olivos-García · A. González-Canto · R. López-Vancell
M.C.G. de León · E. Tello · M. Nequiz-Avedaño
I. Montfort · R. Pérez-Tamayo (✉)
Department of Experimental Medicine,
National University of México Medical School,
Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70641,
04510 México, Distrito Federal, México
E-mail: ruypt@hotmail.com
Fax: +52-55-57610249

Enhanced expression of CP2 by transfection in both *E. histolytica* and *E. dispar* increases the cytopathic effect produced by both parasite species (Hellberg et al. 2001).

In vivo experiments

E. histolytica axenic trophozoites grown in the presence of E-64 (Stanley et al. 1995) or laminin (Li et al. 1995) show decreased ability to produce liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice.

Lysates of virulent *E. histolytica* decrease transepithelial electric resistance in gerbil cecum; and this effect is inhibited by E-64 (Navarro-García et al. 1995).

Decreased expression of CP5 induced in *E. histolytica* by antisense mRNA correlates with decreased ability to induce experimental amebic liver abscess in hamsters (Ankri et al. 1999).

Decreased expression of CP5 induced in *E. histolytica* by antisense mRNA correlates with decreased inflammation, decreased production of IL-2 and IL-8 and decreased ability of amebas to convert proIL-1 to IL-1, in human intestine transplanted to SCID mice (Zhang et al. 2000).

Although direct damage of tissue protein structures by amebic CPs is suggested by the evidence summarized above, other indirect mechanisms are not excluded. It is known that CPs decrease the expression of CD4 in T lymphocytes (Molinari et al. 2000). CPs are also capable of degrading macrophage receptors, which would explain why macrophages recovered from gerbil livers with amebic abscess are not activated, fail to activate in the presence of lipopolysaccharide (LPS) and reveal decreased amebicidal capacity, whereas spleen and peritoneal macrophages derived from the same animal respond readily to LPS (Denis and Chadee 1988). In many in vitro experiments with inhibition of amebic CP activity, there is simultaneous interference with amebic growth and viability (De Meester et al. 1990), except when E-64 is used (Stanley et al. 1995). CPs are present in many species of protozoons (North et al. 1990) and, when their activity is blocked by inhibitors, their life cycle and nutrition metabolism are severely damaged (Engel et al. 1998), suggesting that normal CPs probably play essential roles in the parasite's physiology and are therefore required for their survival.

In the present work, we report an improved purification method of CP2 from axenically grown trophozoites of *E. histolytica* and a series of in vivo experiments aimed at answering the question: is amebic CP2 directly responsible for at least some tissue damage in acute experimental amebic liver disease in hamsters? So far, we believe the answer is no.

Materials and methods

Parasites

Entamoeba histolytica trophozoites strain HM1-IMSS were recovered from experimentally induced acute amebic liver abscesses in

hamsters (7 days). The initial axenic culture was started with a density of 7×10^5 trophozoites in 50 ml of TY1-S-33 medium (Diamond et al. 1978) in plastic bottles. After 72 h of incubation at 36.5 °C, the trophozoites were harvested, washed twice in 15 mM phosphate buffer with 0.15 M NaCl (PBS, pH 7.2) and their viability determined by trypan blue exclusion (>95%).

Preparation of amebic extracts

Chilled amebic trophozoites (3×10^9) were suspended in 100 ml of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, supplemented with 0.5 M NaCl and 5 mM HgCl₂, and extracted with 250 ml of cold ethyl ether, first for 8 h with mild agitation and then for 24 h at 4 °C. The mixture was centrifuged for 10 min at 3,000 rpm, the clarified aqueous phase removed and the organic phase reextracted with 100 ml of the same Tris-HCl buffer. Both extracts were combined, the ether removed by evaporation for 12 h at room temperature, the preparation centrifuged for 30 min at 18,000 rpm and the supernatant stored at 5 °C. The organic phase was again extracted with 100 ml of the same buffer, but this time the ionic strength of NaCl was increased to 2.5 M.

Purification of cysteine proteases

Purification was achieved with two different and successive steps:

1. Molecular filtration of a 5.0-ml sample of amebic extract on a 150.0×2.2 cm column packed with Ultrogel ACA-54 in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, with 0.5 M NaCl and 1 mM HgCl₂. The sample was eluted with the same buffer and the eluate was monitored at 280 nm. Proteolytic activity was determined by the azocasein technique (Pérez-Montfort et al. 1987) and the positive fractions were pooled and concentrated to 3.0 ml (with a YM-3 membrane with a molecular mass cut-off at 3,000 Da) and then dialyzed with a 8,000-Da cut-off membrane against 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, with 1 mM HgCl₂.
2. Electroelution of 2.7 ml of the dialyzed sample mixed with 2.3 ml of non-denaturing sample buffer. A 491 Prep Cell (BIORAD) was used, with a 37-mm gel tube, 7.2% separating gel and 4% concentrating gel, at 12 W and a flow of 0.75 ml/min; and 6.0-ml fractions were collected for 28 h. One out of every ten fractions was visualized in 12% gels by non-denaturing PAGE and stained with silver. After visualizing proteolytic activity on zymograms (Laemmli 1970), one out of every third fraction of the two zones with high activity was examined under the same conditions.

Both the 0.5 M NaCl extract and the 2.5 M NaCl extract were equally processed, except that the 0.5 M NaCl extract was first cleared with 2 ml of 2.5 M ZnCl₂ in H₂O for 1 h at 37 °C, centrifuged for 15 min at 20,000 rpm the supernatant concentrated to 12 ml with a YM-3 membrane, prior to molecular filtration in Ultrogel ACA-54.

Zymograms on gelatin gels

Duplicates of the PAGE gels mentioned above were laid on top of other gels containing 10% acrylamide and 2% gelatin, incubated for 12 h, fixed and stained overnight at room temperature with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 in 20% methanol and 10% acetic acid and destained using the same mixture without the dye.

Sequencing of the purified cysteine proteinase

When the cysteine proteinase appeared sufficiently pure (see Results), a sample of fraction II of the 0.5 M NaCl extract was sent for sequencing of 13 amino acid residues from the

N-terminus to The HHMI Biopolymer/W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, at Yale University, New Haven, Conn.

Analysis of isoelectric point by electrofocusing

Electrofocusing of the purified and sequenced EhCP2 preparation was performed first on a preparative gel with a 3.0–10.0 pH range and after that on a resolutive gel with a 4.0–6.5 pH range.

Preparation of polyclonal anti-CP antibodies

The protocol was similar to one described by Montfort et al. (1994). Rabbits were injected intramuscularly and subcutaneously with 200 μ g of purified boiled CP2 in 1 ml of PBS emulsified in 1 ml of complete Freund's adjuvant. After 1 month, 100 μ g of the purified boiled protein were equally injected and, 7 days later, 100 μ g of the boiled protease were injected intraperitoneally. Other rabbits were equally immunized with the protease inhibited by 10 μ M E-64 but not boiled. All animals were bled 1 week later and the whole serum was tested for the presence of antibodies by double immunodiffusion in agar against amebic ether extract and the purified CP2. IgG was purified from the positive sera by standard saturated ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography on sepharose-protein A. Non-antibody rabbit IgG was obtained by the same procedure.

Specificity of the anti-CP antibody

Because of the possibility that the anti-CP2 antibody could also be directed against the ubiquitin molecule(s) present in the purified EhCP2 preparation (see Results), or against other possible EhCPs present in minute amounts, Western blot analysis was performed with the purified EhCP2, using as control a recombinant preparation of EhCP5 kindly provided by Dr. M. Bruchhaus.

Affinity chromatography of amebic ether extract on sepharose-IgG anti-CP2 antibody

IgG anti-CP2 antibody was coupled to cyanogen bromide-activated sepharose, packed in a 5.0 \times 2.0 cm column and washed with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, with 0.15 M NaCl and 1 mM HgCl₂. After applying 3.0 ml of 0.5 M NaCl amebic ether extract to the column and washing with 100 ml of the same buffer, the protein was eluted with 2 ml of glycine-HCl buffer (0.01 M, pH 2.0) and the eluate was immediately neutralized with a few drops of 1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) and concentrated to 2.0 ml with a YM-3 membrane. Protein concentration was determined according to Bradford (1976), proteolytic activity was assessed with the azocasein procedure mentioned above and the PAGE pattern was examined on 12% gels under non-denaturing conditions, with their corresponding zymograms on gelatin gels. Parallel controls were run on a column similarly prepared with non-antibody rabbit IgG.

Effect of the IgG anti-CP2 antibody on the proteolytic activity of purified CP and of axenic trophozoites of *E. histolytica* strain HM1-IMSS

The proteolytic activity of 10 μ g of affinity-purified CP on azocasein in the presence of different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg) of IgG anti-CP2 antibody and 5 mM EDTA was determined in three different experiments. In addition, other samples with the same concentrations of purified CP and IgG anti-CP2 antibody were kept at 4 °C for 24 h. The immunoprecipitates were

centrifuged for 30 min at 10,000 rpm, washed with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 0.15 M NaCl and analyzed by SDS-PAGE (12% gel). Parallel controls were run with non-antibody rabbit IgG.

The proteolytic activity of axenic trophozoites of *E. histolytica* on azocasein and their viability in the trypan blue exclusion test were determined after incubation of 2.5 \times 10⁵ trophozoites for 1.5 h with 1 mg of IgG anti-CP2 antibody. Parallel controls were run with non-antibody rabbit IgG.

Immunohistochemical staining of amebic CP2 in experimental acute amebic liver abscess in hamsters

Experimental acute amebic liver abscess were produced in 100-g hamsters, following a technique described by Pérez-Tamayo et al. (1992). Briefly, 2.5 \times 10⁵ axenic trophozoites of *E. histolytica* were injected into the portal vein of anesthetized hamsters. After 24 h and 5 days, the animals were sacrificed by an ether overdose and the liver was removed and fixed for 48 h in buffered 10% formaldehyde, pH 7.0. After blocking and paraffin embedding, 4–6 μ m thick serial sections were cut from tissue blocks with identified lesions and stained with the IgG anti-CP2 antibody by the indirect or "sandwich" technique, using a goat antirabbit-IgG antibody labeled with isothiocyanate of fluorescein or peroxidase as the secondary antibody and diaminobenzidine as the substrate. In some tissue sections, the antirabbit-IgG antibody was labeled with Au and developed with silver solution, to enhance the sensitivity of the reaction.

Purified CP2 release from inert microvehicles in hamster liver

Looking for a reliable method to deliver purified amebic CP2 to the liver in multiple microfocal concentrations, we first prepared gelatin microspheres according to Yoshioka et al. (1981), but preliminary experiments in vivo revealed that such microspheres were not inert carriers (see Results). We then used Superdex 75 (Pharmacia) resin microspheres (24–44 μ m in diameter) which, when injected intraportally in hamsters, caused little or no damage or inflammatory reaction in the liver. Since such microspheres are close in size to amebic trophozoites, incorporate proteins of molecular weight similar to CPs with minimal or no chemical interactions with them and, with mild shaking, release those proteins into the surrounding medium, 3.5 \times 10⁵ Superdex 75 microspheres were exposed five times to 60 μ l of purified CP2 (5 mg/ml) in PBS. Then, 5 \times 10⁴ microspheres were injected intraportally into hamsters, which were then sacrificed 3, 24 and 96 h after the injection and their livers were removed and processed for histologic and immunohistochemical examination.

The incorporation of CP2 protein within the Superdex 75 microspheres was monitored by staining a sample with Coomassie blue. The presence of CP2 protein in both the microspheres and in their surrounding tissue structures in the liver was examined by the immunohistochemical technique described above.

Results

The proteolytic activity:protein ratio was higher in the ethyl ether amebic extract prepared with 2.5 M NaCl. Proteinase activity eluted from the Ultrogel ACA 54 column in a zone of approximately 30 kDa molecular mass. Figure 1 shows the PAGE pattern and the corresponding zymogram of the various fractions electroeluted from the 491 Prep Cell. Because fractions with proteolytic activity revealed two different migration patterns, they were pooled separately and labeled I

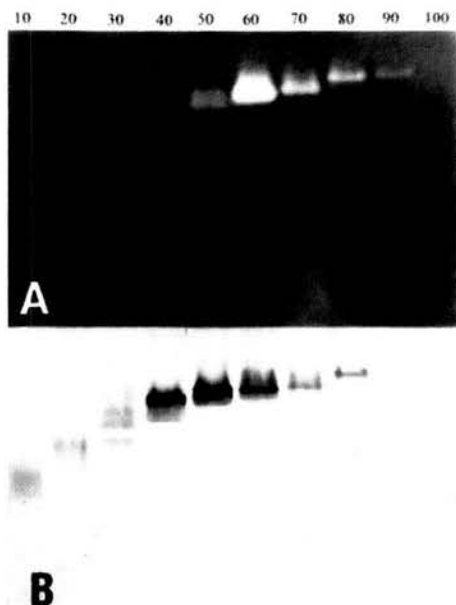


Fig. 1A, B PAGE under non-denaturing conditions for different protein fractions electroeluted in Prep Cell. One fraction out of every ten were tested. **A** Zymogram in gelatin-containing gel. **B** Corresponding migration in 12% gel

(fractions 56–68) and II (fractions 80–92; Fig. 2). Proteolytic activity of the two fractions was completely inhibited by E-64. In order to avoid protein aggregation during SDS-PAGE, the fractions were previously boiled in the presence of EDTA and iodoacetamide (Fig. 3).

Table 1 summarizes the quantitative results of the purification procedure. Purification of CP from the ethyl ether amebic extract with 0.5 M NaCl was very similar after clearing with $ZnCl_2$. Repeated runs of the procedure resulted in an enrichment in specific activity, varying between 4.7-fold and 20.0-fold.

Isoelectric point determination revealed an acidic band in the preparative gel, which in the resolutive gel showed an isoelectric point of 5.14 (Fig. 4), which is close to the theoretical value of 5.13 reported for EhCP2 and is also close to EhCP1 and EhCP6, but is quite

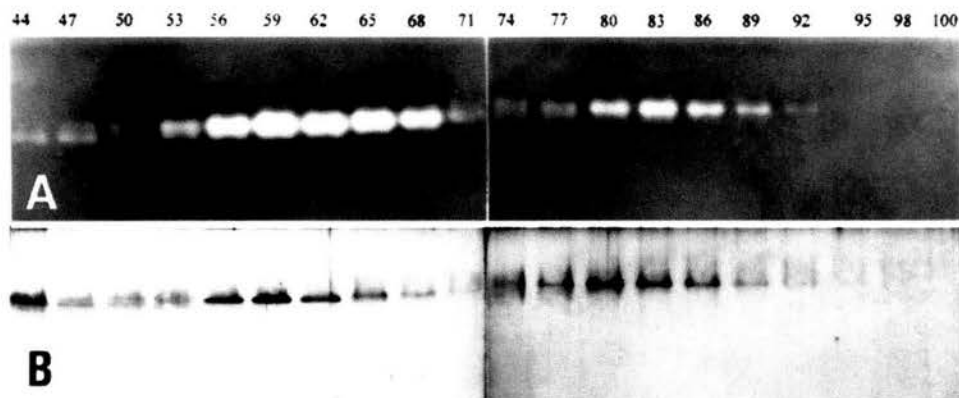
different to the theoretical value of 8.41 reported for EhCP5. Western blot analysis revealed a single band near 30 kDa in the presence of dithiothreitol (DTT), EDTA and iodoacetamide, and a band at 26 kDa under the same conditions but without DTT (Fig. 5). The control with recombinant EhCP5 was negative

The N-terminal sequence of fraction II of the purified protein revealed that it is a mixture of two molecules: one is the precursor of *Entamoeba histolytica* CP2 (amino acid residues 94–106: ALA-PRO-GLU-SER-VAL-ASP-X-ARG-LYS-GLU-GLY-X-VAL) and the other is *E. histolytica* ubiquitin(s) (amino acid residues 1–13: MET-GLN (or ASP)-ILE (or LYS)-PHE (or ALA)-VAL (or TYR)-LYS-THR (or GLY)-LEU-THR-GLY (or MET or ILE)-X-THR-ILE). Amino acids in parentheses indicate possible substitutions.

The effect of two IgG anti-CP2 antibodies, raised in different rabbits, on the proteolytic activity of EhCP purified by affinity chromatography is shown in Fig. 6. Control IgG inhibits proteolytic activity in a concentration-dependent fashion, whereas one of the IgG antibodies shows less pronounced inhibition and the other results in a concentration-dependent increase in proteolytic activity above the control enzyme level. Similar results were obtained when the proteolytic activity of axenic trophozoites of *E. histolytica* was measured in the presence of control rabbit IgG and the two IgG anti-CP2 antibodies: with the control IgG, the proteolytic activity was 58.16% of that in the control trophozoites, whereas it was 99.48% with one anti-EhCP2 antibody and was 128.06% with the other. The viability of the trophozoites was not affected by the anti-CP2 antibodies.

Preliminary experiments with empty gelatin microspheres injected into the portal vein of normal hamsters revealed intense inflammation in their immediate vicinity after 24 h; and for that reason they were not used. In contrast, empty Superdex 75 microspheres at 3 h and 24 h after intraportal injection stimulated no reaction (Fig. 7A) and some of them were surrounded by few mononuclear cells after 92 h. When Superdex 75 microspheres were filled with protein and stained with Coomassie blue, it was appreciated that the incorporation

Fig. 2A, B PAGE under non-denaturing conditions for protein fractions with high proteolytic activity. One out of every three fractions were tested. **A** Zymogram in gelatin-containing gel. Notice two positive zones (56–68, 80–92), separated by an intermediate zone (71–77) with less activity. In addition, the second positive zone (80–92) shows less migration



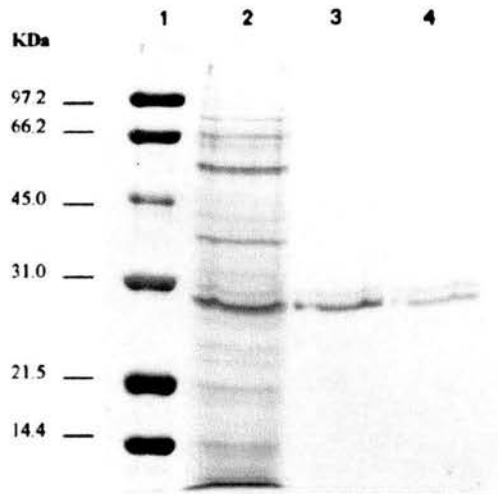


Fig. 3 PAGE in 12% gel with SDS of ethyl ether amebic extract eluted with 0.5 M NaCl. *Lane 1* Molecular weights, *lane 2* ethyl ether amebic extract, *lane 3* fraction I of Prep Cell electroeluate, *lane 4* fraction II of Prep Cell electroeluate. Fractions I and II had proteolytic activity inhibitable with E-64. *KDa* kiloDaltons

was heterogeneous (Fig. 7B). Superdex 75 microspheres filled with purified amebic CP2 and injected into the portal vein of normal hamsters were often surrounded by a moderate infiltration of polymorphonuclear leukocytes 3 h after injection (Fig. 7C) and a few of them had a narrow and irregular halo of necrotic liver cells and inflammatory cells 24 h after injection (Fig. 7D). Very few microspheres were surrounded by residual lesions 92 h after the injection. Amebic CP2 was visualized within the Superdex 75 microspheres soon after intraportal injection in sections of the liver immunohistochemically stained with IgG anti-CP2 antibody, but the positive reaction disappeared after 1 h. No positive staining was detected in the structures close to the microspheres. Amebic trophozoites are positively stained with IgG anti-CP2 antibody in tissue sections of liver abscesses throughout the evolution of the lesions (Fig. 8A, B) and again no staining of the necrotic structures surrounding the amebas was detected at any time.

Discussion

The two-step purification technique of amebic CP2 reported herein has a satisfying yield (Table 1), much

Table 1 Summary of purification procedures

	Ether extraction (2.5 M NaCl)	Electroelution		Ether extraction (0.5 M NaCl)	Electroelution	
		I	II		I	II
Protein (mg/ml)	29.10	0.347	0.827	664.50	1.625	3.834
Total activity (optical density at 336 nm)	1,608	91	216	6209	268	716
Specific activity (units of activity/mg protein)	55.25	262.24	261.18	9.34	164.92	186.75
Recovery (%)	100	5.65	13.43	100	4.31	11.53

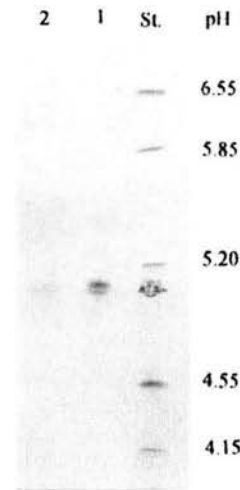


Fig. 4 Isoelectric focusing of purified EhCP2 in a resolutive gel with a pH range of 4.0–6.5. *St* Standards, *lanes 1 and 2* different dilutions of sample EhCP2 show a pH 5.14 value

higher than that previously reported from our laboratory for a 30-kDa CP and a different protocol (Montfort et al. 1994). Detergents are avoided and instead the amebic extract is obtained with ethyl ether, which is easier to eliminate. The first purification step (molecular filtration) eliminates many non-proteolytic enzymes and the second purification step (electroelution in 491 Prep Cell) completes the purification down to near-homogeneity for PAGE. Sequencing of fraction II of the purified protein revealed that the final product is a mixture of amebic CP2 and ubiquitin(s), which may be one of the forms in which such molecules normally exist in the parasite. We believe that most of the protein in our purified preparation is EhCP2 and that ubiquitin(s) is present in trace amounts, since in SDS-PAGE ubiquitin migrates as an 8.5-kDa band (Wostmann et al. 1992), which we never observed despite conducting many runs and even staining with silver.

Throughout the procedure, proteolytic activity inhibitable with E-64 was preserved, associated with protein bands of approximately 30 kDa molecular mass. Nevertheless, when such bands were examined with SDS-PAGE, they revealed several bands with different molecular masses and proteolytic activities, which reverted to a single protein band of apparent 30 kDa when the sample was boiled in the presence of EDTA, DTT and iodoacetamide and reexamined by SDS-PAGE. Since all genes so far cloned that encode proteases of

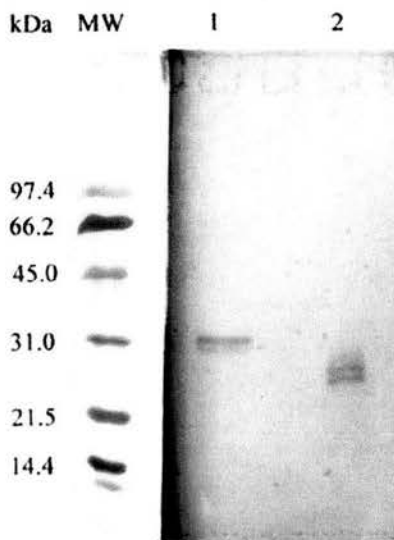


Fig. 5 Western blot of purified EhCP2 using anti-CP2 antibody. *Lane 1* Electrophoresed product boiled in the presence of dithiothreitol, EDTA and iodoacetamide. *Lane 2* Electrophoresed product boiled in the presence of EDTA and iodoacetamide, without dithiothreitol

Entamoeba histolytica have been found to encode proteins of approximately 30 kDa (Bruchhaus et al. 1996), the existence of CPs derived from the same parasite with molecular masses varying over 16–96 kDa (Avila and Calderón 1993; Keene et al. 1986; Luaces and Barrett 1988; Lushbaugh et al. 1985; McLaughlin and Faubert 1976; Montfort et al. 1994; Navarro-García et al. 1995) should have a posttranslational explanation. It was suggested (López-Revilla et al. 1993) that, during SDS-PAGE, the lower molecular mass CPs are derived from a higher molecular mass precursor of CPs by autoproteolysis. Hellberg et al. (2000) cut the SDS-PAGE bands of 35 kDa and 48 kDa with proteolytic activity and sequenced them; and they turned out to be EhCP2 and EhCP1 respectively, both of which are encoded by genes with 30 kDa products. This suggests oligomerization/aggregation phenomena, with which we agree.

The stabilizing or enhancing effects of the IgG anti-CP antibodies on the proteolytic activity of both live axenic trophozoites of *E. histolytica* and affinity-purified CP was an interesting result. Although we have no explanation for it, this phenomenon is observed with other anti-enzyme antibodies (Jafri et al. 1993; Khan and Iqbal 2000) and is usually attributed to changes in the enzyme molecule caused by the antibody, which is not combining with the active site of the enzyme. Several amebic molecules have been used as immunogens, in the hope of stimulating the production of antibodies protecting against experimental amebiasis (Cheng et al. 1999; Marinets et al. 1997; Zhang et al. 1994). Partially purified 56–66 kDa proteases secreted by *E. histolytica* were used for that purpose by Gupta et al. (1999), but those authors failed to observe any correlation between antibody titers and protection. In human patients with

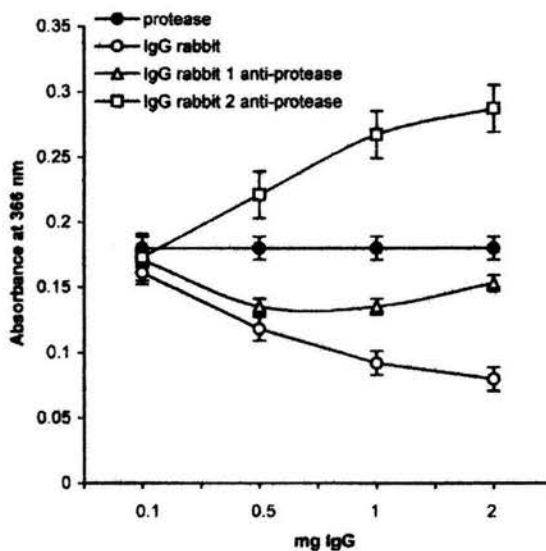


Fig. 6 Effect of incubation of affinity-purified EhCP with normal rabbit IgG and with two different anti-EhCP2 rabbit antibodies, on proteolytic activity measured with azocasein. Note that with normal rabbit IgG proteolytic activity is reduced, whereas with the anti EhCP2-antibodies this reduction is reverted or the activity is enhanced and that there is a dose-response effect

invasive amebiasis, 83% have anti-protease antibodies, whereas patients with *E. dispar* show none (Reed et al. 1989). Ig class may be important, since human salivary IgA anti-protease antibodies have been shown to efficiently inhibit protease activity in vitro (Guerrero-Manríquez et al. 1998). The effect of stabilizing or enhancing antibodies produced by the host against amebic CPs on the development of experimental amebic lesions has yet to be studied.

The injection into the portal vein of normal hamsters of purified amebic EhCP2 enclosed within slowly-releasing microvehicles (with the same size range as *E. histolytica* trophozoites) and the histologic and immunohistochemical study of the liver at 3, 24 and 92 h after injection revealed that EhCP2 is capable by itself of directly stimulating a mild acute inflammatory reaction, rarely accompanied by discrete areas of liver cell necrosis in the close neighborhood of the microvehicles, which are mostly healed after 92 h. This “synthetic amoeba” is admittedly a very crude model of the real parasite, but it represents the first attempt to examine the role of a single molecular component of *E. histolytica* in the causation of tissue damage in an in vivo model of amebiasis, in the absence of all other possibly participating amebic elements. Two of the major problems with this experimental situation are our ignorance of the actual amount of the enzyme that is released, both from inert microspheres and from amebic trophozoites in the in vivo lesions, and the obvious fact that the former, being a single dose of the enzyme, must have a very short biochemical effect. However, we do know two things: first, that the amount of protein carried and delivered by each microsphere is variable (in which they resemble

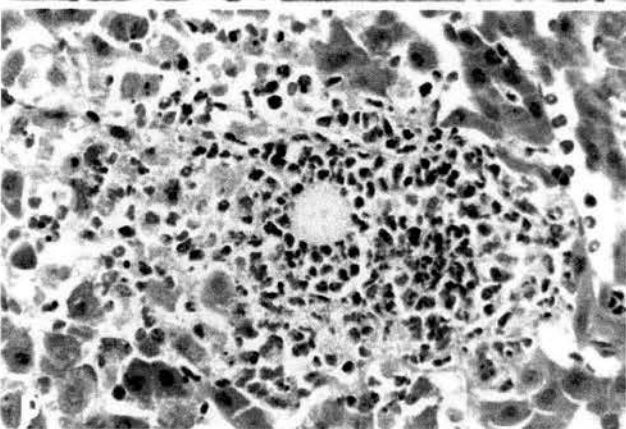
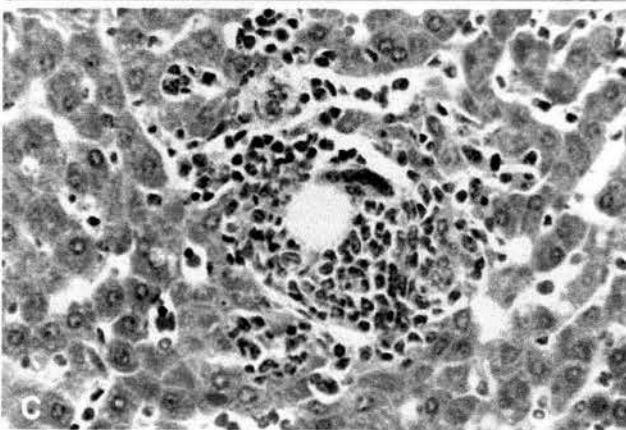
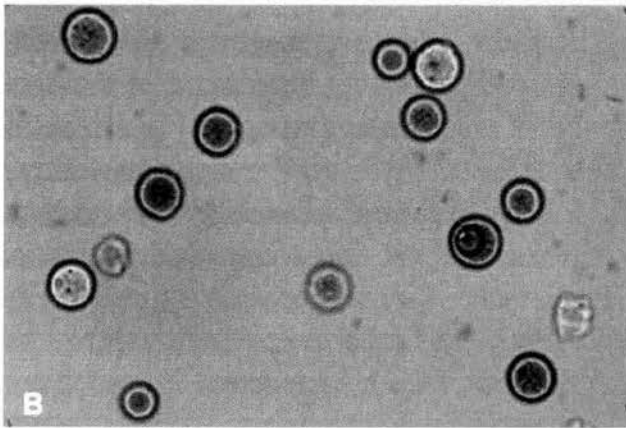
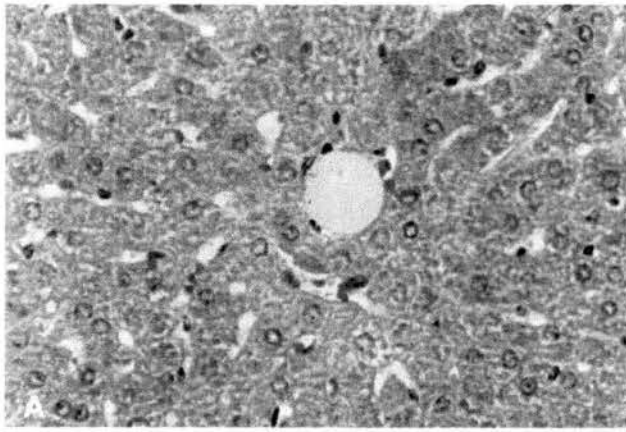


Fig. 7 Effect of injection of inert plastic microspheres with enclosed purified EhCP2. **A** control microsphere 24 h after injection. There is no cellular reaction around it. **B** microspheres after 6x exposure to purified EhCP2 stained with Coomassie Blue. The distribution of the enclosed protein is heterogeneous. **C** microsphere with enclosed EhCP2 3 h after injection into the portal vein. There is an infiltrate of inflammatory cells around the microsphere but no liver cell damage. **D** microsphere with enclosed EhCP2 24 h after injection into the portal vein. In addition to inflammation there is also necrosis of some liver cells

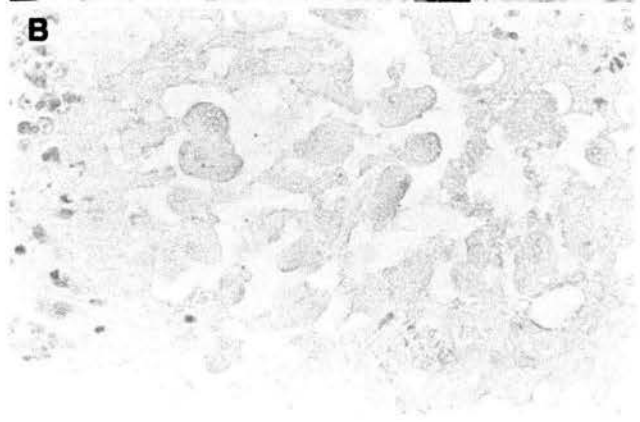
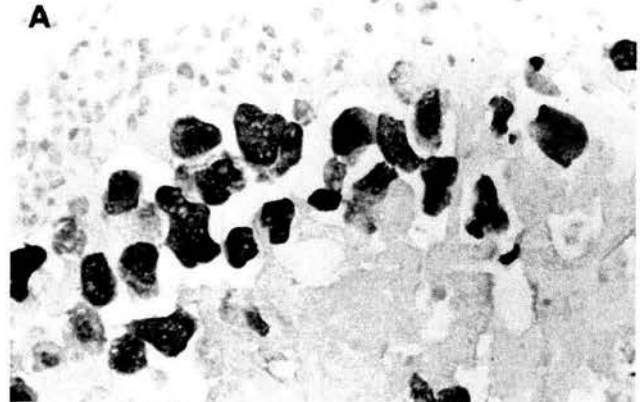


Fig. 8A, B Acute experimental liver abscess (5 days), stained immunohistochemically with one anti-EhCP2 rabbit antibody and developed with the Au-silver technique. **A** Trophozoites are intensely stained but no positive reaction is detected in the surrounding inflammatory and necrotic structures. **B** Control slide in which the anti-EHCP2 antibody was replaced with normal rabbit IgG

amebic trophozoites) and, second, that whatever this amount may be, most of it is enzyme protein. With these limitations, however, our results suggest that amebic EhCP2 is directly capable of stimulating a mild acute inflammatory reaction and probably causes minimal tissue necrosis. It was demonstrated that amebic cysteine proteinases activate C3 (Reed and Gigli 1990) with the consequent release of chemotactic peptides C3a and C5a and the rapid confluence of polymorphonuclear leukocytes, which in acute experimental lesions disintegrate, release lysosomal enzymes and injure the neighboring cells and intercellular elements (Tsutsumi and

Martínez-Palomo 1988; Tsutsumi et al. 1984). Perhaps the morphologic sequence of events observed surrounding the inert microspheres containing purified EhCP2 soon after they reach the liver may be explained according to such a mechanism, although there is some evidence that amebas can also cause tissue damage in acute experimental lesions developing in leukopenic animals (Velázquez et al. 1998).

Attempts to correlate the level of proteolytic activity in *E. histolytica* with virulence are at best controversial (Ankri et al. 1998; Gadasi and Kobilier 1983; Hellberg et al. 2001; Montfort et al. 1992). In vitro experiments show that amebas secrete proteases into the culture medium (Leippe et al. 1995; Reed and Gigli 1990; Serrano et al. 1996) and it is suggested that such proteases are responsible, at least in part, for the extensive tissue destruction characteristic of the disease. Using a polyclonal antibody raised against whole amebic extracts, Ventura-Juárez et al. (1997) stained immunohistochemically early experimental amebic lesions and showed that not only were trophozoites positive but also that there was diffusion of positive material in the vicinity of amebas. Using a polyclonal antibody anti-EhCP1, Stanley et al. (1995) were able to stain amebic trophozoites in acute experimental liver abscesses produced in SCID mice; and they claim to have detected positive staining in the tissues near the parasites. In our own immunohistochemical studies of experimental acute (1 day, 5 days) amebic liver abscess, we routinely detect (using immunofluorescence, peroxidase or Au-silver techniques) EhCP2 within amebas, but we have never observed positive staining of amebic EhCP2 in the extra-amebic space, not even in their immediate vicinity. Such negative results could be explained by either no EhCP2 secretion or by a very low concentration of the enzyme in the extra-amebic spaces, below the sensitivity of the techniques used to detect it. Hellberg et al. (2001) injected into gerbil livers trophozoites of both *E. histolytica* and *E. dispar* that by transfection were made to overexpress EhCP2 by 2.8-fold and, 7 days later, those authors observed no differences between the results of control experiments with wild *E. histolytica* and *E. dispar*, i.e., the former parasitic strain did not increase in virulence and the latter remained nonpathogenic. These results could be explained if overexpression of EhCP2 is not accompanied by secretion of the enzyme. We are satisfied that our antibody anti-EhCP2 does not cross-react with EhCP5, but we have not tested it with the remaining EhCPs. Thus it remains possible that EhCPs other than EhCP2 are secreted and contribute to the extensive tissue destruction that rapidly develops surrounding the parasites. The work of Hellberg et al. (2001) and our results are compatible with the suggestion that EhCP2 is not secreted and is not directly involved in tissue damage and that other amebic molecules, either other EhCPs or other different amebic components (and possibly some host factors), are responsible for tissue lesions during in vivo amebiasis.

Acknowledgements We gratefully acknowledge the excellent technical help of Pedro Balderas Flores and the professional animal care of Ricardo Vargas Orozco and Daniel Sánchez Almaraz. Dr. Iris Bruchhaus kindly gave us a sample of recombinant EhCP5 prepared in her laboratory. This work includes part of the doctoral dissertation of A.O.-G. and was supported by CONACyT grants 30831-M and 25119-M and by DGAPA grant IN-225998. All experiments were conducted according to the directions of the General Health Law of Mexico.

References

- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* 28:777-785
- Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D (1999) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* 67:421-422
- Avila E, Calderón J (1993) *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Exp Parasitol* 76:232-241
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E (1996) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* 22:255-263
- Cheng X, Tachibana H, Kaneda Y (1999) Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 85:78-80
- De Meester F, Shaw E, Scholze H, Stolarsky T, Mirelman D (1990) Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 58:1396-1401
- Denis M, Chadee K (1988) In vitro and In vivo studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun* 56:3126-3131
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72:431-432
- Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH (1998) Cysteine protease inhibitors alter golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 111:597-606
- Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13:318-331
- Gadasi H, Kobilier D (1983) *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol* 55:105-110
- Guerrero-Manriquez G, Sánchez-Ibarra F, Avila E (1998) Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 106:1088-1094
- Gupta S, Naik S, Naik SR (1999) Vaccine potential of 56-66 kDa protease secreted by *Entamoeba histolytica*. *Ind J Med Res* 109:141-146
- Hellberg A, Leippe M, Bruchhaus I (2000) Two major higher molecular mass proteinases of *Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. *Mol Biochem Parasitol* 105:305-309
- Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I (2001) Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol* 3:13-20
- Jafri F, Husain S, Saleemuddin M (1993) Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem* 18:401-408

- Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 163:536–549
- Khan SA, Iqbal J (2000) Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnol Appl Biochem* 32:89–94
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Leippe M, Sievertsen J, Tannich E, Hortsman D (1995) Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 111:569–574
- Li E, Yang WG, Zhang T, Stanley SL (1995) Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun* 63:4150–4153
- López-Revilla R, Canto-Ortiz L, Jiménez-Delgado B, Chávez-Dueñas L (1993) Proteinases resistant to sodium dodecyl sulfate-induced autolysis of *Entamoeba histolytica* HK-9 trophozoites. *Parasitol Res* 79:168–171
- Luaces AL, Barrett AJ (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Biochem* 250:903–909
- Lushbaugh WB, Hofbauer F, Pittman FE (1985) *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol* 59:328–336
- Marinets A, Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL, Duchene M (1997) Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on a surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 186:1557–1565
- McLaughlin J, Faubert G (1976) Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can J Microbiol* 23:420–425
- Molinari JL, Mejia H, White AC, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P (2000) *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacystodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol* 94:133–142
- Montfort I, Olivos A, Pérez-Tamayo R (1992) Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23:177–179
- Montfort I, Pérez-Tamayo R, González CA, García de León MC, Olivos A, Tello E (1993) Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *J Parasitol* 79:98–105
- Montfort I, Pérez-Tamayo R, Pérez-Montfort R, González A, Olivos A (1994) Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 80:607–613
- Navarro-García F, Chávez-Dueñas L, Tsutsumi V, Posadas del Rio F, López-Revilla R (1995) *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Exp Parasitol* 80:361–372
- North MJ, Mottramand JC, Coombs GH (1990) Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 6:270–275
- Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I (1987) Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 26:87–98
- Pérez-Tamayo R (1986) Pathology of amebiasis. In: Martínez-Palomo A (ed) *Amebiasis*. Elsevier, Amsterdam, pp 45–49
- Pérez-Tamayo R, Becker I, Montfort I, Pérez-Montfort R (1990) Pathobiology of amebiasis. In: Kretschmer R (ed.) *Amebiasis: infection and disease by Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 123–157
- Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A (1992) Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int J Parasitol* 22:125–129
- Reed SL, Gigli I (1990) Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J Clin Invest* 86:1815–1822
- Reed SL, Keene W, McKerrow J (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 27:2772–2777
- Serrano JJ, De la Garza M, Reyes M, León G, Tovar R, Muñoz ML (1996) *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitol Res* 82:200–205
- Stanley SL, Reed SL (2001) Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions VI. *Entamoeba histolytica*: parasite–host interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:1049–1054
- Stanley SL, Shang T, Rubin D, Li E (1995) Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun* 63:1587–1590
- Tsutsumi V (1988) Pathology of experimental amebiasis. In: Ravdin JJ (ed) *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. Wiley, New York, pp 147–165
- Tsutsumi V, Martínez-Palomo A (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 130:112–119
- Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A (1984) Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 117:81–90
- Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J (1998) Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 20:255–262
- Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Ramirez-Rosales A, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V (1997) Early in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with hepatic parenchymal and inflammatory cells of hamster. *Arch Med Res* 28:211–213
- Wostmann C, Tannich E, Bakker-Grunwald T (1992) Ubiquitin of *Entamoeba histolytica* deviates in six amino acid residues from the consensus of all other known ubiquitins. *FEBS Lett* 308:54–58
- Yoshioka T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H (1981) Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano- and microspherical carriers of gelatin. *Int J Pharm* 81:131–141
- Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL (1994) Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 62:1166–1170
- Zhang Z, Yan L, Wang L, Seydel KB, Li E, Ankri S, Mirelman D, Stanley SL (2000) *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 37:542–548

Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters

A. OLIVOS-GARCÍA, E. TELLO, M. NEQUIZ-AVENDAÑO, A. GONZÁLEZ-CANTO, R. LÓPEZ-VANCELL, M. C. GARCÍA DE LEÓN, I. MONTFORT and R. PÉREZ-TAMAYO*

Department of Experimental Medicine, National Autonomous University of Mexico Medical School, México City, México

(Received 13 August 2003; revised 9 December 2003; accepted 16 December 2003)

SUMMARY

Axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HM1-IMSS grown *in vitro* in the presence of E-64, a potent irreversible inhibitor of cysteine proteinases, preserved their viability, their rate of replication, their resistance to complement, their haemolytic capacity and their ability to destroy target cells, despite complete inhibition of total cysteine proteinase activity. On the other hand, their erythrophagocytic capacity and their ability to decrease TER of MDCK cells was partially decreased. The same trophozoites injected into the portal vein of hamsters receiving a maintaining dose of E-64 failed to cause tissue damage and were rapidly eliminated. Our results suggest that amoebic cysteine proteinase activity is not required for amoebic functions in *in vitro* conditions, but that it becomes necessary for survival of trophozoites in *in vivo* conditions, whatever other role (if any) it may play in the parasite's virulence.

Key words: cysteine proteinases, *E. histolytica* survival *in vivo*, pathogenicity, hamster, E-64.

INTRODUCTION

Currently *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases (EhCP1-19; EhCP112) are considered some of the major molecules responsible for the extensive cell and tissue damage produced by the parasite in both human and experimental infections (Que & Reed, 2000; Stanley & Reed, 2001; Bruchhaus, Loftus & Hall, 2003). The evidence supporting this view may be summarized as follows. (1) In *in vitro* experiments, (a) purified amoebic EhCPs cause a cytopathic effect on monolayers of HeLa cells (Lushbaugh, Hofbauer & Pittman, 1985), of BHK cells (Keene *et al.* 1986), and of human fibroblasts (Luaces & Barrett, 1988); (b) purified amoebic 30 kDa EhCP shows a cytolytic effect on dead rat and hamster hepatocytes, inhibitable with E-64 (Montfort, Pérez-Tamayo & González, 1993); (c) decreased expression of EhCP5 induced in *E. histolytica* by antisense mRNA correlates with decreased phagocytosis although the cytopathic effect and haemolytic activity remain unchanged (Ankri, Stolarsky & Mirelman, 1998) and (d) enhanced expression of EhCP2 by transfection in both *E. histolytica* and *E. dispar* increase the E-64 inhibitable cytopathic effect produced by both parasite species on CHO cells, but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils (Hellberg

et al. 2001). (2) In *in vivo* experiments: (a) *E. histolytica* axenic trophozoites grown in the presence of E-64 (Stanley, Zhang & Rubin, 1995), or laminin (Li *et al.* 1995) show decreased ability to produce liver abscesses in SCID mice; (b) lysates of virulent *E. histolytica* decrease transepithelial electrical resistance (TER) in the gerbil's caecum, and this effect is inhibited by E-64 (Navarro-García *et al.* 1995) and (c) decreased expression of EhCP5 induced in *E. histolytica* by antisense mRNA correlates with decreased ability to induce experimental amoebic liver abscesses in hamsters (Ankri *et al.* 1999), and with decreased inflammation, decreased production of IL-2 and IL-8, and decreased ability of amoebae to convert proIL-1 to IL-1 in human intestine transplanted to SCID mice (Zhang *et al.* 2000). Although this is impressive evidence suggesting an important role of EhCPs in cell and tissue damage in amoebiasis, it fails to discriminate between a direct proteolytic effect on extracellular matrix proteins, several of which are known substrates of EhCPs, and a *permissive* role of such enzymes whose primary function would be to preserve the viability of the parasite, allowing EhCPs and perhaps other molecular mechanisms to damage cells and tissues. In our laboratory, we have purified EhCP2 from axenically grown trophozoites of *E. histolytica* strain HM1-IMSS and raised an anti-EhCP2 polyclonal antibody, which allowed immunohistochemical staining of amoebae in sections of 5-day-old experimental amoebic liver abscesses, but no enzyme protein was detected in the surrounding necrotic tissue (Olivos-García *et al.* 2003).

* Corresponding author: Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, Apartado Postal 06540, México, D.F., CP 10200, México. Tel: +52 55 5761 02 56. Fax: +52 55 57 6102 49. E-mail: ruypt@hotmail.com

Using an EhCP1-antibody, Stanley *et al.* (1995) did find extra-amoebic enzyme in early liver lesions. In addition, purified EhCP2 enclosed within slow-releasing microspheres injected into the portal vein of normal hamsters stimulated a minor inflammatory reaction with little or no tissue damage. In many *in vitro* experiments inhibition of EhCP activity occurs simultaneously with decreased amoebic growth and viability (De Meester *et al.* 1990), except when E-64 is used (Stanley *et al.* 1995). Cysteine proteinases (CPs) are present in many species of protozoa (North, Mottram & Coombs, 1990; Sajid & McKerrow, 2002) and when their activity is blocked by inhibitors, their respective life-cycles and metabolism are severely altered (Engel *et al.* 1998), suggesting that CP activities play essential roles in the protozoan's physiology and are required for their survival.

In the present work we report a series of *in vitro* and *in vivo* experiments on the effect of EhCP inhibition with E-64 on the parasite viability, replication, complement resistance, cytotoxicity, TER decrease, erythrophagocytosis, haemolytic capacity, virulence and survival. Our results suggest that whatever the role of EhCP activities in the production of tissue damage in amoebic disease, their primary contribution to the host-parasite relation is to allow the survival of the parasite, which then is able to use EhCPs and perhaps other more subtle mechanisms to damage cells and extracellular structures.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

E. histolytica trophozoites strain HM1-IMSS were axenically cultured in plastic bottles at 36.5 °C in 50 ml of TYI-S-33 medium (Diamond *et al.* 1978). In some experiments they were harvested after 72 h, washed twice in 15 mM phosphate buffer with 0.15 M NaCl, pH 7.2 (PBS) and their viability determined by Trypan blue exclusion. Rate of replication was measured as the number of amoebae obtained after 72 h of culture.

Culture of *E. histolytica* trophozoites in the presence of E-64

E-64 (*L-trans*-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane) was added initially at a final concentration of 500 µM in culture medium of axenic *in vitro* cultures of trophozoites from the time of seeding.

Erythrophagocytosis

Phagocytic activity of control and E-64-axenically grown trophozoites was compared in 72 h cultures by incubating 5×10^5 washed amoebae with 5×10^7 hamster fresh red blood cells for 15 min in PBS in the presence of 250 µM E-64. Phagocytosis was stopped

by addition first of 0.4 ml of distilled water and immediately after of 1.0 ml of 0.4% formaldehyde in PBS, and trophozoites were centrifuged at low speed and suspended in PBS. The average number of trophozoites with more than 5 cytoplasmic erythrocytes (high phagocytosis) present in triplicate counts of 100 parasites in 6 separate experiments was determined in both groups. In addition, erythrophagocytic activity was measured by the technique described by Keller *et al.* (1988), comparing the absorbances in 4 separate experiments.

Haemolytic activity of axenic trophozoites

Hamster blood cells were obtained in the presence of heparin and rinsed with PBS before used. The assay was performed as described by Ankri *et al.* (1998) in the presence of 250 µM E-64 comparing haemoglobin absorbances, it was made in duplicate in 3 separate experiments, with control and axenically grown trophozoites with E-64.

Measurement of TER

Damage to the MDCK-cell monolayers was assessed by the measurement of changes in TER 30 min after the addition of E-64-axenically grown trophozoites in the presence of 500 µM E-64 at a 5:1 cell:amoeba ratio on an Ussing chamber as previously described by López-Vancell, Montfort & Pérez-Tamayo (2000). It was measured in 8, 8, and 9 samples in 3 independent experiments and expressed as ohms.cm².

Complement resistance

Amoebae grown for 72 h with E-64 were exposed to 100% fresh hamster serum (1×10^6 /ml) in the presence of 250 µM E-64 and incubated at 37 °C for 2 h, and their viability was determined by Trypan blue exclusion. Survival of amoebae in the presence of 100% fresh hamster serum depended on the number of parasites used in the test. Less than 1×10^6 /ml were almost completely lysed, whereas 2×10^6 /ml survived more than in the PBS control. At 1×10^6 /ml the average survival of amoebae was 64%. Results were compared with untreated amoebae and in duplicates in 7 independent experiments.

Cytotoxicity

Cytotoxic activity of axenic trophozoites grown in the presence of E-64 was tested *in vitro* with 2 different types of target cells: Jurkat cell line, and polymorphonuclear leukocytes (PMNs) freshly obtained from the peritoneal cavity of hamsters previously (6 h) injected with 1.0 ml of 1% glycogen in PBS. The assay was performed by incubating 1×10^5 amoebae with 5×10^5 Jurkat cells and 1×10^5 amoebae with 2.5×10^6 PMNs in TYI-S-33 medium with 250 µM E-64 for 3 h at 37 °C, and then counting

Table 1. E-64 effect in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters (5 days)

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
HM-1	HM-1 grown with E-64 72 h	HM-1	HM-1 grown with E-64 72 h
Hamster without E-64	Hamster without E-64	Hamster with E-64 each 12 h	Hamster with E-64 each 12 h
Abscesses 8/8	Abscesses 8/8	Abscesses 8/8	Abscesses 0/8

viability of target cells by Trypan blue exclusion. This assay was preferred to the cytopathic effect described by Keene *et al.* (1986) because cysteine proteases, although probably not directly involved in cell killing (Luaces & Barrett, 1988), could be required to activate or facilitate other molecular mechanisms of cytotoxicity present in the living parasite. Results were compared with controls run with untreated amoebic trophozoites. The assay was made in duplicate in 3 independent experiments.

E-64-inhibitable proteolytic activity assay

Freeze-thawed lysates (5×10^5) of control and E-64-axenically grown trophozoites were washed 4 times with PBS and incubated with 0.4 ml of azocasein (2.5 mg/ml), 5 mM EDTA, 5 mM DTT for 3 h at 37 °C. The reaction was stopped, with 0.6 ml of cold 10% trichloroacetic acid, centrifuged for 10 min at 4500 g and the absorbance was determined at 366 nm (Pérez-Montfort *et al.* 1987).

Zymograms

Control and E-64-grown amoebae were harvested, washed with PBS in sterile conditions and incubated for different periods (2.5 to 48 h) with TYI-S-33 medium. Whole amoebic (2.5×10^8) homogenates prepared in PBS were electrophoresed in 12% gels by SDS-PAGE (Laemmli, 1970), and the gels were laid on top of other gels containing 10% acrylamide, 0.2% gelatin, 5 mM EDTA, 5 mM DTT and incubated at 37 °C for 12 h, fixed and stained overnight at room temperature with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 in 20% methanol and 10% acetic acid and destained with the same solution without the dye.

Detection of intracellular CP activity in intact amoebic trophozoites

Arg-Arg-4-methoxy-2-naphthylamide peptide (AMNP), a substrate of CPs, yields a fluorescent insoluble adduct with 5-nitro-2-salicylaldehyde (NSA) after being enzymatically split. When added to a culture of amoebic trophozoites, AMNP and NSA freely enter their cytoplasm and the presence of CP activity is detected as multiple fluorescent granules (Scholze & Tannich, 1994). The observations

were made at different periods (3 to 24 h) after adding 5 mM AMNP and 2.5 mM NSA in 0.1 ml of PBS to an axenic culture of 1×10^8 untreated or E-64-treated amoebic trophozoites washed with PBS.

Acute amoebic liver abscesses in hamsters

Experimental acute amoebic liver abscesses were induced in 4 separate groups, each of eight 100 g hamsters of either sex, following a technique previously described (Pérez-Tamayo *et al.* 1992). Briefly, 5×10^5 axenic *E. histolytica* trophozoites were injected in 0.2 ml of PBS into the portal vein of anaesthetized hamsters. After 5 days the animals were sacrificed by an ether overdose, the liver was removed and fixed for 48 h in buffered 10% formaldehyde, pH 7.0. After blocking and paraffin embedding, 4-6 µm thick sections were cut from random blocks, which included all liver lobules, and were stained with H&E and with Periodic-acid Schiff (PAS). Two groups of hamsters thus treated were also injected intraperitoneally twice daily with 2 mg of E-64, since it has been established (Katunuma & Kominami, 1995) that the half-life of active E-64 injected into rodents is 12 h.

Four experimental groups of acute amoebic liver abscesses were prepared and studied (see Table 1). In addition, 4 more animals were added to group 4, two of which were sacrificed 8 h and the other two 20 h after the injection of amoebae.

Isolation of hepatocytes

Fresh hepatocytes were obtained as described by Montfort *et al.* (1993) from 1 normal hamster and 1 hamster from group 4 (treated for 5 days), and intracellular CP activity was detected in living hepatocytes with AMNP substrate, as described above.

RESULTS

Axenically grown amoebic trophozoites, either in the absence or in the presence of 500 µM E-64 showed minor variations in viability, growth rate, complement resistance, haemolytic activity, erythrocyte-phagocytic capacity with the absorbance method, and cytotoxic activity after 72 h (Fig. 1). No decrease of erythrocyte phagocytosis was observed when E-64

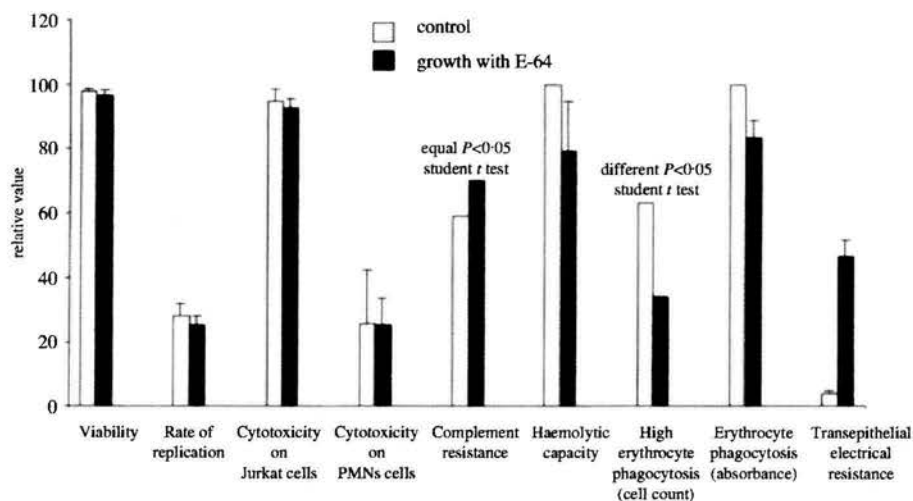


Fig. 1. Effect of growing axenic *Entamoeba histolytica* trophozoites in the presence of E-64 for 72 h on various *in vitro* functions. For techniques of the assays and units in which the results are expressed see Materials and Methods section. Mean results and standard deviation are shown for all tests, except complement resistance and high erythrocyte phagocytosis, in which experiments and controls were compared with the Student's *t*-test.

was added to the assay with normal amoebae, but amoebae grown in E-64 were less phagocytic (29% by counting). In addition, the capacity of amoebae to decrease TER in MDCK monolayers was also diminished to almost half of the initial value, while untreated amoebae caused the entire loss of TER. On the other hand, total CP activity of whole amoebic homogenates was variously inhibited at the end of 72 h of culture in the presence of E-64, in a time-response curve. Such a quantitative result correlated both with the detection of CP activity in the zymograms, which was observed to be much decreased (Fig. 2A, B1 and B2), as well as with the microscopic detection of intracytoplasmic CP activity in individual intact trophozoites. When visualized with the AMNP technique, with increasing concentrations of E-64, there was a corresponding general decrease in the number of cytoplasmic fluorescent granules, and an increase in the number of completely negative amoebae (data not shown). When aliquots of amoebic cultures, in which total CP activity had been inhibited by incubation with E-64 for 72 h, were washed and incubated in the absence of E-64, 50% CP azocaseinase activity was recovered in approximately 24–48 h (Fig. 2A).

Gross and microscopic development of experimental acute amoebic liver abscesses were indistinguishable in groups 1, 2 and 3: all animals in each group showed multiple lesions detectable grossly as early as 24 h after injection of trophozoites, and after 5 days there were fully developed abscesses with many well-preserved trophozoites. On the other hand, no lesions were observed in any animal of group 4 and their hepatocytes did not show intracellular CP activity (Fig. 3A, B). Also, no amoebae were detected microscopically on tissue sections

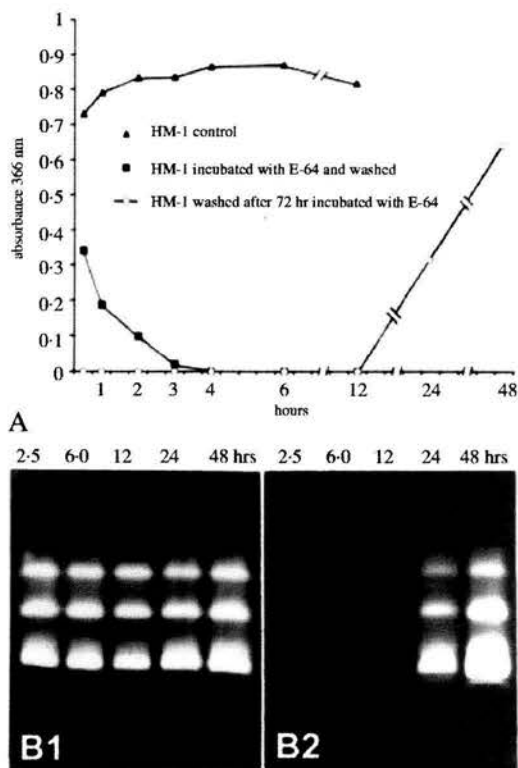


Fig. 2. (A) CP activity determined by azocasein in amoebic homogenates after various periods of incubation in the presence of E-64 and after washing and culturing in E-64-free medium. CP activity disappears after 4 h incubation with E-64, and begins to reappear 12 h after removal of the inhibitor. Notice the discontinuity in the time-scale. (B1) Zymogram of amoebic homogenates of control. (B2) Recovery of amoebic proteolytic activity; faint proteolytic activity is already visible with this technique 6 h after washing the inhibitor.

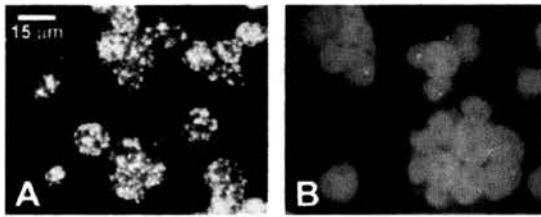


Fig. 3. CP activity in liver cells revealed by AMNP technique. (A) Normal hepatocytes (control). (B) hepatocytes from an animal from group 4 (5 days continuous treatment with E-64). Complete absence of CP activity in liver cells derived from the treated animal.

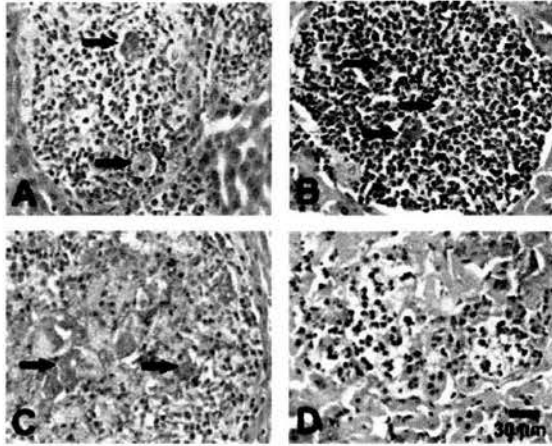


Fig. 4. Liver histology in animals of group 4 (continuous treatment with E-64 + amoebae grown in the presence of E-64). (A) 8 h control. (B) Acute inflammation with PMNs and amoebic debris, (8 h). (C) 20 h control. (D) Minimal liver cell damage and fragmentation of PMNs; no amoebae are present (20 h). Arrows point to amoebae. PAS stain.

prepared from random blocks. In the animals specially prepared to detect lesions and amoebae at earlier periods in group 4, there were small groups of PMNs with few poorly preserved amoebae still present 8 h after the injection. Furthermore, no amoebae were seen at 20 h; only debris of PMNs ('nuclear dust') and occasional giant cells were present in the involuting lesions (Fig. 4B, D).

DISCUSSION

It is generally believed that E-64 fails to enter live cells, but this seems to be true only during short *in vitro* exposures (1 h), because after longer periods the inhibitor does penetrate within cells, probably by pinocytosis (Wilcox & Mason, 1992). In experiments *in vivo* it has been shown that E-64 is incorporated into the liver cytosol (Katunuma & Kominami, 1995). Our results may be summarized by stating that complete inhibition of total CP activity of axenic trophozoites of *E. histolytica* grown *in vitro* in the

presence of E-64, and for as long as 72 h, as determined by 3 different techniques, has minor effects on viability, growth curve (Stanley *et al.* 1995), cytotoxicity, haemolytic capacity (Ankri *et al.* 1998) and complement resistance. On the other hand, erythrocyte phagocytosis measured by cell counts and absorbance, and TER of MDCK monolayers, were somewhat decreased. Decrease of erythrocyte phagocytosis by amoebae treated with an antisense mRNA that blocks CP synthesis has been observed by Ankri *et al.* (1998) who used only the absorbance technique. The exposure of axenic trophozoites to E-64 1 h prior to examining their effect on TER of MDCK monolayers was found to have no influence on the rapid decrease on TER caused by amoebae (López-Vancell *et al.* 2000). However, in those experiments total CP activity was not determined, and we have observed that after 1 h of exposure to E-64 approximately 25% total CP activity remains.

Preservation of viability and other properties of amoebae *in vitro* despite the complete and prolonged absence of CP activity, suggest that the culture medium must contain all the elements required for their normal metabolism. On the other hand, CP activity appears to be an absolute requirement for survival of amoebae *in vivo* conditions, at least in the experimental situation examined in this work, namely the production of acute liver abscesses. We have no data on the actual cause of amoebic disappearance. However, it is suspected to occur very rapidly, within a few hours after injection, on the basis of the results in group 2 (untreated hamsters + amoebae grown in E-64), which developed lesions similar to group 1 (control), suggesting rapid recovery of CP activity. Injection of the parasites into the portal vein is equivalent to removing the inhibitor present in the culture medium, thus allowing the progressive recovery of CP activity by amoebae in the next 3–24 h (detected by AMNP), as was observed *in vitro* when amoebae grown in E-64 were placed in medium free of the CP inhibitor.

Group 3 (hamsters continuously treated with E-64 + untreated amoebae) also developed lesions very similar to group 1 (control), and this result may require a more elaborate explanation, which would include at least 2 elements. (1) The inability of E-64 to affect the cytotoxic capacity of amoebae when the inhibitor is added to the culture at time 0 or throughout the 72 h of culture, demonstrated in *in vitro* experiments of co-incubation with target cells. (2) The early development of ischaemia in even very small experimental amoebic liver lesions (Pérez-Tamayo *et al.* 1992) which would prevent the contact of amoebae with the CP inhibitor present in the blood. It is suggested that the combined effect of these two elements would explain the survival of parasites and the development of tissue damage in our group 3. The possible role of amoebic CPs on the direct causation of liver lesions becomes less clear,

since E-64 is present in the liver, as shown by the almost complete absence of CP activity in intact liver cells surrounding the edge of the growing abscess.

Amoebic trophozoites grown in the presence of E-64 and injected into the portal vein of hamsters treated continuously with the same CP inhibitor (group 4) produce small and rapidly involuting liver lesions that disappear from the tissue in about 20 h. The absence of amoebae and of tissue lesions in group 4 would suggest that CP activity is directly related to the initiation of inflammation and of tissue damage, since in its absence no lesions develop. But this simple view ignores the fact that full inhibition of CP activity has no influence on amoebic cytotoxicity *in vitro* and on initial inflammation *in vivo*, and also fails to explain the rapid disappearance of amoebae when there is no cell and tissue destruction. An alternative explanation would be that CP activity is primarily necessary for amoebic survival in *in vivo* conditions, and that amoebic survival is necessary for the development of tissue damage caused by various molecular mechanisms, which may very well include CP activity.

Our results also suggest that the development of amoebic lesions may be necessary for amoebic survival, since through the early ischaemia mentioned above, liver abscesses rapidly create the anaerobic conditions that trophozoites require to grow *in vitro*, and simultaneously isolate the parasite from possibly harmful serum components, such as complement. This possibility is currently being pursued in our laboratory.

We gratefully acknowledge the excellent technical help of Pedro Balderas Flores and Marco E Gudiño Zayas as well as the professional animal care of Ricardo Vargas Orozco and Daniel Sánchez Almaraz. This work includes part of the doctoral dissertation of A. O.-G., and was supported by CONACyT grants 30831-M and 25119-M, and by DGAPA grant No. IN-244202.

REFERENCES

- ANKRI, S., STOLARSKY, T., BRACHA, R., PADILLA-VACA, F. & MIRELMAN, D. (1999). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infection and Immunity* **67**, 421–422.
- ANKRI, S., STOLARSKY, T. & MIRELMAN, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular Microbiology* **28**, 777–785.
- BRUCHHAUS, I., LOFTUS, B. J., HALL, N. & TANNICH, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell* **2**, 501–509.
- DE MEESTER, F., SHAW, E., SCHOLZE, H., STOLARSKY, T. & MIRELMAN, D. (1990). Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* **58**, 1396–1401.
- DIAMOND, L. S., HARLOW, D. R. & CUNNICK, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 431–432.
- ENGEL, J. C., DOYLE, P. S., PALMER, J., HSIEH, I., BAINTON, D. F. & MCKERROW, J. H. (1998). Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cell Science* **111**, 597–606.
- HELLBERG, A., NICKEL, R., LOITTER, H., TANNICH, E. & BRUCHHAUS, I. (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction *in vitro* but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cellular Microbiology* **3**, 13–20.
- KATUNUMA, N. & KOMINAMI, E. (1995). Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods in Enzymology* **251**, 382–397.
- KEENE, W. E., PETTIT, M. G., ALLEN, S. & MCKERROW, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* **163**, 536–549.
- KELLER, F., WALTER, C., LÖHDEN, U., HANKE, W., BAKKER-GRUNWALD, T. & TRISSL, D. (1988). Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *Journal Protozoology* **35**, 359–365.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680–685.
- LI, E., YANG, W. G., ZHANG, T. & STANLEY, S. L. (1995). Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amoebic pathogenesis. *Infection and Immunity* **63**, 4150–4153.
- LÓPEZ-VANCELL, R., MONTFORT, I. & PÉREZ-TAMAYO, R. (2000). Galactose-specific adhesion and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* **86**, 226–231.
- LUCAS, A. L. & BARRETT, A. J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical Journal* **250**, 903–909.
- LUSHBAUGH, W. B., HOFBAUER, A. F. & PITTMAN, F. E. (1985). *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. *Experimental Parasitology* **59**, 328–336.
- MONTFORT, I., PÉREZ-TAMAYO, R., GONZÁLEZ, C. A., GARCÍA DE LEÓN, M. C., OLIVOS, A. & TELLO, E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *Journal of Parasitology* **79**, 98–105.
- NAVARRO-GARCÍA, F., CHÁVEZ-DUEÑAS, L., TSUTSUMI, V., POSADAS DEL RÍO, F. & LÓPEZ-REVILLA, R. (1995). *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Experimental Parasitology* **80**, 361–372.
- NORTH, M. J., MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* **6**, 270–275.
- OLIVOS-GARCÍA, A., GONZÁLEZ-CANTO, A., LÓPEZ-VANCELL, R., GARCÍA DE LEÓN, M. C., TELLO, E., NEQUIZ-AVENDAÑO, M., MONTFORT, I. & PÉREZ-TAMAYO, R. (2003). Amoebic

- cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amoebic liver abscess in hamsters. *Parasitology Research* **90**, 212–220.
- PÉREZ-MONTFORT, R., OSTOA-SALOMA, P., VELÁZQUEZ-MEDINA, L., MONTFORT, I. & BECKER, I. (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**, 87–98.
- PÉREZ-TAMAYO, R., MONTFORT, I., TELLO, E. & OLIVOS, A. (1992). Ischemia in experimental acute amoebic liver abscess in hamsters. *International Journal for Parasitology* **22**, 125–129.
- QUE, X. & REED, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amoebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 196–206.
- SAJID, M. & MCKERROW, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**, 1–21.
- SCHOLZE, H. & TANNICH, E. (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods in Enzymology* **244**, 512–523.
- STANLEY, S. L. & REED, S. L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions VI. *Entamoeba histolytica*: parasite–host interactions. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* **280**, G1049–G1054.
- STANLEY, S. L., ZHANG, T., RUBIN, D. & LI, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amoebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity* **63**, 1587–1590.
- WILCOX, D. & MASON, W. (1992). Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells. *Biochemistry Journal* **285**, 495–502.
- ZHANG, Z., YAN, L., WANG, L., SEYDEL, K. B., LI, E., ANKRI, S., MIRELMAN, D. & STANLEY, S. L. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Molecular Microbiology* **37**, 542–548.

Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters

A. Olivos-García, M. Nequiz-Avendaño, E. Tello, R.D. Martínez, A. González-Canto, R. López-Vancell, M.C. García de León, I. Montfort, and R. Pérez-Tamayo*

Department of Experimental Medicine, National University of México Medical School, Ciudad Universitaria México D.F. 04510, Mexico

Received 14 August 2003

Available online 12 May 2004

Abstract

We have examined the role of inflammatory cells, ischemia and serum complement on the development of acute experimental amoebic liver abscess in hamsters (AEALAH). In hamsters made leukopenic by whole body radiation (800 rad) and daily intraperitoneal glycogen injections, the absence of inflammatory cells and liver tissue damage surrounding the parasites resulted in their rapid (24 h) disappearance from the liver, which showed no lesions. Focal liver ischemia, always present in control AEALAH with inflammation and tissue destruction, was reproduced in radiated hamsters by injection of amoebas mixed with Superdex microspheres, but again in the absence of inflammation, amoebas caused no liver damage and disappeared in 24 h. In hamsters made hypocomplementemic by injection of purified cobra venom factor (CVF), amoebas caused AEALA indistinguishable from controls, but in leukopenic + hypocomplementemic hamsters, amoebas were unable to produce lesions and disappeared from the liver in 48 h. We conclude that inflammation and tissue damage are required for the survival of amoebas in AEALAH and for the progression of the experimental disease.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Radiation; Inflammation; Ischemia; Complement

Introduction

During the early stages of acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters (AEALAH), the two major components are cellular infiltration by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and mononuclear cells (MO) (Tsutsumi and Martínez-Palomo, 1988; Tsutsumi et al., 1984) and ischemia of the lesions (Pérez-Tamayo et al., 1992). The rapid disintegration of the inflammatory cells, with release of their lysosomal enzymes and other substances, is believed to be at least partially responsible for liver tissue damage, although there is evidence for amoebas causing tissue lesions in the absence of PMNs in other experimental models (Rivero-Nava et al., 2002; Velázquez et al., 1998). Ischemia has been shown to be present in very early amoebic liver lesions, and it may not only contribute to tissue damage, but would also result in decreased exposure of the trophozoites to serum components (specially complement), and in addition could also create a relatively anaer-

obic microenvironment, favourable for the growth of the parasite. Thus, it may be hypothesised that in early AEALAH, tissue damage is required for the survival of amoebas, which in turn is a necessary condition for the further development of the lesions. In this work, we report a series of experiments designed to test such hypothesis. Our results support in part the hypothesis, since interfering by various means with the development of inflammation in early AEALAH invariably results in the rapid disappearance of amoebas and the consequent absence of further tissue damage.

Materials and methods

Parasites

Axenic cultures of *E. histolytica* strain HMI-IMSS grown in TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1978) were harvested every 72 h and washed twice with 15 mM phosphate buffer pH 7.2 with 0.15 M NaCl (PBS). Virulence was kept constant by passing the axenic trophozoites through hamster

* Corresponding author. Fax: +52-57-61-02-49.

E-mail address: ruypt@hotmail.com (R. Pérez-Tamayo).

Table 1

Summary of experiments performed to examine the role of inflammation, complement and ischemia on the presence of *E. histolytica* and liver damage in AEALAH

Time of sacrifice after injection of amoebas	Control	Radiated	Radiated with microspheres	Hypocomplementemic	Hypocomplementemic and radiated	Radiated ^a
<i>Thirty minutes</i>						
Amoebas	+	+	nd	nd	nd	nd
Lesions	–	–	nd	nd	nd	nd
<i>Three hours</i>						
Amoebas	+	+	nd	nd	nd	nd
Lesions	–	–	nd	nd	nd	nd
<i>Six hours</i>						
Amoebas	+	+	+	+	+	nd
Lesions	–	–	–	–	–	nd
<i>One day</i>						
Amoebas	+	–	–	+	+	+
Lesions	+	–	–	+	–	+
<i>Two days</i>						
Amoebas	+	–	–	+	–	nd
Lesions	+	–	–	+	–	nd
<i>Three days</i>						
Amoebas	+	–	–	+	–	nd
Lesions	+	–	–	+	–	nd
<i>Six days</i>						
Amoebas	+	nd	nd	nd	nd	–
Lesions	+	nd	nd	nd	nd	–

nd = not done.

^a Amoebas injected 2 h after radiation.

livers every other week and recovering the parasites from 7-day-old liver abscesses into axenic cultures. Acceptable virulence was when 1×10^6 axenic trophozoites injected into the portal vein of hamsters yielded multiple liver abscesses in all animals used (usually 5/5).

AEALAH

AEALAH were produced in 150-g animals of both sexes by a technique previously described (Pérez-Tamayo et al., 1992). Briefly, 1×10^6 axenic amoebic trophozoites suspended in 0.2 ml of PBS were injected into the portal vein through a laparotomy performed under light barbitol anesthesia (6.3 mg/100 g body weight). Both control and experimental animals were sacrificed at various intervals after the injection of amoebas, ranging in different experiments from 30 min to 6 days, the liver was removed, weighed, cut into 0.1-cm-thick slices and fixed in 10% formaldehyde in buffered PBS pH 7.0.

Histological studies

Tissue blocks of all liver lobules of all livers were processed for histology by standard techniques, cut at 6 μ m and stained with both haematoxylin and eosin (H&E)

and periodic acid Schiff (PAS). Control and experimental slides were examined independently by two observers.

Liver ischemia detection

To determine ischemic areas in the liver in many experimental animals, 0.2 ml of India ink-PBS were

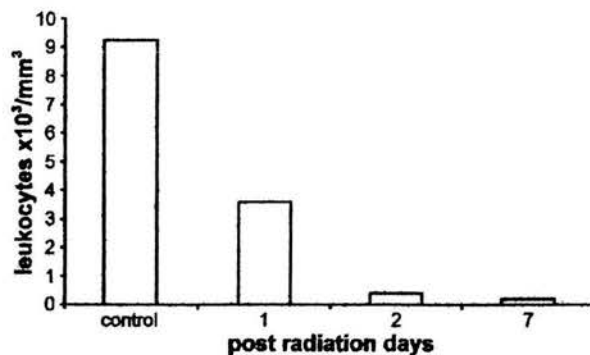


Fig. 1. Onset and development of leukopenia after whole body radiation (800 rad) in hamsters. Peripheral blood PMNs decrease from a normal average of $10\,000/\text{mm}^3$ to 4000 in 24 h and to <300 in 48 h, and remain at this low count up to 7 days.

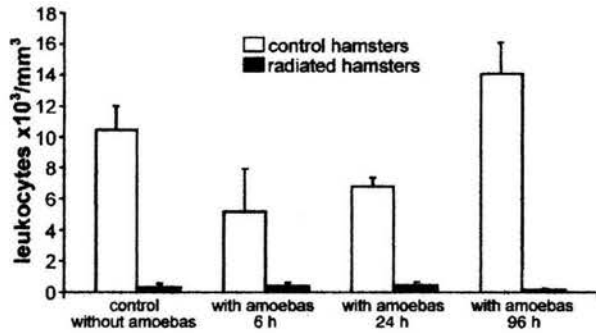


Fig. 2. Peripheral blood PMNs in AEALAH in radiated and controls at different time periods. Controls without AEALAH show profound leukopenia in radiated animals. Six hours after injection of amoebas, nonradiated animals reveal leukopenia of average 5000/mm³ PMNs which is still down to average 6000/mm³ PMNs after 24 h, but that has been replaced by leukocytosis of 15000/mm³ PMNs after 96 h.

injected into the portal vein of hamsters before sacrifice, as previously described (Pérez-Tamayo et al., 1992).

Radiation experiments

After preliminary experiments designed to establish an adequate dose of whole body radiation to achieve almost complete peripheral leukopenia in hamsters (<300 leukocytes/mm³), 800 rad of gamma radiation (cobalt 60) was chosen (see Results) and used throughout the experiments. Radiations were performed at the Radiobiological Unit of the

Institute for Nuclear Studies of the National Autonomous University of Mexico.

Glycogen enhancement of leukopenia in radiated animals

To further reduce the affluence of the few remaining peripheral PMNs and MO cells to the amoebas present in AEALAH in radiated animals, 16 mg of glycogen in 1.0 ml of PBS were injected intraperitoneally 3 h before the injection of amoebas and repeated every 24 h. In this experimental group, four control and four radiated hamsters were sacrificed 30 min, 3, 6, 24 and 48 h after the injection of amoebas.

Focal liver ischemia induced with Superdex 75 microspheres

To examine the effect of focal ischemia induced in radiated animals which show no inflammation surrounding the injected amoebas, and therefore develop no lesion-related ischemia, 1×10^6 axenic trophozoites were mixed with 2×10^6 Superdex 75 microspheres (Pharmacia) and injected intraportally in hamsters 48 h after whole-body radiation with 800 rad and 3 h after the first intraperitoneal injection of 16 mg of glycogen in 1.0 ml of PBS, which was repeated every 24 h. In these experiments, groups of four control, four radiated and four radiated + Superdex 75 microspheres animals were sacrificed at 6, 24, 48 and 72 h after the intraportal injection of amoebas.

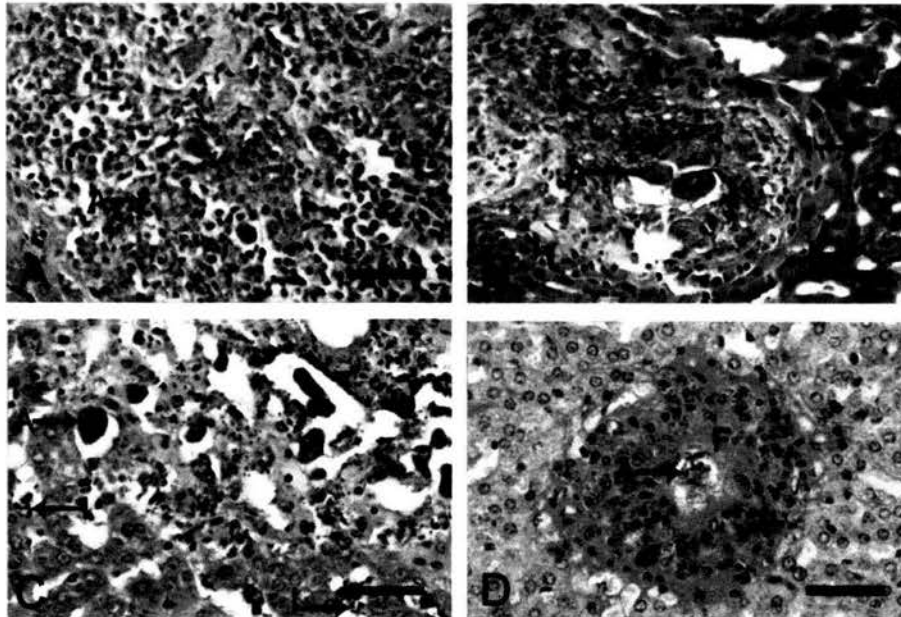


Fig. 3. Histology of AEALAH in control and radiated animals that were injected with amoebas 2 h after radiation. (A) Microscopic aspect of AEALAH in control, 24 h after injection of amoebas, showing many well-preserved amoebas (A), dense inflammatory cellular infiltration (mostly PMNs) and tissue necrosis. (B) Histology of AEALAH in radiated animal, 24 h after injection of amoebas, showing a smaller lesion with few well-preserved amoebas (A), few inflammatory cells and little necrosis. (C) Edge of a large AEALAH developed in control 6 days after injection of amoebas, with many well-preserved parasites (A), nuclear debris and few PMNs, and necrotic hepatocytes. (D) One of the few lesions found in radiated hamsters 6 days after injection of amoebas, with one or two degenerated parasites (A) surrounded by mononuclear cells embedded in fibrin (F), and very little liver damage. PAS stain. Scale bars represent 50 μ m.

Role of complement (C) in AEALAH

To explore the role of C in the development of AEALAH, the cobra venom factor (CVF) of *Naja haje* was used. CVF was purified from crude commercial preparations (Sigma) according to Sharma et al. (2001) and the efficiency of the purified preparations to lower C serum activity was tested by the capacity of serum to destroy amoebas in vitro ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$ at 2 h). The serum was obtained from hamsters 24, 48 and 72 h after being injected with 40 μg CVF according to Van den Berg et al. (1991). In addition, CH50 units were determined in all sera of controls and CVF-injected hamsters, according to Morrison and Kline (1977). In the experiment, 1×10^6 axenic trophozoites were intraportally injected in control and radiated hamsters 48 h after radiation and 3 h after the intraperitoneal injection of 16 mg of glycogen in 1.0 ml of PBS (which was repeated every 24 h); in addition, some control and all radiated hamsters were injected with 40 μg of CVF 24 h before the administration of amoebas. Groups of four animals of each of the three series (controls, controls + CVF and radiated + CVF) were sacrificed 6, 24, 48 and 72 h after the injection of trophozoites.

A summary of all experiments described appears in Table 1.

Results

Leukopenia resulting from whole body radiation of hamsters with 800 rad is illustrated in Fig. 1. It takes 48 h for the peripheral PMNs count to reach from slightly over 10000 to less than 300 cells/ mm^3 , and it remains at this level until the animal dies, usually after 7 days. An interesting result observed in our controls injected with amoebas was the transient peripheral leukopenia 6 h after the injection of the parasites, which was still present after 24 h and was replaced by leukocytosis after 96 h (Fig. 2). Hamsters injected intraportally with 1×10^6 axenic trophozoites 2 h after whole body radiation with 800 rad and sacrificed 24 h after the injection revealed liver lesions differing from controls in size and degree of inflammation, but still characterised by dense infiltration of PMNs and MOs surrounding well-preserved amoebas and minimal hepatocyte damage, restricted to the immediately surrounding liver tissue (Figs. 3A and B). On the other hand, control animals sacrificed 6 days after the injection of amoebas showed enlarged livers with more advanced lesions, with prominent necrobiosis of PMNs and MOs, liver cell necrosis and many well-preserved amoebas, whereas radiated hamsters also sacrificed after 6 days showed normal-size livers with very small or no lesions, and poorly preserved or no amoebas (Figs. 3C and D). The same experiment performed 24 h after radiation showed essentially the same results. On the other hand, when the intraportal injection of 1×10^6 axenic trophozoites was made 48 h after total body radiation, the

results were different to the previous experiments because in radiated animals sacrificed only 6 h after the injection of parasites, the liver revealed lesions and amoebas identical to those present in control animals sacrificed at the same period, in radiated animals sacrificed 24 h after the administration of axenic trophozoites there were very small lesions with few necrobiotic inflammatory cells and few amoebas, whereas in radiated animals sacrificed 96 h after the injection of trophozoites there were neither lesions nor amoebas. Thus, when virulent amebic trophozoites reach the liver soon after radiation, they are still able to stimulate inflammation and initiate an early lesion, which subsides and disappears as leukopenia becomes more advanced. Once leukopenia is established, little or no tissue damage

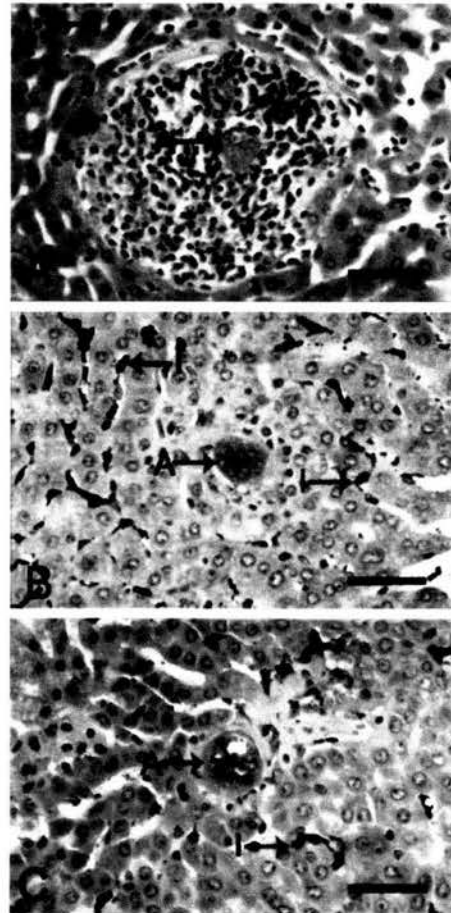


Fig. 4. Histology of AEALAH in control and radiated animals that were injected with amoebas 48 h after radiation. (A) Microscopic aspect of AEALAH in control 6 h after injection of amoebas, with the well-preserved parasites (A) surrounded by inflammatory cells, mostly PMNs, and very little liver damage. (B) Histology of the liver in a radiated hamster 6 h after injection of amoebas, showing a well-preserved parasite (A) without any inflammatory cells around it and no liver cell damage. India ink (I) is present in many close sinusoids, indicating the absence of ischemia. (C) Histology of the liver of a radiated hamster 24 h after injection of amoebas, with very few and poorly preserved parasites (A), no inflammation and no tissue damage. India ink (I) is present in many close sinusoids. PAS stain. Scale bars represent 50 μm .

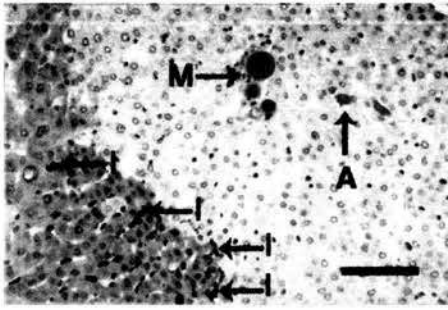


Fig. 5. Microscopic aspect of the liver of a hamster 6 h after intraportal injection of Superdex microspheres mixed with amoebas. The area of ischemia is apparent by the sharply delineated zone of discolored liver cells where India ink (I) fails to enter the sinusoids. Superdex microspheres (M) and amoebas (A) are not surrounded by inflammatory cells and there is no necrosis. PAS stain. Scale bar represent 100 μ m.

is elicited by amoebas, which disappear in less than 24 h. In the experiment with enhancement of radiation-induced leukopenia by intraperitoneal glycogen injection every 24 h, complete absence of PMNs and MO infiltration was achieved near amoebas, which remained visible and well preserved, lying blandly in the liver sinusoids and in contact with undamaged hepatocytes for as long as 6 h; after 24 h, there were only very few remnants of amoebas still without any inflammation or liver cell damage in their vicinity, and after 48 h no amoebas or lesions were observed (Figs. 4A–C). The experiment to examine the influence of ischemia in the survival of amoebas in early AEALAH in the absence of inflammatory cells, performed with Superdex 75 microspheres mixed with axenic trophozoites, showed in radiated animals sacrificed 6 h after injection of trophozoites well-preserved amoebas without surrounding inflammatory cells lying in the midst of ischemic areas, which appear as sharply outlined, irregular groups of lightly stained hepatocytes; India ink failed to enter the sinusoids within the ischemic areas (Fig. 5). After this period, no amoebas were visible, although ischemic areas remained detectable for as long as

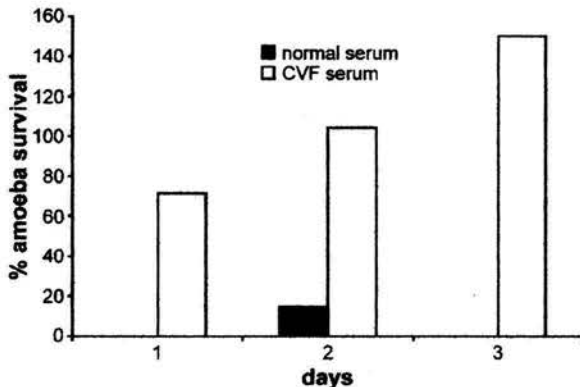


Fig. 6. Effect of injection of C56/BL6 hamsters, on the amoeba-killing capacity of hamster serum in vitro. After 24 h, there is a 70% decrease in the serum capacity to destroy amoebas, and after 48 h, the capacity is completely lost, and remains the same after 72 h of injection.

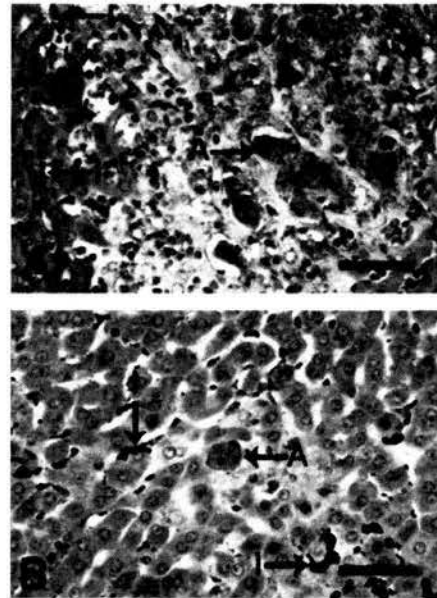


Fig. 7. Combined effect of leukopenia and hypocomplementemia on the development of AEALAH. (A) Histology of AEALAH in a hypocomplementemic animal, 24 h after injection of amoebas, showing many well-preserved parasites (A) and abundant inflammatory cells with incipient tissue destruction. (B) Microscopic aspect of the liver in leukopenic + hypocomplementemic hamster, showing no inflammation, no liver damage, presence of India ink (I) in many close sinusoids and amoebas (A) blandly lying in sinusoids. No amoebas were observed after 48 h. PAS stain. Scale bars represent 50 μ m.

72 h. Prolonged (7 days) and profound hypocomplementemia secondary to administration of purified CVF to hamsters was achieved, as determined by average of 0.25 CH50 units (normal: >100 CH50 units) in the serum of the animals given CVF, and by the complete loss of in vitro amebic-killing capacity of undiluted serum obtained from hamsters 1, 2 and 3 days after injection of a single dose of CVF (Fig. 6). Radiated hamsters injected with CVF 24 h after radiation and amebic trophozoites 48 h after radiation and receiving 16 mg of glycogen intraperitoneally every 24 h revealed well-preserved amoebas without inflammatory reaction or liver cell damage 6 and 24 h after injection; amoebas were no longer present after 48 and 72 h (Figs. 7A and B). On the other hand, control animals which were also injected with CVF 24 h before receiving the same number of intraportal trophozoites showed amoebas surrounded by little inflammation after 6 h, but after 24, 48 and 72 h, the liver lesions were similar in number and extension as in otherwise untreated controls.

Discussion

Two major points may be derived from the results of the experiments reported herein. (1) In the absence of inflammatory cells, virulent *E. histolytica* trophozoites cause little or no liver tissue damage in hamsters. This was first suggested by

Tsutsumi et al. (1984) and Tsutsumi and Martínez-Palomo (1988) from morphologic studies of early AEALAH. More recent studies, however, have shown that in other experimental situations, amoebas do cause tissue injury in the absence of PMNs (Rivero-Nava et al., 2002; Velázquez et al., 1998), suggesting that in different animal species and in tissues other than the liver, the factors contributing to amoebic cell and tissue damage may also be different. (2) The absence of an inflammatory response to *E. histolytica* present in the hamster liver invariably results in the early disappearance of the parasite from the tissue. Amoebas remain well preserved in the liver only for 6 h and are either absent or very diminished in number and clearly undergoing destruction after 24 h. The suggestion that amoebic disappearance is due to lysis by serum C, which in the absence of the ischemia created by the inflammatory lesion is able to reach the trophozoites and destroy them, is not supported by our experiments with CVF, since amoebas still disappeared in leukopenic and deeply hypocomplementemic hamsters, at the same time as in leukopenic hamsters with normal serum C levels. Capin et al. (1980) reported that in hamsters made hypocomplementemic with CVF, amoebic liver lesions present 20 days after injection of axenic trophozoites were larger than in control animals, but their experimental animals were not leukopenic. They interpreted their results as the consequence of increased survival of amoebas. Previous work from our laboratory (Pérez-Tamayo et al., 1990) aimed to examine the mechanism(s) of resistance of rats to infection with the same pathogenic strain of *E. histolytica* used in the present work also ruled out inflammatory cells and C, but failed to disclose the cause of the rapid amoebic disappearance from the liver in leukopenic and hypocomplementemic animals. The possible role of the early ischemia that develops with the onset of inflammation in AEALAH in control animals, with its attending focal anaerobic microatmosphere which would be favourable for parasite survival, is also not compatible with our experimental results with focal ischemia produced in the liver by intraportal injection of Superdex 75 microspheres mixed with virulent amoebic trophozoites. In the absence of inflammation, ischemia failed to preserve amoebas beyond the time in which the parasites disappeared from the liver in adequate control animals.

The two points mentioned above may be combined in one statement: *in early AEALAH, inflammation is necessary for both tissue damage and amoebic survival*. It is not clear why amoebas fail to survive in the absence of inflammatory cells. The current notion that amoebas survive because they resist the potent killing mechanisms of PMNs and MOs that work so well with many other virulent microorganisms is inadequate to explain the results of our experiments. Perhaps the opposite may be true, that inflammatory cells provide amoebas with some kind of stimulus necessary for their survival in the liver. This sounds counterintuitive, but nevertheless it may still be true, and we are currently exploring such possibility. Analysis of the more complex pathology of advanced experimental amoebic liver abscess in

hamsters (EALAH), with extensive tissue necrosis, granulomatous metaplasia of mononuclear cells, fibrous capsule formation, massive proliferation of amoebas, coexisting lesions of very different ages and conspicuous scarcity of inflammatory cells, among many other elements not present in AEALAH, suggests that EALAH is a more complex biological process, in which both host and parasite probably play different and changing roles. Before entering such elaborate and difficult field, we should do well to concentrate on the (apparently) simpler problems presented by AEALAH, namely, the basic requirements for amoebic trophozoites survival once they enter the portal vein.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the excellent technical help of Pedro Balderas Flores and Marco E Gudino Zayas as well as the professional animal care of Ricardo Vargas Orozco and Daniel Sanchez Almaraz. This work includes part of the doctoral dissertation of A.O-G, and was supported by CONACyT Grants 30831-M and 25119-M, and by DGAPA Grant No. IN-225998.

References

- Capin, R., Capin, N.R., Carmona, M., Ortiz-Ortiz, L., 1980. Effect of complement depletion on the induction of amoebic liver abscess in the hamster. *Arch. Invest. Med. (México)* 11 (Suppl. 1), 173–180.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432.
- Morrison, D., Kline, L.L., 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* 118, 362–368.
- Pérez-Tamayo, R., Becker, I., Martínez, R.D., Olivos, A., Montfort, I., Pérez-Montfort, R., 1990. Studies on the rat's natural mechanisms of the resistance to *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (México)* 21 (Suppl. 1), 157–161.
- Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Telco, E., Olivos, A., 1992. Ischemia in experimental acute amoebic liver abscess in hamsters. *Int. J. Parasitol.* 22 (1), 125–129.
- Rivero-Nava, L., Aguirre-García, J., Shibayama-Salas, M., Hernández-Pando, R., Tsutsumi, V., Calderón, J., 2002. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-deleted mice. *Exp. Parasitol.* 101, 183–192.
- Sharma, S., Jabeen, T., Singh, R.K., Bredhorst, R., Vogel, C.W., Betzel, C., Singh, T.P., 2001. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 57, 596–598.
- Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A., 1988. Inflammatory reaction in experimental hepatic amoebiasis. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 130, 112–119.
- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F., Martínez-Palomo, A., 1984. Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117, 81–90.
- Van den Berg, C.W., Aerts, P.C., Van Dijk, H., 1991. In vivo anti-complementary activities of the cobra venom factors from *Naja naja* and *Naja haje*. *J. Immunol. Methods* 136, 287–294.
- Velázquez, C., Shibayama-Salas, M., Aguirre-García, J., Tsutsumi, V., Calderón, J., 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol.* 20, 255–262.