

11261

11

2<sup>ej.</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“CARACTERIZACION DE PROTEINAS  
DE *Entamoeba histolytica* CON UTILIDAD  
EPIDEMIOLOGICA”

T E S I S

Que para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
( ESPECIALIDAD INMUNOLOGIA )

p r e s e n t a:

BIOLOGO ENRIQUE GONZALEZ RIVAS



México, D.F.

267058 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA ASESORIA DE LA DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA

## **Agradecimientos**

A la Dra Cecilia Ximénez García por su asesoramiento y apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

A mis padres por su apoyo y ejemplo.

A mis hermanos con los que he compartido todos los momentos de mi vida

A mi Hermy por su amor, apoyo y comprensión.

A la Dra Emma I. Melendro por su valiosa Colaboración.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, con quienes he compartido buenos y malos momentos durante la realización de este trabajo, y de los que siempre recibí su apoyo en todo momento.

## INDICE.

RESUMEN	1.
INTRODUCCION	3.
ANTECEDENTES	5.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14.
OBJETIVOS	15.
MATERIAL Y METODOS	16.
RESULTADOS	22.
DISCUSION Y CONCLUSIONES	39.
BIBLIOGRAFIA	47.

## CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE *Entamoeba histolytica* CON UTILIDAD EPIDEMIOLOGICA

### RESUMEN.

En México existe una relación aproximada de un paciente con amibiasis invasora por cada cinco portadores, siendo uno de los países con índices más altos de amibiasis invasora en el mundo. Por lo tanto esta infección sigue estando dentro de los principales problemas de salud pública. De ahí, surge la necesidad de incrementar los esfuerzos tanto en el diseño de métodos de diagnóstico más específicos y sensibles como en el desarrollo de vacunas eficaces.

Uno de los problemas más importantes en el estudio de la amibiasis es la identificación de antígenos relevantes de *Entamoeba histolytica* involucrados en la patogenicidad del parásito, así como los más inmunogénicos.

En este sentido nuestro grupo ha detectado algunas fracciones serológicamente reactivas que pueden ser útiles en el diagnóstico de la amibiasis intestinal, a través de ensayos de inmunoelectrotransferencia, en la cual se observó que las fracciones de 23, 24, 25 y 51 kDa son reconocidas por al menos el 65 % de los pacientes con amibiasis intestinal invasora aguda. Y que esta reactividad se ve incrementada hasta en un 91.2 % cuando se combinan estas fracciones.

En base a estos resultados nos propusimos en el presente trabajo realizar la purificación y caracterización de las fracciones de 51, 25 y 24 kDa de *E. histolytica*.

Los resultados obtenidos nos muestran que las tres fracciones presentan actividad enzimática y que podrían pertenecer a la familia de Proteasas de Cisteína. También se determinó que las fracciones de 25 y 24 kDa son glicoproteínas mientras que la de 51 kDa no presenta carbohidratos asociados. Al probar la reactividad de los sueros y salivas de pacientes en diferentes condiciones de infección contra estas fracciones, mediante ELISA, se determinó que la utilización de estas fracciones nos permite discriminar entre la presencia de la infección o no, mostrando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% con la fracción de 51 kDa para los pacientes de absceso hepático amibiano (AHA) y del 70% para el grupo de individuos de amibiasis intestinal invasora

(AI), mientras que para las fracciones de 25/24 kDa se determinó una sensibilidad del 73% para el grupo de AHA y de 76% para el de AI con una especificidad del 95% al detectar la presencia de anticuerpos IgG en el suero de los individuos estudiados. En este sentido se observó que la combinación de las tres fracciones incrementa la sensibilidad hasta un 83 % en el grupo de AI con una especificidad del 90%.

Por otro lado, la detección específica de IgAs en la saliva de pacientes del grupo de AI nos muestra una clara regionalización de la respuesta inmune dirigida contra estas fracciones, ya que en la invasión de las mucosas se desencadena principalmente una respuesta local y secretora mientras que en la invasión extraintestinal principalmente se estimula una respuesta inmune sistémica.

Estos resultados nos indican que estas tres fracciones son inmunogénicas y que al detectarse anticuerpos específicos contra ellas principalmente en el suero de los pacientes de amibiasis invasora, y el hecho de que presenten actividad proteolítica nos sugiere que podrían estar involucradas en alguno de los procesos de patogenicidad de *E. histolytica* y en consecuencia podrían tener una utilidad diagnóstica y seroepidemiológica.

## INTRODUCCION

La amibiasis se ha definido como la condición en la cual el individuo es portador de *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas<sup>(1)</sup>

### **Biología de la *Entamoeba histolytica*.**

Este protozoo parásito se considera uno de los organismos eucarióticos más simples estructuralmente. Presenta dos formas biológicas; La forma activa o trofozoito y la forma de resistencia o quística. El ciclo vital completo de la *E histolytica* consta de cuatro fases consecutivas, que son: el trofozoito, el prequiste, el quiste y el metaquiste. El trofozoito tiene un tamaño de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , pueden ser pleomórficos u ovalados, presentan una membrana celular delgada de 10 nm de espesor, un solo núcleo, además de una disposición citoplásmica sencilla ya que carecen de citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplásmicos, tampoco presentan mitocondrias y son anaerobios facultativos, los trofozoitos no son importantes en la transmisión puesto que son extremadamente sensibles al ambiente y mueren rápidamente ante cualquier cambio del mismo.<sup>2</sup>

La etapa quística es la forma infectiva para el hombre, solo se encuentra en las heces. Son esféricos y tienen una pared delgada, miden de 5 a 25  $\mu\text{m}$  y usualmente tienen cuatro núcleos. Estos pueden ser adquiridos tanto por ingestión de agua o alimentos contaminados, como por manos sucias (fecalismo). Una vez ingerido el quiste pasa a través del estómago y se desquista en la parte inferior del íleon, surgiendo de cada quiste una sola amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez por división citoplásmica 8 trofozoitos uninucleados. Estos trofozoitos son móviles y pueden colonizar alguna porción del intestino delgado, pero principalmente en las áreas de estasis del colon y proliferan por división binaria. Los trofozoitos arrastrados en la materia fecal, son estimulados a enquistarse<sup>3</sup>

### **Características generales de la amibiasis.**

La *E. histolytica* debe su nombre a su actividad lítica sobre los tejidos. Las manifestaciones clínicas son variadas dependiendo de la patogenicidad de la cepa, la



intensidad de la infección, la flora bacteriana, el sitio y extensión del tejido dañado ya que el trofozoíto invade y ulcera la mucosa colónica, causa diarrea, constipación intermitente, distensión abdominal y flatulencia de mal olor. Las complicaciones incluyen ameboma severo del colon, absceso hepático, absceso pulmonar y amibiasis cutánea.

El resultado de la interacción del parásito con el huésped varía desde una infección asintomática, hasta una enfermedad intestinal invasora que puede diseminarse a otros órganos.

Se considera que del 80 al 99 % de las infecciones en humanos con *E. histolytica* son asintomáticas. En la infección intestinal invasora ocurre invasión de la mucosa intestinal, rectosigmoideas y/o apéndice cecal; las lesiones ocasionadas por el parásito se localizan a través de las diferentes estructuras de la mucosa intestinal en donde suelen aparecer úlceras en forma de "botón de camisa" las cuales pueden identificarse por examen rectosigmoidoscópico al inicio de la infección, durante el cuadro de diarrea simple, diarrea sanguinolenta ó disentería.<sup>4</sup>

La amibiasis extraintestinal puede desarrollarse junto con la disentería amibiana o nó, siendo el hígado el órgano al que más comunmente se disemina la infección a través de la vena Porta, sin embargo, en la mayoría de los casos no existen datos previos de sintomatología intestinal. Los "abscesos" hepáticos amibianos, que en realidad representan un foco de necrosis en el hígado, son más frecuentes en los adultos que en los niños. A menos de que se administre el tratamiento adecuado, generalmente los abscesos aumentan de volumen e invaden las estructuras adyacentes ocasionando lesiones pulmonares, pericárdicas, peritoneales o cutáneas. También se pueden presentar lesiones primarias en los pulmones y en el cerebro.<sup>5,6</sup>

La experiencia clínica ha demostrado que la amibiasis invasora es más frecuente en zonas geográficas donde prevalecen algunas cepas virulentas de *E. histolytica*. Entre los factores de riesgo para la infección por *E. histolytica* se han considerado; la situación geográfica, el clima, la raza, el sexo, la edad, las condiciones nutricionales y las inmunológicas, la dieta y los hábitos sexuales del huésped.<sup>7</sup>

## ANTECEDENTES.

### **Epidemiología.**

La amibiasis es un problema de salud pública de carácter cosmopolita. Los datos epidemiológicos a nivel mundial sugieren una prevalencia de alrededor de 500 millones de personas infectadas anualmente, con un índice de morbilidad de 10% y de mortalidad del 1%.<sup>8</sup> La amibiasis es la tercera causa de muerte debida a infecciones parasitarias a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis. Aunque la amibiasis también se presenta en países altamente desarrollados, ésta se observa con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. De ahí que este padecimiento sea considerado como un ejemplo claro de "patología de la pobreza", concepto que abarca: desnutrición, hábitos higiénicos deficientes y uso inapropiado de aguas residuales para la agricultura.<sup>8,9</sup> Dentro de los países que por su alta prevalencia de amibiasis son considerados como endémicos se encuentran. India, Egipto, Turquía y México.<sup>10</sup>

La existencia de una gran cantidad de casos de amibiasis asintomática en el mundo en relación a un número importante pero considerablemente menor de casos de enfermedad invasora, ha sido interpretado como un indicador de la virulencia variable de las diferentes cepas amibianas, siendo uno de los aspectos más discutidos en esta parasitosis. En 1925 Emile Brumpt, sugirió había dos especies morfológicamente indistinguibles; una especie capaz de causar enfermedades invasoras y otra que no causaba enfermedad. A esta última la llamo *E. dispar*.<sup>11</sup> Sin embargo la hipótesis de Brumpt fue descartada en su tiempo por otros expertos.

En este sentido, desde los años 70s se fueron acumulando suficientes datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos que indican que existen dos especies con características morfológicas descritas como *E. histolytica*, las que anteriormente eran conocidas como patógenas y no patógenas, *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente. Por lo tanto ahora se acepta que solo *E. histolytica* es capaz de causar la enfermedad intestinal invasora y extraintestinal, mientras que la *E. dispar* no.<sup>12</sup>

La confirmación de estas dos especies diferenciadas de *Entamoeba* es quizás el más reciente e importante logro en el campo de la investigación en amibiasis; sin embargo esto nos situa frente a una nueva perspectiva en el campo epidemiológico,

particularmente en cuanto a la evaluación e interpretación de los resultados en la determinación de la prevalencia de la infección por *E. histolytica* o por *E. dispar* y la incidencia de la enfermedad amibiana. Por lo tanto es necesario reevaluar estos datos epidemiológicos, utilizando nuevas tecnologías que permitan discriminar entre infecciones por *E. histolytica* o *E. dispar*. Por ejemplo se ha desarrollado una técnica que detecta antígenos de las amibas en las heces de los pacientes.<sup>13</sup>

Por otro lado, la tecnología de ADN recombinante ha permitido mediante la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), poder detectar y amplificar secuencias de ADN específicas de cada una de las especies, y se está evaluando su aplicación en estudios epidemiológicos.<sup>14</sup>

La mayor parte de los individuos infectados con *E. dispar/E. histolytica* son portadores asintomáticos, no existen datos confiables acerca de la relación entre el número de portadores asintomáticos y el número de individuos con infección invasora, sin embargo se ha determinado que en México existe una relación aproximada de un paciente con amibiasis invasora por cada cinco portadores. Siendo uno de los países con índices más altos de amibiasis invasora en el mundo.<sup>8</sup>

En 1993, el número de casos de amibiasis hepática registrados en el país fue de 5000 personas afectadas, con un promedio mensual de alrededor de 500 casos repartidos en toda la república,<sup>8</sup> siendo esta forma clínica 10 a 30 veces más frecuente en adultos que en niños. La frecuencia de amibiasis intestinal es mayor en la población infantil (1 a 5 años de edad) que en los adultos,<sup>15,16</sup> de ahí que ésta se encuentre clasificada dentro de las principales infecciones intestinales, las cuales representan la segunda causa de diarrea en niños.<sup>16</sup>

#### **Mecanismos de patogenicidad amibiana.**

La patogenicidad de *E. histolytica* es un proceso multifactorial que depende de entre otros muchos factores de la presencia y liberación de proteasas, la habilidad para evadir la respuesta inmune y el mecanismo de agresividad dependiente de contacto.<sup>17</sup> No obstante, el o los mecanismos moleculares responsables de la patogenicidad de *E. histolytica* no han sido totalmente comprendidos, sin embargo, se han postulado dos

tipos de toxicidad para la amiba: uno que actúa por contacto sobre la célula blanco<sup>17</sup> y el otro a través de la liberación de componentes solubles.<sup>18</sup>

De tal manera que para iniciar la infección sintomática, los trofozoítos presentes en el lumen intestinal penetran la mucosa intestinal, este mecanismo involucra al menos tres etapas; 1) reconocimiento y adhesión a la célula blanco del huésped, 2) destrucción de las membranas celulares y 3) digestión de la matriz extracelular. En este último proceso han sido involucradas como responsables de la digestión de estas proteínas, una serie de proteasas, algunas de las cuales han sido identificadas como proteasas de cisteína (PC).<sup>19</sup>

La actividad de las PC tiene un pH óptimo entre 6 y 7 y depende de agentes reductores, es inhibida específicamente por inhibidores que modifican al grupo Thiol como son el para-Hidroximercuri-Benzoato (pHMB), la Iodoacetamida (IA) y el [Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butano] (E-64), y sus pesos moleculares se han establecido entre un rango de 16 a 75 kDa.<sup>20</sup> Estudios *in vitro* realizados por numerosos laboratorios han implicado a las PC de *E. histolytica* en efectos citopáticos y/o citotóxicos sobre células de mamífero, degradación de componentes de la matriz extracelular como son: fibronectina, laminina y colágena,<sup>20</sup> así como en la degradación del complejo C3 del complemento del hospedero, ya que se ha propuesto que la habilidad de *E. histolytica* para evadir la lisis mediada por el complemento es una condición para la invasión extraintestinal.<sup>21</sup> También se ha determinado que la degradación de IgA e IgG por lisados amibianos con actividad de PC, limita potencialmente la respuesta inmune del hospedero.<sup>22, 23</sup>

Se han detectado varias actividades de PC en diferentes fracciones antigénicas de *E. histolytica* por diferentes investigadores; una de 26-29 kDa llamada histolysina,<sup>24</sup> otra de 22-27 kDa (amebopaina),<sup>25</sup> también una de 30 kDa,<sup>26</sup> así como una de 16 kDa semejante a la catepsina-B,<sup>27</sup> una más de 56 kDa,<sup>28</sup> y una de 60 kDa,<sup>29</sup> y finalmente otras de 53 y 75 kDa.<sup>230</sup> Estas proteasas se han localizado principalmente dentro de vesículas subcelulares y una pequeña proporción en la superficie externa de las amibas.<sup>19,20, 31,32,33</sup>

Se ha reportado una variación cuantitativa en la actividad proteolítica que puede ser responsable de las diferencias en virulencia entre las cepas de *E. histolytica* HM1 y HK9.<sup>34, 35</sup>

Recientemente se comparó la enterotoxigenicidad y la actividad de PC de la cepa de *E. histolytica* HM1 de baja virulencia con una clona altamente virulenta (1659) derivada de la primera y seleccionada por su habilidad para producir grandes abscesos en hígados de hamsters. Los trofozoítos de la clona 1659 fueron más tóxicos sobre células epiteliales *in vitro*, correlacionando con un incremento de 20 veces en su actividad de PC respectivamente de 53 y 75 kDa.<sup>30</sup>

Estas actividades de PC, se han identificado en trofozoítos aislados de pacientes con colitis o absceso hepático amibiano, pero no a partir de aislados de pacientes con infección asintomática.<sup>35</sup> También se ha correlacionado el nivel de la actividad proteolítica con la severidad clínica de la enfermedad en pacientes,<sup>36</sup> así como en un modelo murino de absceso hepático en el cual la inactivación de las PC disminuye considerablemente el daño producido.<sup>37</sup> También se ha involucrado la acción proteolítica en el proceso de invasión y destrucción en un modelo de amibiasis aguda experimental en la rata,<sup>38</sup> así como, en ensayos *in vitro* sobre hepatocitos de hamster y de rata, evaluando el papel de las PC amibianas sobre el efecto citopatogénico de los trofozoítos sobre éstas células, en los cuales se demuestra que las PC no están involucradas en el efecto citotóxico pero sí son esenciales para el efecto citolítico.<sup>39</sup> Además se ha visto que los pacientes con amibiasis invasora producen anticuerpos contra las PC, mientras que los pacientes asintomáticos no los producen.<sup>40,41</sup> Así es probable que exista una relación directa entre la actividad *in vivo* de la acción de las PC y la patogenicidad de la amiba.

### **Inmunología de la amibiasis.**

En términos generales se acepta que la respuesta inmune contra *E. histolytica* ocurre únicamente como resultado de una invasión tisular<sup>42</sup> induciendo tanto una respuesta de tipo celular como humoral. Sin embargo, el estímulo antigénico local sobre linfocitos B localizados en la lámina propia, submucosa y placas de Peyer, muy probablemente no requiere de invasividad para producir anticuerpos con isotipo IgA,<sup>42,43</sup> los cuales son excretados por exocitosis en una forma molecular llamada IgA secretoria (IgAs). Al parecer la producción de IgAs disminuye rápidamente al eliminar el estímulo antigénico,<sup>44</sup> por lo cual se ha sugerido que quizá a través de su identificación y medición se puedan verificar infecciones intestinales recientes.<sup>43</sup> Aunque cabe mencionar que en

este sentido existen datos más recientes sobre la inmunidad secretora que nos hacen pensar en una participación mucho más activa en la modulación del estado infeccioso en zonas endémicas, donde se ha demostrado la persistencia de IgAs por periodos tan prolongados como un año.<sup>45</sup>

En función de la respuesta sistémica, una vez que la invasión tisular ha ocurrido, se desencadenan los mecanismos de inmunidad humoral y celular.<sup>42</sup> Una de las pruebas más evidentes de la respuesta inmune celular en la amibiasis invasora, es sin duda la intradermoreacción para determinar hipersensibilidad de tipo tardío. Se puede decir que todos los pacientes que se recuperan de un absceso hepático amibiano (AHA), presentan un estado de hipersensibilidad retardada cutánea a antígenos amibianos, al contrario de lo que sucede en pacientes que se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad, aparentemente debido a un estado de anergia transitoria.<sup>46</sup> Este periodo en el que se presenta un estado de inmunosupresión específica en las etapas iniciales del AHA no tratado, ha sido demostrado en pruebas de citotoxicidad de linfocitos provenientes de pacientes, así como por la disminución de la producción del factor inhibidor de la migración de macrófagos *in vitro*.<sup>47</sup> Por otro lado, se ha informado que los linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con AHA responden a la estimulación antígeno-específica en pruebas de transformación blastoide de dichas células,<sup>48</sup> fenómeno que no se presenta en individuos sanos ni en pacientes con amibiasis intestinal, siendo una posible explicación el grado de invasión tisular y/o de la inmunosupresión de la rama aferente de la respuesta inmune.<sup>49</sup> Por otro lado, algunos productos de *E. histolytica* parecen tener actividad mitogénica, los cuales son responsables de la expansión policlonal observada en individuos con AHA,<sup>50</sup> otras investigaciones señalan la inversión de la relación de células T ayudadoras/ células T supresoras en estos mismos pacientes.<sup>51</sup>

El papel que desempeñan los macrófagos en la amibiasis como mecanismo de defensa, constituye en términos generales una forma de resistencia natural del huésped.<sup>52</sup> En estudios realizados en hamsters se ha comprobado que el mecanismo de defensa contra la infección amibiana puede verse favorecido al tratar a los macrófagos con bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o deprimido si son tratados con sílice,<sup>53,54</sup> lo cual además de disminuir la función del macrófago propicia un aumento en la multiplicación de *E. histolytica* a nivel intestinal.<sup>52</sup>

Datos clínicos y experimentales apoyan la hipótesis que los mecanismos de resistencia desarrollados contra la amibiasis invasora son mediados por células. Procesos que disminuyen la actividad de macrófagos *in vivo* hacen al hospedero más susceptible para la infección amibiana.<sup>55</sup>

En las infecciones parasitarias se ha determinado que la resistencia o susceptibilidad contra ciertos parásitos correlaciona con la subpoblación de células T activadas.<sup>56</sup> Así en la amibiasis invasora se ha determinado un incremento en la población de linfocitos TCD4+ Th2, durante la fase aguda de la invasión, mientras que después de la recuperación se incrementa la subpoblación de linfocitos Th-1 los cuales a su vez producen INF- $\gamma$  que activa a los macrófagos.<sup>57</sup>

A pesar de que se ha descrito que los macrófagos y linfocitos pueden destruir trofozoitos amibianos *in vitro*, también las amibas pueden destruir a estas células. Por lo tanto no se puede asegurar si la respuesta citotóxica de los macrófagos y linfocitos es moderada o si las células que participan son destruidas por las amibas. Las evidencias sugieren que la respuesta inmune celular podría estar participando en la resistencia a la reinfección por el parásito, esto está apoyado por la observación clínica de que la recurrencia de AHA es muy poco frecuente.<sup>55,58</sup>

Con respecto a la inmunidad humoral se han detectado anticuerpos específicos en el suero, predominantemente IgG una semana después del inicio de la sintomatología en el caso de la amibiasis invasora,<sup>59</sup> por lo que la identificación de estos anticuerpos se ha propuesto como una herramienta útil en el diagnóstico de la amibiasis, tanto a nivel individual, sobre todo en absceso hepático, como a nivel colectivo a través de la seroepidemiología, como indicador de invasividad.

En realidad no es claro el papel que desempeñan los anticuerpos anti-amibianos, se ignora si tienen un papel protector o si sólo son el resultado de la invasión tisular ya que títulos altos de anticuerpos coexisten durante la fase aguda de la enfermedad y persisten durante largo tiempo. A pesar de ello la reinfección por este parásito es frecuente.<sup>42,60</sup>

Diferentes estudios han demostrado la presencia de coproanticuerpos en amibiasis intestinal<sup>61,62,63</sup> siendo positivos en un 80% de los pacientes, en donde la inmunoglobulina predominante es la IgAs y en menor cantidad IgM e IgG.<sup>64</sup>

La IgAs anti-*E. histolytica* ha sido reportada en la bilis de ratas inmunizadas intracecalmente,<sup>44</sup> en la leche humana<sup>65</sup> y en calostro,<sup>66</sup> los anticuerpos IgA e IgM se han encontrado en secreciones de ileon y colon así como en las heces de pacientes con AHA.<sup>67</sup>

La presencia de anticuerpos de la clase IgM sugiere que esta inmunoglobulina puede ser importante en los mecanismos de defensa contra *E. histolytica*, en virtud de su capacidad para activar el sistema del complemento.<sup>67</sup>

Ximénez y colaboradores (1990) reportaron la presencia de coproanticuerpos anti-*E. histolytica* tanto en pacientes con amibiasis intestinal como en el grupo control estudiado, en ambos grupos los títulos más altos correspondieron a los anticuerpos de la clase IgA, IgM e IgG. Los resultados demostraron que los títulos de coproanticuerpos de los diferentes isotipos no permiten distinguir entre individuos adultos con amibiasis intestinal aguda y la población normal en zonas donde la amibiasis se comporta como una enfermedad endémica.<sup>64</sup>

#### **Serodiagnóstico de la amibiasis.**

La serología representa un proceso cada vez más importante en el diagnóstico, debido a que el exámen microscópico es difícil, requiere personal altamente capacitado, además que no existen diferencias morfológicas entre amibas patógenas y no patógenas.<sup>12</sup> De ahí, la necesidad de contar con métodos prácticos y específicos para la detección de antígenos en las heces y en el suero. En base a estos antecedentes, se han desarrollado diversas metodologías que permiten resaltar la función de los anticuerpos como herramienta en el diagnóstico clínico y epidemiológico.<sup>42</sup>

Dentro de las principales técnicas que emplean antígeno de *E. histolytica* para la detección de anticuerpos circulantes, se encuentran la contraelectroforesis (CIE) y la hemaglutinación indirecta (HAI), ambos métodos tienen un alto grado de sensibilidad y especificidad, ya que coinciden hasta en un 90% de los casos en lo que respecta a resultados positivos y negativos.<sup>68</sup> El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se ha empleado tanto en el diagnóstico de amibiasis humana como en el de amibiasis experimental, observándose en ambos casos resultados comparables con la HAI y la CIE.<sup>69,70</sup>



Así mismo cabe mencionar que el empleo tanto de anticuerpos monoclonales como de sueros hiperinmunes por el método de ELISA permiten la detección de trofozoítos en las heces, lo cual constituye un avance potencial en el diagnóstico de esta enfermedad.<sup>71,72</sup> A pesar de todos los avances logrados en este sentido, aún se siguen realizando diversas investigaciones con el objeto de identificar y caracterizar aquellas proteínas altamente reactivas y específicas de la amiba en diferentes estadios de la enfermedad que permitan hacer un diagnóstico adecuado, lo cual ha sido posible gracias tanto al desarrollo del cultivo axénico<sup>74</sup> como a la descripción, evaluación y estandarización de preparaciones celulares de la amiba.<sup>74,75</sup>

No obstante los numerosos avances sobre el entendimiento de las interacciones amiba-huésped, el conocimiento que se tiene en relación a la especificidad y la naturaleza antigénica de la superficie del parásito es limitada. De ahí el interés de diversos grupos por aislar y caracterizar mediante diferentes métodos, antígenos de diferentes fracciones de la amiba que por su participación directa en la infección pudiesen ser empleados en ensayos seroepidemiológicos, de diagnóstico y de protección.

El interés por los antígenos de la membrana celular de *E. histolytica* se basa en el hecho de que éstos son el primer contacto directo del parásito con el sistema inmune del huésped durante la infección amibiana.<sup>42,75</sup>

El estudio de los antígenos proteicos de superficie se ha realizado a partir de extractos acuosos totales obtenidos por sonicación<sup>76,77,78</sup> o por productos de la homogenización de las amibas<sup>79,80</sup> dando como resultado un complejo de antígenos muy heterogéneo dependiendo de las diferentes cepas amibianas utilizadas en su preparación, así como la utilización o no de inhibidores de proteasas. Las diferencias en la preparación de antígenos amibianos para la utilización en pruebas diagnósticas y en estudios seroepidemiológicos es una fuente de variabilidad en los resultados de la evaluación de tales pruebas.

En este sentido, se han reportado algunas fracciones antigénicas cuya frecuencia de reconocimiento por anticuerpos séricos de pacientes con amibiasis invasora aguda es relativamente alta (>50%). Se ha reportado una reactividad de 65% para las proteínas de 23, 24, 26 y 51 kDa y de 56% para la de 62 kDa; esta reactividad se ve incrementada hasta un 91% cuando se combinan las fracciones de 62, 51 y 24 kDa.<sup>81</sup>

De igual manera, existen reportes de una proteína recombinante rica en serina de aproximadamente 25 kDa, la cual se ha utilizado para el serodiagnóstico de la amibiasis invasiva aguda a través del ELISA; esta prueba muestra una sensibilidad de 79% y una especificidad de 87% tanto en sueros de pacientes con AHA como en aquellos que presentan amibiasis intestinal invasiva.<sup>82</sup>

También han sido reconocidas las proteínas de superficie responsables de la adhesión *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* a eritrocitos humanos, células epiteliales (MDCK) y células de ovario de hamster (CHO).<sup>83,84,85,86,87,88</sup> Para la detección de estas proteínas se han utilizado diferentes métodos, identificándose una proteína de 112 kDa,<sup>83, 85</sup> de 170 kD<sup>84</sup> y una de 220 kDa.<sup>87,89</sup>

En cuanto a la presencia o no de carbohidratos en los antígenos de superficie, se ha detectado un complejo antigénico polisacárido proveniente de trofozoítos de *E. histolytica* HK-9 el cual está constituido por 85% de azúcares, 8% de aminoácidos y sólo el 2.5% por lípidos. Es denominado como lipopéptidofosfoglicano (LPPG) el cual es reconocido por sueros de pacientes con AHA así como por sueros de animales inmunizados con este antígeno.<sup>90,91</sup>

Los antígenos citoplásmicos que se originan de las fracciones lisosomales y ribosomales de *E. histolytica*<sup>92,93</sup> probablemente sean más abundantes e inmunogénicos que los antígenos superficiales tal y como ocurre con otros parásitos: tricomonas, leishmanias y algunas bacterias.<sup>94</sup> De esta forma, el principal estímulo para la producción de anticuerpos sería el de los antígenos citoplásmicos más que de los antígenos asociados a la membrana.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México existe una relación aproximada de un paciente con amibiasis invasora por cada cinco portadores, siendo uno de los países con índices más altos de amibiasis invasora en el mundo, considerado como una zona endémica para esta infección. Por lo tanto la amibiasis en México sigue estando dentro de los principales problemas de salud pública. De ahí, surge la necesidad de incrementar los esfuerzos tanto en el diseño de métodos de diagnóstico más específicos y sensibles como en el desarrollo de vacunas eficaces, las cuales representarían un avance tecnológico esencial en el control de la endemicidad del parásito.

Por lo tanto, uno de los problemas más importantes en el estudio de la amibiasis es, la identificación de antígenos de *E. histolytica* con importancia biológica..

En este sentido nuestro grupo ha detectado algunas fracciones serológicamente reactivas que pueden ser útiles en el diagnóstico de la amibiasis intestinal, a través de ensayos de inmunoelectrotransferencia, en la cual se observó que las fracciones de 23, 24, 25 y 51kDa son reconocidas por al menos el 65% de los pacientes con amibiasis intestinal invasora aguda. Y que esta reactividad se ve incrementada hasta un 91.2% cuando se combinan estas fracciones.<sup>81</sup>

En base a estos resultados nos propusimos en el presente trabajo llevar a cabo la purificación y caracterización de las fracciones antigénicas de 51, 25 y 24 kDa de *E.histolytica*.

Esto nos permitirá contar con los reactivos necesarios para la realización de estudios seroepidemiológicos y de diagnóstico.

## OBJETIVOS.

Caracterizar las fracciones antigénicas de *Entamoeba histolytica* de 24, 25 y 51 kDa reconocidas por anticuerpos de pacientes con amibiasis intestinal invasora aguda.

### Objetivos particulares.

Obtención de las fracciones inmunoreactivas de 24, 25 y 51 kDa por electroelución y por cromatografía de filtración.

Caracterización bioquímica de las fracciones, determinando su actividad enzimática así como la detección de carbohidratos asociados con estas fracciones.

Producción de anticuerpos policlonales contra estas fracciones en conejos.

Evaluar la relevancia antigénica de estas fracciones frente a anticuerpos de pacientes con diferentes condiciones clínicas, para determinar si pueden ser utilizadas en ensayos seroepidemiológicos y de diagnóstico.

## MATERIAL Y METODOS.

**Cultivo de amibas y preparación de antígeno amibiano.** Los trofozoítos de *E.histolytica* de la cepa HM1-IMSS se crecieron en medio axénico TYI -S-33.<sup>73</sup> Las amibas fueron cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento después de 48 hrs, se lavaron tres veces con una solución de fosfato de potasio 19 mM pH 7.2 (PD) por centrifugación a 200g, 10 min a 4°C, (Centrífuga Beckman TS-6). Se decantó el sobrenadante y al botón se le agregaron los siguientes inhibidores de proteasas: 50µl de Fenil-metilsulfonil-fluoruro (PMSF) 50 mM y 40 µl de para-hidroximercuribenzoato (pHMB) 10 mM (Sigma, Chemical Co.,St.Louis Mo.USA). A continuación estos trofozoítos se resuspendieron en 5ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y por medio de un homogenizador manual sumergido en baño de hielo se homogenizó la suspensión. El homogenizado se centrifugó a 8000 g durante 30 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Beckman J2-21, rotor J-21), el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 0.5 ml a -20°C, a esta fracción corresponden los antígenos solubles. Así mismo la fracción restante denominada antígeno insoluble, que corresponde a las fracciones membranales del extracto, se suspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, nuevamente se le agregaron los inhibidores de proteasas y se almacenó en alícuotas de 0.1 ml a -70 °C.

**Determinación de proteínas.** La determinación de proteínas tanto para el antígeno insoluble total como para las fracciones purificadas, se realizó de acuerdo al método de Bradford<sup>95</sup> empleando Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma Chemicals Co.) como proteína de referencia.

**Electroforesis de antígeno de *E. histolytica*.** El patrón electroforético del antígeno insoluble se analizó en geles de poliacrilamida al 10% con Sulfato dodecil de sodio (SDS) en condiciones no reductoras,<sup>96</sup> para la identificación y separación de las fracciones reconocidas por los individuos del grupo de amibiasis intestinal (24,25 y 51 kDa), los geles se tiñieron con azul de Coomassie y se analizó su corrimiento electroforético en un densitómetro (GS-670 BECKMAN).

**Purificación de las fracciones.** Las fracciones seleccionadas (24,25 y 51kDa) se obtuvieron por dos métodos; 1) por electroelución de geles preparativos<sup>97</sup>, con el fin de obtener cantidades discretas de las proteínas, y 2) Columnas de filtración<sup>98</sup> (Sephadex G-50 y G-75, así como Ultragel-Aca 54), (Pharmacia Fine Chemicals,Uppsala Suecia) analizando la separación de las proteínas en base a su peso molecular.

La electroelución de las proteínas se hizo a partir de geles preparativos de poliacrilamida-SDS al 10%<sup>91</sup> en geles de 16 cm de alto, se corrieron las electroforesis, separándose en cada corrida 4.36 mg del Ag insoluble amibiano. Se tiñieron los geles con azul de Coomassie y mediante tinción temporal con una solución de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$  0.3M<sup>99</sup> se identificaron las bandas, se cortaron y se electroeluyeron en una cámara de electroelución (BIO-RAD) de acuerdo con las especificaciones establecidas por el fabricante, utilizando una solución amortiguadora de Tris- HCl 0.025 M, Glicina 0.192M y SDS al 0.1%. La electroelución de las fracciones se llevó acabo a 4°C durante 3 hrs a 10 mA. Después se recuperaron las fracciones electroeluidas se dializaron contra solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 19 mM pH 7.2, hasta retirar la glicina, para después concentrar las fracciones por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %.

**Cromatografía de filtración.** Se utilizaron tres resinas Shephadex G-50 y G-75, Ultragel-Aca 54, las cuales se montaron independientemente en columnas de vidrio de 1.5 cm de diámetro por 100 cm de largo. En cada columna, una vez montada y equilibrada con la solución de elución, se pasó 1 ml del antígeno insoluble amibiano (30 mg) resuspendido en la solución de elución agregándole una mezcla de inhibidores de proteasas, pHMB 10 mM, PMSF 50 mM y EDTA 10 mM. Se utilizaron como eluyentes la siguientes soluciones: Para el caso de la columna de Ultragel Aca 54, se utilizó Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.3M, SDS 1%, pH 7.5, el flujo se ajustó a 16 ml/h y se colectaron fracciones de 4.5 ml. Para la columna de Sephadex G-50 se utilizó, Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.3 M, pH 7.5, Tween 80 al 0.5%, pHMB 10mM, urea 0.3M, colectando fracciones de 6 ml cada 30min. En el caso de la columna de Sephadex G-75 se utilizó Tris-HCl 50mM, NaCl 0.3M, Triton X-100 al 0.01%, pHMB 10 mM, urea 0.3 M, colectando fracciones de 4 ml cada 15 min. Todas las columnas se corrieron a 4°C. Las fracciones se leyeron para determinar la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro DU-650 (BECKMAN) a 280 nm, las fracciones que contenían proteína se concentraron y se probaron por

electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % y en condiciones reductoras para detectar las fracciones de nuestro interés y se utilizó una tinción de plata.

**Determinación de la actividad enzimática de las fracciones antigénicas.** La actividad proteolítica de cada una de las fracciones se determinó por un método colorimétrico usando Azocaseína como sustrato.<sup>100</sup> Las fracciones se obtuvieron de geles no fijados (tinción temporal), 6 bandas de cada fracción se electroeluyeron se tomaron 200  $\mu$ l de cada fracción electroeluida con una concentración en promedio de 40 $\mu$ g, incubándose con 400  $\mu$ l de una solución de Azocaseína (2.5 mg/ml) por 3 hrs a 37°C, la proteólisis fue detenida con 600 $\mu$ l de TCA al 10% a 4°C por 12 hrs, después se centrifugó a 5000 g por 5 min a temperatura ambiente, y se determinó fotométricamente en el sobrenadante la absorción de azopéptidos coloridos a 366 nm, en un espectrofotómetro DU-650 (BECKMAN).

También en este mismo sistema, se determinó la inhibición proteolítica utilizando diferentes inhibidores de proteasas, para poder determinar la familia a la cual pertenecen estas fracciones. Se utilizaron los siguientes inhibidores; PMSF 10 mM, pHMB 10mM, EDTA 2mM, IA 10  $\mu$ M y el E-64 10  $\mu$ M.

Además se realizaron zimogramas de acuerdo al método descrito por Pérez-Montfort y col.<sup>101</sup> en geles de poliacrilamida SDS copolimerizados con colágena al 0.1%.

Por otro lado, también se determinó su actividad proteolítica sobre diferentes sustratos, utilizando geles de agar al 1% copolimerizados con; gelatina, gamaglobulinas IgG, hemoglobina, colágena y azocaseína a una concentración de 0.1 %, una vez solidificado se realizaron orificios en el gel y se colocaron 10 $\mu$ g de cada una de las fracciones y se incubaron por 3 hrs a 37°C y después se tiñeron con azul de Coomassie.

**Detección de carbohidratos asociados con las fracciones.** Se detectaron los carbohidratos mediante la reacción de Schiff-Pas<sup>102</sup> con algunas modificaciones. 20  $\mu$ g de cada una de las fracciones electroeluidas se adsorbieron en papel de nitrocelulosa NC, después se incubó el papel de NC en una solución fijadora de TCA al 10% por 12 hrs, después se lavó ligeramente y se le agregó una solución de ácido acético al 5% y ácido peryódico al 1% por 2 hrs en oscuridad a 4°C. A continuación se lavó exhaustivamente

con agua destilada y se incubó el papel de NC con el reactivo de Schiff, hasta que se desarrolló el color (aproximadamente 12 hrs), finalmente se lavó para quitar el exceso de colorante con una solución de ácido acético al 5%. También se incluyeron en este ensayo proteínas controles, como la BSA y la gamaglobulina de conejo, 20 µg de cada una fueron teñidas con azul de Coomassie y por la reacción de Schiff.

**Producción de anticuerpos policlonales.** Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda Blancos por dos métodos, el primero con las fracciones obtenidas por electroelución y el segundo con las fracciones cortadas del gel directamente en donde sabemos que la acrilamida funciona como adjuvante. Antes de iniciar los esquemas de inmunización se les hizo a cada conejo un sangrado preinmune.

En el primer esquema de inmunización, se inocularon a cada conejo aproximadamente 100µg de cada una de las fracciones emulsificadas con un volumen igual de adjuvante completo de Freund (Gibco Laboratories Inc. Grand Island, NY. USA) por vía intramuscular; después los conejos fueron inoculados con el mismo extracto pero con adjuvante incompleto de Freund tres veces con dos semanas de intervalo entre cada dosis y finalmente un refuerzo final de 100µg de la fracción correspondiente diluida en 200µl de PBS.

En el segundo método, los conejos fueron inoculados con los fragmentos del gel correspondientes a cada una de las fracciones (2 geles por cada inmunización y por cada banda), los cuales fueron particulados hasta que pasaran libremente a través de la aguja con la cual se inmunizaron, se siguió el mismo esquema que en el primer caso, pero sin agregarle adjuvante. La respuesta de anticuerpos se determinó por el método de ELISA<sup>69</sup> y por inmunoblot, tratando algunas tiras de NC con el Ag transferido con metaperyodato.<sup>103</sup> Cuatro días después de la última inmunización se extrajo la sangre por punción cardiaca hasta blanco, de la cual se obtuvo el suero y se purificaron las inmunoglobulinas (IgGs) por precipitación con sulfato de amonio al 30 % y mediante de una columna de afinidad ( proteína-A-Sepharosa. Pharmacia fine Chemicals).<sup>98</sup>

**Inmunoelectrotransferencia.** Las proteínas del antígeno insoluble separadas en el gel fueron transferidas a papel de NC de acuerdo al método de Towbin.<sup>104</sup> La NC se



cortó en tiras de 4 mm que se incubaron con los sueros de los conejos inmunizados con las fracciones antigénicas de 51, 25 y 24 kDa. La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada mediante un conjugado anti-IgG de conejo peroxidado 1:1000 (Zimed Laboratories, San Francisco, Ca. USA) utilizando 1-4 cloronaftol (Sigma Chemical ) como indicador de la reacción.

**Obtención de sueros y salivas de pacientes con amibiasis.** Se realizó un seguimiento de los pacientes de consulta externa del Hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE , clasificándose a los pacientes en base a su sintomatología clínica y exámenes coproparasitológicos dentro de los siguientes grupos. Amibiasis intestinal (AI) (20 pacientes), Absceso hepático amibiano (AHA) (8 pacientes) y un grupo de portadores (P) (20 pacientes) los cuales presentaron quistes de *E. dispar* y/o *E. histolytica* pero sin sintomatología clínica. Además se incluyeron dos grupos de individuos como controles; el grupo control o negativo (N) (20 individuos) y un grupo de individuos (Otros Parásitos) (OP) (20 pacientes), los cuales presentaban infección con parásitos intestinales diferentes de *E. histolytica*/*E. dispar*, presentaban principalmente: *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, y *Entamoeba hartmanii*.

Los sueros se obtuvieron de la sangre de los pacientes por centrifugación de la misma a 500 g por 30 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su utilización. Las muestras de saliva también obtenidas de estos pacientes, se centrifugaron a 14,000 g por 30 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta su utilización. Para la detección de IgAs específica, se cuantificaron previamente las concentraciones de IgAs total en cada muestra de saliva mediante ELISA,<sup>105</sup> con el objeto de ajustar todas las muestras a una concentración de 0.05 mg/ml

**ELISA Para probar la reactividad de las fracciones electroeluidas.** A las fracciones purificadas se les determinó su reactividad contra sueros y salivas de pacientes. Para esto se utilizaron pozos de placas de poliestireno para microtitulación (Costar Cambridge, MA.USA.), los cuales se sensibilizaron colocando 1 µg/ pozo de cada una de las fracciones resuspendidas en 50 µl de una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres

veces durante 5 min para eliminar el exceso de sales, un primer lavado con PBS-Tween al 0.5%-BSA al 0.5% y dos más con PBS-Tween al 0.5% y se bloquearon con BSA al 3% en PBS por toda la noche a 4°C. Los pozos se lavaron nuevamente como en el paso anterior y se incubaron con los sueros de los pacientes diluidos 1:1000 en PBS-BSA-Tween por 12 hrs a temperatura ambiente y en agitación. También en estas mismas condiciones se incubaron placas con las muestras de saliva diluidas con PBS-BSA-Tween a una concentración de IgA total de 0.05 mg/ml colocándose 50 µl/pozo. Los pozos se lavaron nuevamente y a continuación las placas se incubaron con un suero de cabra anti-IgG humano y otro anti-IgA humano peroxidados (Zymed Laboratories, San Francisco, Ca. USA.) diluidos 1:1000, incubándose durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Como solución reveladora se utilizaron 50 µl/pozo de 10mg de ortofenilendiamina en 10 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5 y 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %: la reacción se paró aproximadamente a los 5 min con 200 µl/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y la D.O. se midió directamente en la placa a 490 nm con un microlector de ELISA (EL-312e, BIO-TEC INSTRUMENTS).

**Análisis estadístico.** La comparación de la reactividad de los sueros y las salivas de los pacientes estudiados contra las fracciones de 51, 25 y 24 kDa, en los diferentes grupos, se realizó mediante la prueba de t-student, utilizando el programa estadístico "Sigma Plot".

La sensibilidad fue calculada como el cociente de los (verdaderos positivos/ verdaderos positivos + falsos positivos) y la especificidad se determinó utilizando la siguiente fórmula; (negativos verdaderos / negativos verdaderos + falsos negativos), para cada una de las fracciones y cada una de las condiciones de infección.

## RESULTADOS.

Una vez que se obtuvo el patrón electroforético del antígeno insoluble de *E. histolytica*, se procedió a la identificación de las fracciones de 51, 25 y 24 kDa, (figura 1) en base al análisis por densitometría de este patrón electroforético se determinó que estas fracciones corresponden a las bandas 14, 34 y 35 respectivamente (figura 2).

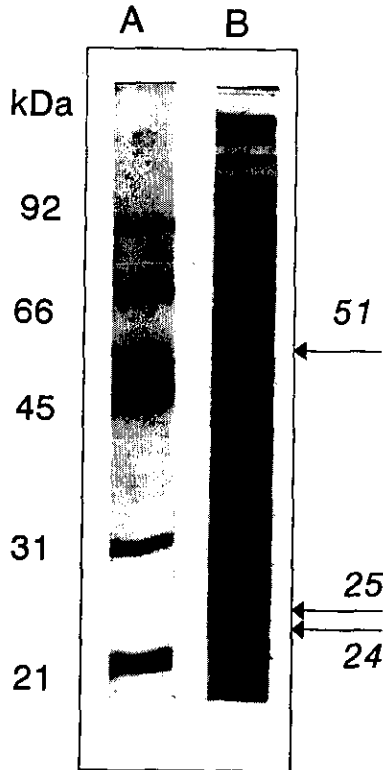


Figura 1. Electroforesis de antígeno insoluble de *E. histolytica* HM1-IMSS, en gel de poliacrilamida al 10 %, las proteínas se detectaron mediante la tinción con azul de Coomassie. A) pesos moleculares, B) Ag insoluble.

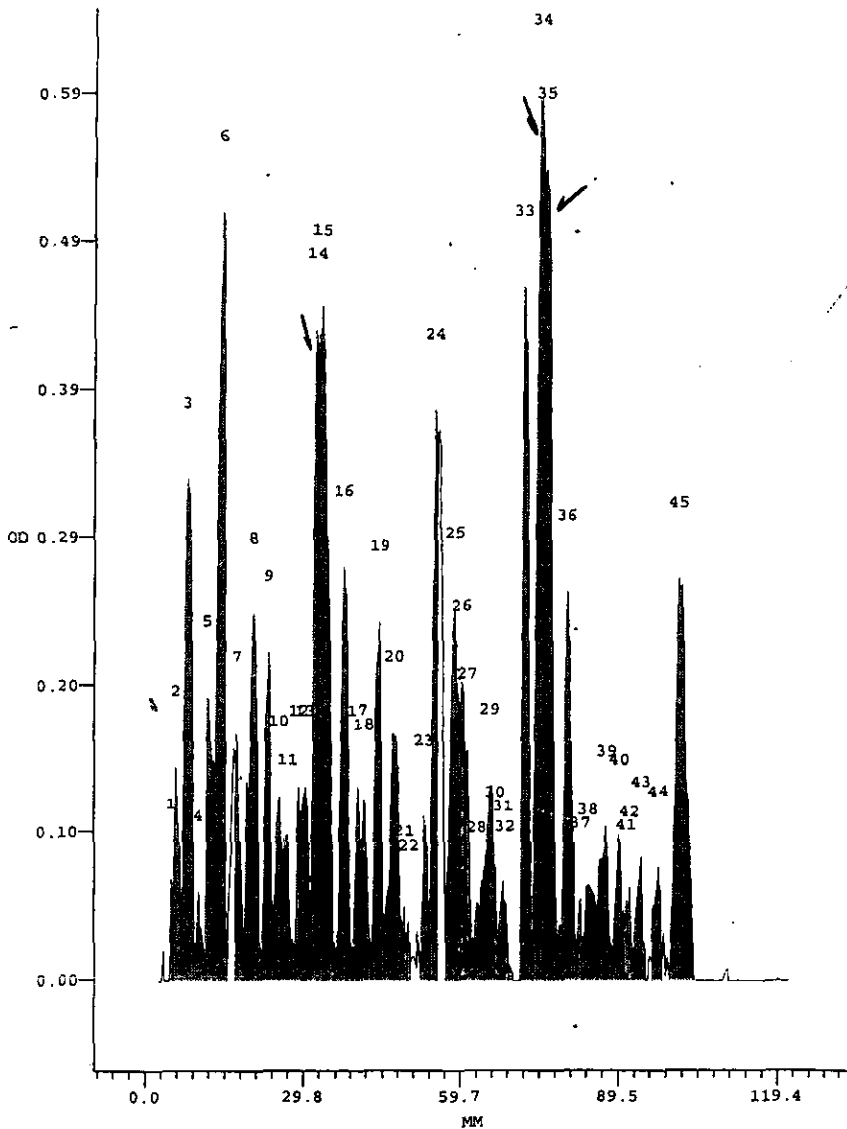


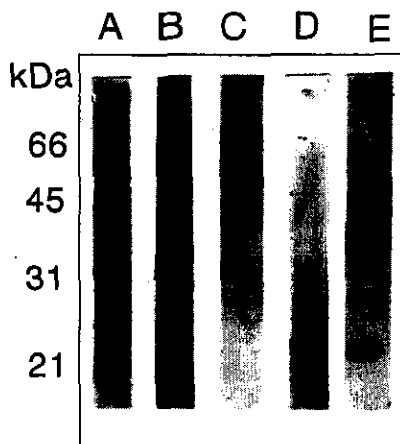
Figura 2. Perfil del patrón electroforético del Ag insoluble de *E. histolytica*, analizado por densitometría.

Los resultados del análisis densitométrico para las fracciones de nuestro interés se muestran en la tabla I la cual nos indica que tan representativas son éstas fracciones en base a todo el corrimiento antigénico.

**Tabla I.** Análisis del perfil electroforético por densitometría de las fracciones seleccionadas.

Nº de banda	PM (kDa)	Movilidad relativa (RF)	Area (DO*mm)	% de proteína total
14	51	0.25	0.26	2.2
34	25.6	0.61	0.86	7.1
35	24.8	0.65	0.67	5.5

En cuanto a la purificación, se observó en nuestras condiciones que el mejor método para obtener estas fracciones fue mediante la técnica de electroelución, a pesar que no tiene un rendimiento comparable al de la cromatografía (tabla II), donde se observa que el rendimiento de este procedimiento de purificación fué del 4% con un factor de purificación de 1 en promedio para cada fracción electroeluida. En la figura 3 se muestra la electroforesis de las fracciones obtenidas por este método.



**Figura 3.** Electroforesis de las fracciones de 51, 25 y 24 kDa obtenidas por electroelución, A) Pesos moleculares (kDa), B) Ag insoluble, C) fracción de 51 kDa, D) fracción de 25 kDa, E) fracción de 24 kDa. Tinción con azul de Coomassie, 10 µg de cada fracción se utilizaron en este corrimiento.

**Tabla II.** Resultados de la obtención de las fracciones por electroelución.

	Extracto	Fracción de 51 kDa	Fracción de 25 kDa	Fracción de 24 kDa
Proteína total (mg/ml)	4.957	0.215	0.21	0.205
Actividad total (DO) 366nm	136.66	6.34	6.62	5.67
Actividad específica (U/mg de proteína)	27.57	29.48	31.5	27.68
Factor de purificación	1	1.1	1.14	1.0
Rendimiento (%)	100	4.6	4.8	4.2

En la cromatografía de filtración, nos enfrentamos con algunos problemas técnicos, ya que en las tres resinas utilizadas, a pesar de obtener perfiles cromatográficos donde se observan varios picos, figura 4, al tratar de identificar estas fracciones por electroforesis no se pudieron detectar aún utilizando tinción con plata (figura 5) lo cual nos indica que hubo degradación de nuestras proteínas, a pesar de todas las precauciones tomadas.

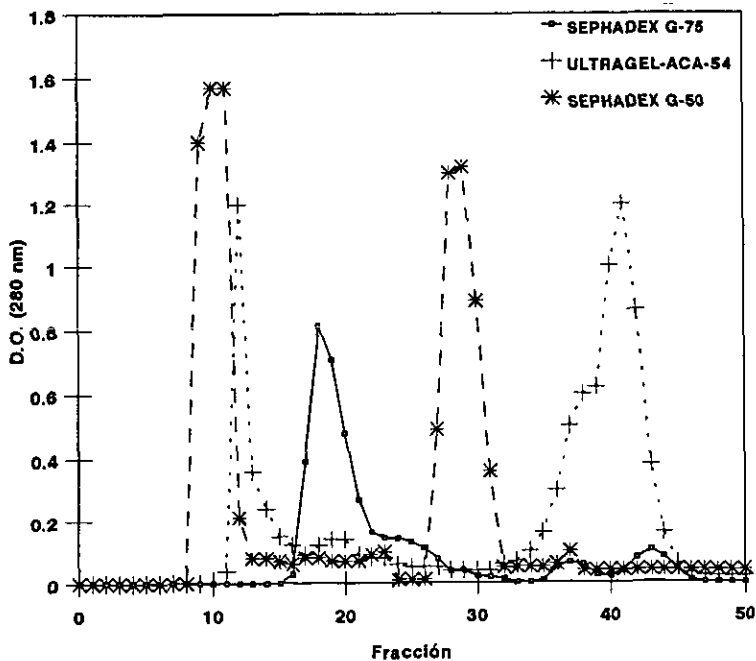


Figura 4. Exclusión molecular de Ag insoluble de amiba a través de columnas de filtración. En cada corrida se utilizaron 30mg del Ag insoluble.

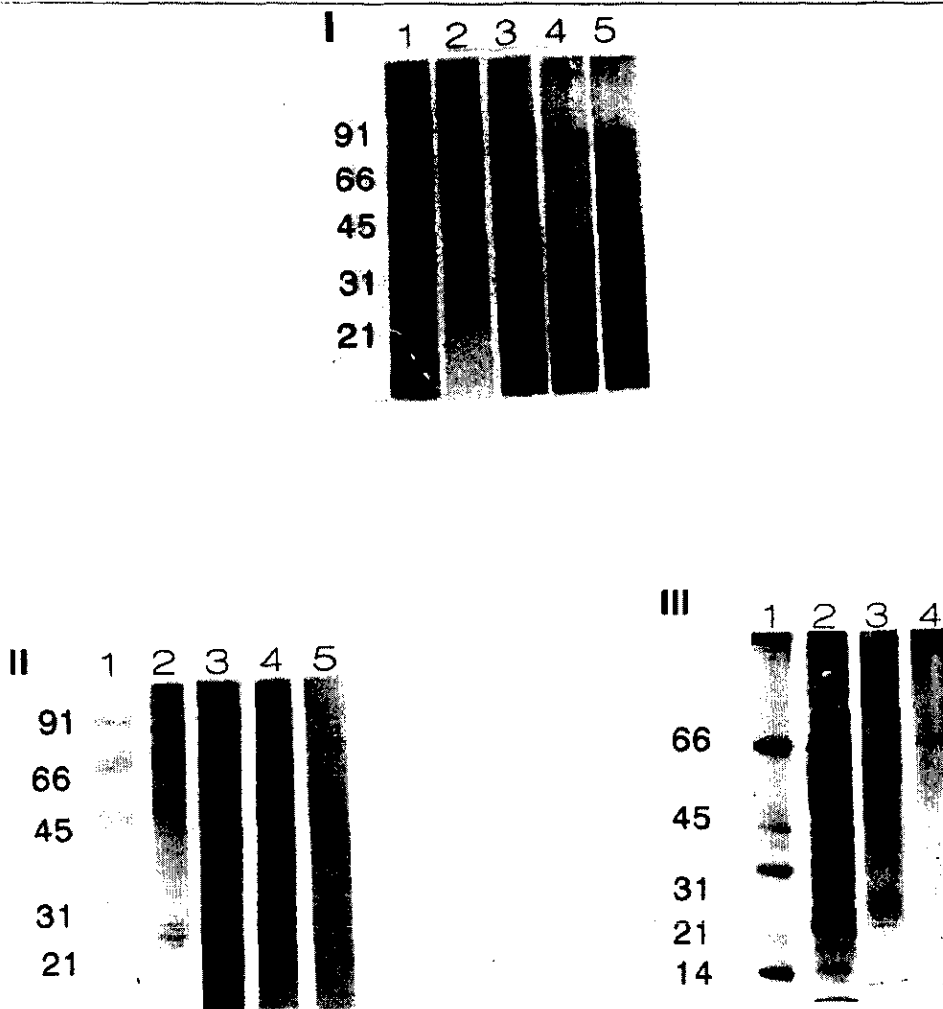


Figura 5.-Electroforesis de las fracciones obtenidas por las diferentes columnas de filtración; I.-Ultragel-Aca 54, II.-Sephadex G-75 y III.-Sephadex G-50. 1) pesos moleculares, 2) Ag insoluble, 3) 1º pico, 4) 2º pico, y 5) 3º pico. Fracciones colectadas para cada una de las columnas respectivamente, los gels se corrierón en condiciones reductoras y se tiñieron con plata.

En cuanto a la detección de carbohidratos por la reacción de Schiff se observó que las fracciones antigénicas de 24 y 25 kDa son glicoproteínas, mientras que la de 51 no presenta carbohidratos asociados, (figura 6).

**Tabla III.** Actividad proteolítica de las fracciones antigénicas de *E. histolytica* posterior al tratamiento con diferentes inhibidores de proteasas.

Fracción(kDa)	Tratamiento	D.O.	% de Actividad proteolítica
Ag total	S/T	2.790+- 0.69	100
24	S/T	1.268 +- 0.405	100
	pHMB	0.148 +- 0.015	11
	PMSF	0.861 +- 0.279	67
	EDTA	1.058 +- 0.105	83
	IA	0.159 +- 0.088	12
	E-64	0.115 +-0.078	9
25	S/T	1.325 +-0.356	100
	pHMB	0.191 +- 0.65	14
	PMSF	0.834 +- 0.085	63
	EDTA	1.075 +- 0.203	81
	IA	0.138 +- 0.084	10
	E-64	0.148 +-0.091	11
51	S/T	1.135 +-0.540	100
	PHMB	0.149 +-0.012	13
	PMSF	0.805 +- 0.100	71
	EDTA	0.915 +- 0.136	80
	IA	0.198 +- 0.052	17
	E-64	0.191 +-0.068	17

La actividad proteolítica se determinó utilizando Azocaseína como sustrato, cuantificándose la actividad a una densidad óptica (D.O) de 336 nm, S/T sin tratamiento. Los datos mostrados son el promedio mas la desviación standar (DS) de cada tratamiento hecho por triplicado.

Esta inhibición parcial con el pHMB, la IA y el E-64 que son inhibidores específicos para proteasas de Cisteína, nos sugiere que estas fracciones podrían pertenecer a la familia de Proteasas de Cisteína.

En cuanto a la producción de anticuerpos policlonales contra estas fracciones, se observó que las tres fracciones son inmunogénicas, capaces de inducir una respuesta inmune sistémica en los conejos, al titular los sueros hiperinmunes contra antígeno total de amiba, mediante la técnica de ELISA se obtuvieron títulos de anticuerpos en general de 1:10,000 (figura 8), sin embargo, para el caso del conejo inmunizado con la fracción



de 24 kDa se obtuvieron títulos de 1:30,000 cuando se utilizó el primer esquema de inmunización, ya que al utilizar el segundo esquema de inmunización se observó un título de anticuerpos menor (figuras 8 y 9).

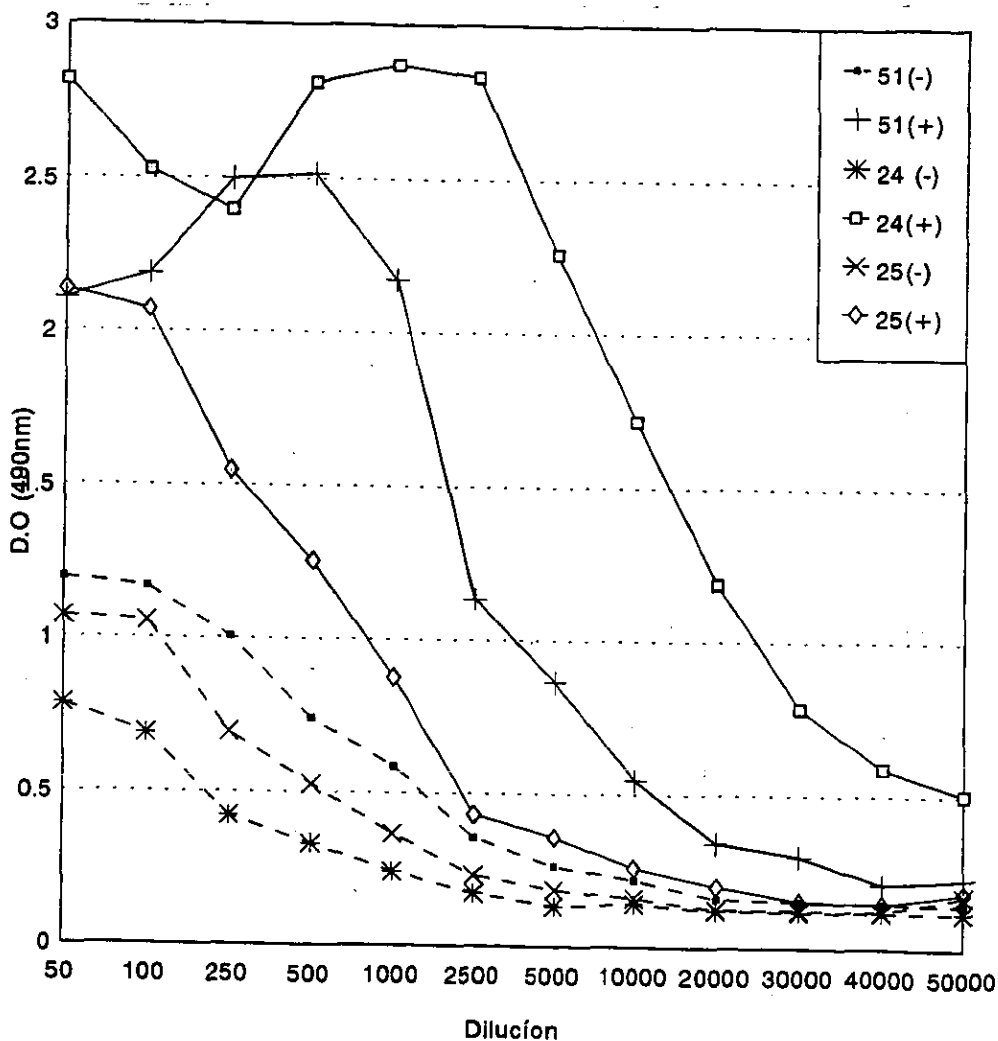


Figura 8. Titulación de los anticuerpos (IgG) de conejo anti-fracciones del Ag amibiano, (1<sup>er</sup> esquema de inmunización) utilizando las fracciones electroeluidas y con adyuvante. (-) sueros preinmunes, (+) sueros hiperinmunes.

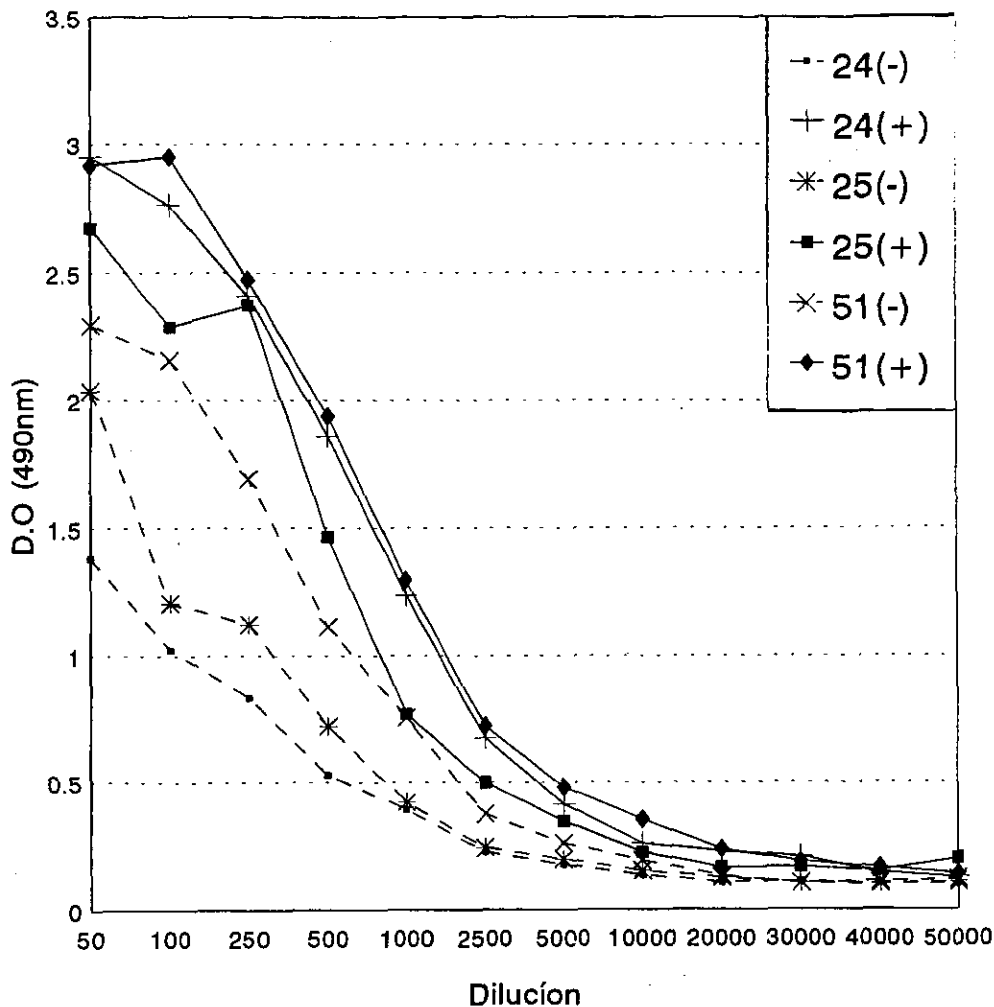


Figura 9.- Titulación de los Ac (IgG) de conejo Anti-fracciones de *E. histolytica*, ( 2ºesquema de inmunización ) se utilizaron fracciones obtenidas deirectamente de fragmentos del gel correspondientes para cada banda sin adyuvante. (-) sueros preinmunes, (+) sueros hiperinmunes.

También se observó una gran reactividad cruzada al probar estos sueros hiperinmunes contra el Ag insoluble amibiano total, transferido a papel de NC (figura 10), sin embargo observamos una reducción considerable en dicha reactividad cruzada contra otros Ags cuando utilizamos anticuerpos producidos mediante el segundo esquema

de inmunización, por otro lado esta reactividad se redujo al tratar las tiras de papel de NC con peryodato figuras (10 y 11).

Por otro lado, se observó que los sueros de los conejos inmunizados con las fracciones de 24 y 25 kDa reconocen a las mismas fracciones, lo cual nos sugiere que podría tratarse de una misma proteína que se fragmenta (figura 10) Sin embargo no podríamos descartar el que se trate de dos diferentes proteínas con epítopes compartidos.

Estos anticuerpos se utilizarán posteriormente en la tamización de la biblioteca de cADN de *E. histolytica* HM1-IMSS, con la finalidad de identificar, aislar y secuenciar las clonas que codifiquen para estas fracciones.

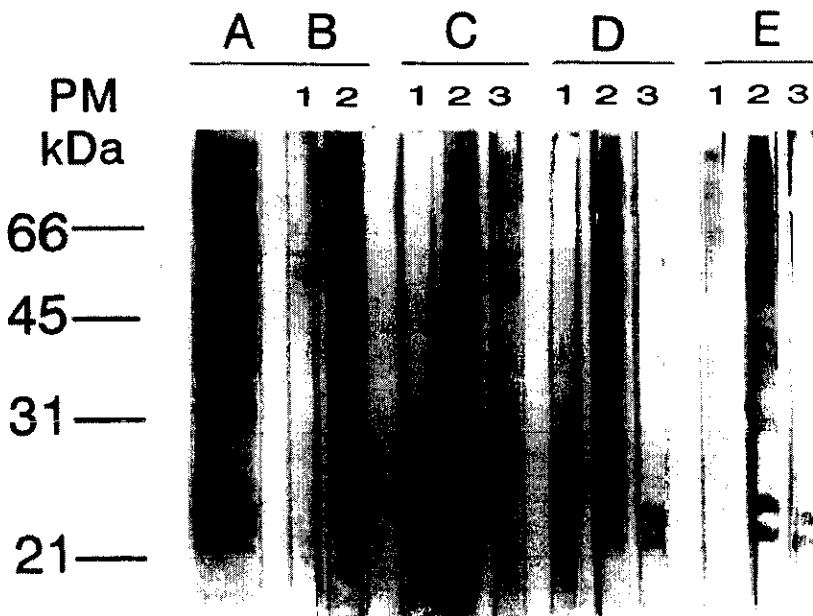


Figura 10.- Inmunoelectrotransferencia del Ag insoluble contra los sueros de los conejos preinmunes 1), e hiperinmunes 2), inmunizados con la fracción de: C) 51 kDa, D) 25 kDa y E) 24 kDa. A) Ag transferido teñido con anído negro; B) Suero contra Ag total, 3) Ag insoluble tratado con peryodato contra suero hiperinmune. Esquema de inmunización 1.

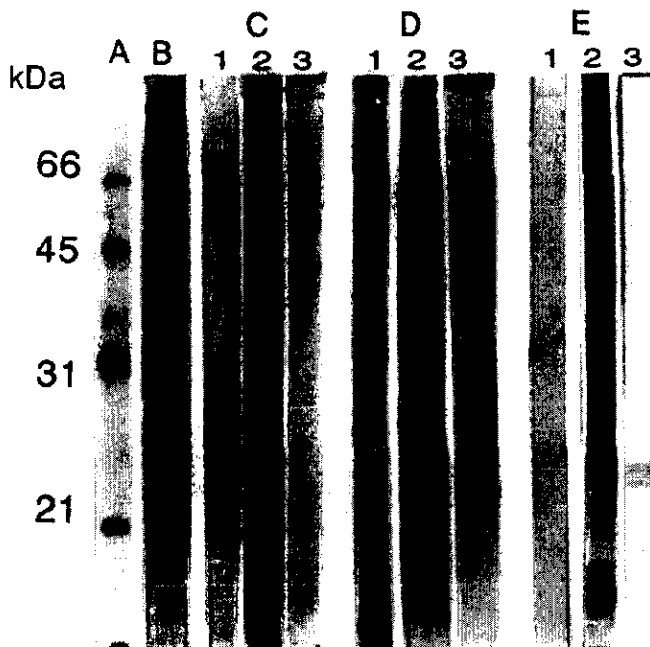


Figura 11.-Inmunoelctrotransferencia del Ag insoluble amibiano contra los sueros de los conejos preinmunes 1) e hiperinmunes 2) inmunizados con la fracción de 51 kDa C), 25 kDa D) y 24 kDa E). A) pesos moleculares, B) Ag transferido. 3) IgG hiperinmune sobre Ag tratado con peryodato. 2º esquema de inmunización.

En cuanto a la reactividad de los sueros de los pacientes contra las fracciones antigénicas de 51, 25 y 24 kDa mediante la técnica de ELISA, se observó una mayor reactividad de los sueros de los pacientes de los grupos AI y AHA contra estas fracciones, obteniéndose un promedio de DO a 490 nm de  $0.806 \pm 0.358$  (AI), y  $1.0 \pm 0.195$  (AHA) en el caso de la fracción de 51 kDa; mientras que para las fracciones de 24 y 25 kDa se obtuvieron DO de  $0.962 \pm 0.344$  (AI) y  $0.893 \pm 0.223$  (AHA), como se muestra en la figura 12 donde se observa que estos dos grupos de pacientes se encuentran por arriba del resto de los promedios, sin embargo dentro de los grupos controles se detectaron algunos individuos con títulos altos de anticuerpos contra estas fracciones, el 10% para la fracción de 51 kDa y 5% para las de 25/24 kDa en el grupo N, para el grupo OP el 15 % de los individuos resultaron positivos para la fracción de 51 kDa y el 10% para las fracciones de 25/24 kDa. En el grupo de P el 25 % de individuos

reconocieron la fracción de 51 kDa mientras que en el caso de las fracciones de 25/24 kDa solo hubo un reconocimiento del 5%. No obstante los promedios de estos grupos se localizan por debajo de la línea de corte, que en este caso se utilizó como criterio de límite de positividad, el promedio del grupo control (N) más 2 DS resultando en 0.705 nm para la fracción de 51 y de 0.779 para las fracciones de 25/24 kDa, (figura 12).

En cuanto a la reactividad de los sueros de los pacientes de los grupos controles contra estas fracciones, se observó una mayor reactividad contra la fracción de 51 kDa, siendo reconocida por el 25% de los pacientes del grupo P y por el 15% del grupo OP, así como por el 10 % del grupo N, sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas al comparar estos grupos contra los grupos de AHA y AI ( $p < 0.001$ ), no obstante esta reactividad, el uso de esta fracción nos permitió el reconocimiento del 100% de los pacientes de AHA, con respecto al grupo de AI solo fue reconocida por el 57% de los pacientes, como se observa en la tabla IV.

Por otro lado, en el caso de las fracciones de 25/24 kDa se observó un menor reconocimiento de estas con los sueros de los grupos controles, solo el 10% de los pacientes del grupo OP y 5% en los grupo P y N resultaron positivos, también existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) al comparar estos grupos contra los grupos de AI y AHA, la utilización de estas proteínas nos permitió un reconocimiento del 62 % de pacientes con AHA y del 68% para el caso de AI.

En este sentido, al comparar las DO obtenidas al utilizar las fracciones por separado, se observa que la combinación de las tres fracciones nos permite detectar al 78 % de individuos de AI, sin embargo también se incrementa el reconocimiento en los grupos controles, como se observa en la tabla IV, en el caso de los individuos del grupo P se detecta al 30%, al 10% del grupo N y 15 % del grupo OP.

En cuanto a la IgAs en la saliva de estos pacientes solo se detectó reactividad en el grupo de los pacientes de AI. El 58% de estos pacientes reconocen las fracciones de 25/24 kDa y la fracción de 51 kDa el 47 % de ellos. De los pacientes del grupo de AHA solamente 2 fueron positivos para ambas fracciones (51 y 25/24 kDa) lo cual representa el 28 %. Del grupo de N solo el 5% de los individuos estudiados reconocieron las fracciones de 51 y 25/24 kDa, mientras que el 15 % del grupo OP reconocen principalmente la fracción de 51 kDa y el 10% las fracciones de 25/24 kDa. En el caso de

el grupo P el 15% de los individuos reconocieron las fracciones de 25/24 kDa (tabla IVA). De tal forma, solo el grupo de AI resultó positivo (figura 13), ya que en el resto de los grupos el promedio de DO estuvo por abajo de la línea de corte (0.898 para la fracción de 51 y de 0.744 para las fracciones de 25/24 kDa). En este caso no se detectó ningún incremento en el reconocimiento de estas fracciones por los anticuerpos IgAs de los pacientes cuando se combinaron las tres fracciones (51 y 25/24 kDa). En cuanto al análisis estadístico de estos resultados se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de AI contra los grupos N, OP y P para ambas fracciones ( $p < 0.001$ ) mientras que en el caso del grupo de AHA al compararlo con estos grupos no se obtuvieron diferencias significativas ( $p = 0.54$  y  $0.34$ ) para las dos fracciones analizadas.

Por otro lado, la sensibilidad de estos ensayos de ELISA utilizando estas fracciones como Ag de captura mostraron una sensibilidad variable; así utilizando la fracción de 51 kDa en el caso del AHA se determinó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90 % en el caso de la detección de IgG específica en el suero de los pacientes estudiados, ya que en la detección de la IgAs específica en este mismo grupo se obtuvo una sensibilidad de 57% y una especificidad de 95%, en el caso del grupo de AI se obtuvo una sensibilidad de 70% y 65% en la detección de IgG e IgAs respectivamente con una especificidad del 90 y 95% respectivamente. En el caso de la detección de IgG serica para las fracciones de 25/24 kDa se determinó una sensibilidad del 73% para el grupo de AHA y del 76% para el grupo de AI con una especificidad del 90 y 95% respectivamente, mientras que para la detección de IgAs específica contra estas fracciones se determinó una sensibilidad del 65% para el grupo de AHA y del 70% para AI ambas con una especificidad del 95% .

Tabla IV. Comparación de la reactividad de los sueros de los pacientes contra las fracciones de 24/25 y 51 kDa por ELISA.

Paciente	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%
Fracción																				
51	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
N 24/25	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
O 51	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
P 24/25	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
P 51	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	25
24/25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	5
A 51	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	57
I 24/25	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	68
A 51	+	+	+	+	+	+	+	+												100
H 24/25	+	+	-	+	+	-	-	+												62
A																				

Tabla IV A. Comparación de la reactividad de las salivas de los pacientes contra las fracciones de 24/25 y 51 kDa por ELISA.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	%
Fracción																					
51	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
N 24/25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
O 51	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	15
P 24/25	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
P 51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
24/25	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	15
A 51	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	47
I 24/25	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	58
A 51	-	-	-	-	-	-	+	+													28
H 24/25	-	-	-	-	-	-	+	+													28
A																					

(-)Valores de DO por abajo de la línea de corte, (+) valores de DO por arriba de la línea de corte.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En cuanto a las dificultades que se presentaron durante los procesos de purificación, hay que tener en cuenta que nuestras proteínas, son de membrana y que estos extractos de membrana son altamente insolubles debido a su gran cantidad de carbohidratos, como lo demuestran Lawson y col.<sup>106</sup> quienes mencionan que los carbohidratos unidos covalentemente a las proteínas incrementan o disminuyen la solubilidad de éstas dependiendo del estadio de glicosilación, del tipo de proteína y la temperatura de trabajo. Por lo tanto nos vimos obligados a utilizar diferentes detergentes para facilitar la solubilidad del extracto, como es el caso del SDS que es uno de los mejores en solubilizar este tipo de proteínas, pero en nuestro caso también se sabe que este detergente es uno de los principales activadores de las proteasas amibianas,<sup>26,30</sup> de esta forma recurrimos al uso de otros detergentes que no son tan buenos disolventes y que además suelen interferir con la lectura de la densidad óptica, como es el caso del Tritón X-100. Por otro lado, ensayamos el Tween 80 que no interfiere con la DO, pero forma miscelas muy difíciles de disgregar que pueden interaccionar inespecíficamente con la resina de la columna.<sup>107</sup>

También las proteínas de membrana después de solubilizarse tienden a asociarse o agregarse existiendo un bloqueo de la resina soporte de la columna. La temperatura, el pH y la fuerza iónica son también importantes para la solubilización de membranas, sin embargo, se sabe que activan a las proteasas amibianas, quizás todos estos factores nos impidieron la obtención de nuestras fracciones por medio de la cromatografía.

En cuanto a la utilización de inhibidores de proteasas, es recomendable utilizarlos solo en las primeras fases de solubilización, ya que su actividad es de corta duración (30 min a 2 hrs) y utilizarlos durante todo el corrimiento implicaría la necesidad de renovarlos constantemente, lo que representaría una desventaja económica considerable y por si esto fuera poco sabemos que estos inhibidores no inactivan totalmente a las proteasas<sup>109</sup>

De esta manera se decidió llevar a cabo la obtención de estas fracciones de 51, 25 y 24 kDa por el método de electroelución, el cual es un procedimiento ampliamente



utilizado cuando se requieren de cantidades discretas de proteína, con el cual fué posible obtener cantidades adecuadas de las fracciones que nos permitieron su caracterización parcial.

En cuanto a la detección de carbohidratos asociados con estas fracciones antigénicas, detectamos que las fracciones de 25 y 24 kDa son glicoproteínas, esto nos sugiere que dichas fracciones están asociadas a las membranas<sup>109</sup>, además de que partimos de un extracto insoluble amibiano rico en membranas. Por otro lado, existe un recambio constante entre la superficie y las membranas internas de los trofozoítos amibianos y muchas de las enzimas proteolíticas de la amiba son secretadas al medio y solo una mínima parte de éstas son retenidas en la membrana.<sup>19,36,110</sup>

El hecho de que la fracción de 51 kDa no presente carbohidratos asociados nos sugiere que ésta podría ser una proteasa de secreción, o ser un producto de degradación de una proteasa mayor como ocurre frecuentemente en estos lisados durante la autoproteólisis.<sup>19,36,111,112</sup>

Por otro lado, la inmunización de conejos con estas fracciones nos muestra que son inmunogénicas, sin embargo, observamos una alta reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales contra otras fracciones del extracto, lo cual nos impidió el diseño de columnas de afinidad. No obstante, esta reactividad cruzada se reduce al tratar el Ag insoluble transferido a papel de NC con peryodato, lo cual nos indica que los carbohidratos intervienen directamente en la reactividad cruzada contra otras proteínas amibianas. Por otro lado, este fondo observado puede estar dado por anticuerpos que reconocen determinantes antigénicos de otras proteasas de cisteína, ya que se ha reportado una gran variedad de ellas en la amiba, con un rango de pesos moleculares que van desde 16 a 75 kDa. Estas proteasas presentan una homología en su ADN del 90% al menos para dos de los tres genes clonados para estas proteasas (ACP2 y el ACP3) que además presentan una identidad del 85% a nivel de aminoácidos<sup>20</sup> lo cual explicaría esta reacción cruzada.

También se determinó que las tres fracciones presentan actividad proteolítica al degradar la azocaseína, la IgG así como la hemoglobina y también presentan actividad gelatinolítica y colagenolítica y que probablemente pertenezcan a la familia de las

parásitos ya que también presentan una homología con las PC de *E. histolytica*.<sup>116</sup> Se ha detectado la presencia de anticuerpos de reacción cruzada en el caso de la superoxidodismutasa amibiana, la cual es reconocida por el suero de pacientes con varias enfermedades parasitarias no relacionadas con *E. histolytica*.<sup>117</sup>

Por otro lado, también se detectaron anticuerpos IgAs en saliva, principalmente en el grupo de pacientes con AI, esto nos muestra una clara regionalización de la respuesta inmune, ya que en la invasión intestinal se estimula principalmente la producción de la IgAs,<sup>118</sup> lo cual en el caso de la invasión extraintestinal no sucede, a pesar de haber cursado necesariamente por una etapa de invasión intestinal para dar lugar a una invasión de tipo extraintestinal, en este caso se estimula principalmente una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico del isotipo IgG,<sup>119</sup> cabe mencionar que esto sucede también en un buen número (68%) de los individuos con AI. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por otros investigadores por lo menos para el caso de los pacientes de AHA, en los cuales se ha detectado IgG dirigidos contra PC,<sup>40,41</sup> lo anterior nos indica la posible participación de estas proteasas en algunos de los mecanismos de patogenicidad amibiana, sin embargo, debemos mencionar que aunque nuestras fracciones inducen claramente una respuesta inmune secundaria a nivel intestinal (AI) y sistémico (AI y AHA) aún quedaría por definir que papel biológico tienen tales anticuerpos (IgG e IgAs).

Nuestros resultados muestran que la utilización de estas tres fracciones en un ensayo de ELISA provee un estudio sensible para la detección de IgG contra estas fracciones en los grupos de amibiasis invasora, AI y AHA con una sensibilidad del 83 y 100 % respectivamente y una especificidad del 90-95 %, lo cual nos permite claramente distinguir entre la presencia o no de la infección como sucede muy claramente en el caso de AHA.

En general se ha observado que la utilización de extractos crudos de l Ag amibiano en ensayos serológicos pueden tener una buena sensibilidad pero una menor especificidad como lo han demostrado Escandón y col.<sup>120</sup> utilizando un extracto insoluble de Ag amibiano para la detección específica de IgA en saliva de pacientes con amibiasis invasora, reportaron una sensibilidad de 94% y una especificidad de 83%. Así como, también Lotter y col.<sup>60</sup> Al comparar tres ensayos serológicos para la detección de anticuerpos anti-amibianos en un área endémica para la amibiasis, obtuvieron una

sensibilidad de 97% cuando utilizaron un extracto soluble amibiano, y de 86% cuando utilizaron un péptido recombinante (P1), y de 96 cuando utilizaron una fracción rica en membranas, con una especificidad de 62, 96 y 92 % respectivamente.

Por otro lado Stanley y col.<sup>121</sup> al analizar la reactividad en el humano con la proteína rica en serina (SREHP) de 46-52 kDa observaron una sensibilidad de 82% y una especificidad del 95% en pacientes con amibiasis invasora. También Flores y col.<sup>122</sup> utilizando una proteína de membrana de *E. histolytica* de 29 kDa obtuvieron una sensibilidad de 71% con una especificidad de 98% para pacientes de AHA.

Con respecto a la detección de la IgAs específica contra estas fracciones obtuvimos una menor sensibilidad, de 57% para el caso del grupo de AHA con una especificidad de 95%, para el grupo de AI obtuvimos una sensibilidad del 70% y una especificidad del 95% lo cual nos indica que la detección de anticuerpos IgAs no nos permite una clara diferenciación entre el grupo de AI y AHA, quizás debido al bajo número de pacientes de AHA(8) comparado con el de AI (19), sin embargo, es importante subrayar que la detección de la IgAs principalmente en el grupo de AI nos muestra una clara regionalización de la respuesta inmune contra estas fracciones. El hecho que nosotros no detectemos anticuerpos IgAs en la saliva de los pacientes de AHA contra estas fracciones nos indica que éstas estimulan principalmente una respuesta a nivel local, probablemente porque intervienen en las primeras etapas de invasión de las mucosas y posteriormente cuando el parásito ha salido del intestino éstas inducen preferentemente una respuesta de anticuerpos sistémicos.

Las estrategias de trabajo anteriormente expuestas nos permitieron purificar y caracterizar biológica e inmunológicamente a tres fracciones antigénicas que con anterioridad se habían perfilado como fracciones de *E. histolytica* útiles en el diagnóstico serológico de AI aguda,<sup>81</sup> sin embargo, en este trabajo pudimos hacer un análisis más extenso de sus posibilidades en la diferenciación de las distintas formas de infección amibiana: AI, AHA, P, corroborando no solo lo que anteriormente habíamos obtenido, sino además encontramos otras utilidades no exploradas, tal es el caso del reconocimiento de la fracción de 51kDa por anticuerpos séricos IgG en el 100% de pacientes con AHA estudiados.

También, la compartimentalización de la respuesta inmune en individuos con AI, representada por la presencia de anticuerpos IgAs en la saliva de los pacientes con AI, en contraste claro con lo que sucede en los casos de AHA, es otro de los hallazgos que ofrecen nuevos caminos y rutas en el estudio de la respuesta inmune en esta infección.

Por otro lado, definir la participación de los anticuerpos secretores dirigidos contra estas PC como un mecanismo de resistencia a la invasión o reinfección es otro de los desafíos para un futuro inmediato.

No obstante, no podemos asegurar que estas fracciones sean proteínas individuales o que esten constituidas por más de una proteína lo cual se determinará posteriormente, así como tampoco podemos asegurar que nuestras fracciones con actividad proteolítica sean diferentes o iguales a las PC ya purificadas y clonadas, como es el caso de la PC de 56 kDa,<sup>28</sup> y la Amebopaina (22-27 kDa)<sup>25</sup> sin embargo en este trabajo se cumplieron los objetivos planteados, determinando que estas fracciones constituyen antígenos relevantes y que podrían tener una utilidad diagnóstica y seroepidemiológica.

## CONCLUSIONES

Las fracciones de 25 y 24 kDa son glicoproteínas, mientras que la de 51 kDa no presenta carbohidratos asociados.

Las tres fracciones presentan actividad proteolítica sobre la azocaseína, así como actividad colagenolítica y gelatinolítica.

Las tres fracciones podrían pertenecer a la familia de Proteasas de Cisteína ya que fueron inhibidas específicamente por el pHMB, la IA y el E-64.

Las tres fracciones son altamente inmunogénicas y capaces de inducir una respuesta inmune sistémica en los conejos inmunizados.

Las tres fracciones nos permiten mediante ELISA detectar al 80% de individuos con AI con una especificidad de 95%, como se había reportado previamente.

Se observó que la utilización de la fracción de 51 kDa en un ELISA nos permite la caracterización del 100% de pacientes con AHA con una especificidad de 90%.

La detección de IgAs en saliva específica contra estas fracciones en el grupo de pacientes de AI nos permite la identificación de una compartimentalización de la respuesta inmune dirigida contra estas fracciones.

Al detectar Ab (IgG e IgAs) contra las fracciones de 51, 25 y 24 kDa en el suero y la saliva de los pacientes de AI y AHA y el hecho de que estas fracciones presentan actividad proteolítica, nos sugiere que pueden ser antígenos con importancia biológica.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Boletin Epidemiológico OMS/OPS/UNESCO. Consulta con expertos en amebiasis, Ciudad de México, D.F. 1997: **18** (1);13.
- 2.-Rubin E., Farber J., Amebiasis (*Entamoeba histolytica*). In: Infectious and parasitic diseases, Pathology. 1990. pp. 414.
- 3.-Guerrant R. 1986, The global problem of amebiasis: current status, research need, and opportunities for progress. Rev Infect Dis, 1986: **8**;218.
- 4.-Pérez-Tamayo, R. Patología de la amebiasis. En Martínez-Palomo, A, (ed), AMIBIASIS, Medica Panamericana, México, 1989. pp. 42.
- 5.-González G., Gutiérrez G. Reducción de la letalidad por absceso hepático amebiano. Experiencia de un hospital pediátrico mexicano. Arch Invest Méd, (México). 1986. **17** (supl 1):341.
- 6.- Flores-Barroeta F., saavedra R., Velazco F. Invasión de *E. histolytica* a diversos órganos y tejidos en sujetos humanos. Arch Invest Méd (Méx) 1970:1 (Supl. 1);129.
- 7.-Sepúlveda B.B. Amebiasis: Host-pathogen biology. Rev Infect Dis, 1982: **4**;836.
- 8.-Sistema Nacional de Salud. Boletin Mensual de Epidemiología. 1993; **8** (11): 172.
- 9.-Caballero-Salcedo A., Viveros M., Salvatierra B., Tapia R., Sepúlveda-Amor J., Gutierrez G., Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 1994: **50**; 412.
- 10.-Warren K. Foreword in Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, New York. 1988. pp. 79.
- 11.-Brumpt, E. Etude sommaire de l' *Entamoeba dispar* sp. amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l' homme. Bull Acad Med (Paris) 1925; **94**: 943. In Martínez-Palomo A.(ed) AMIBIASIS, Medica panamericana. Mexico 1989.
- 12.-Diamond L. S., Clark C.G., A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudin, 1903 (Emended Walker 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brump, 1925. J Eukar Microbiol. 1993; **40**: 340.
- 13.-Haque R., Neuville L M., Hanh P., Petri WA. Rapid diagnosis of *E. histolytica* infection using the *E. dispar* *E. histolytica* stool antigen. J Clin Microbiol. 1995; **33**:2550.
- 14.-Clarck CG., Diamond LS: Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol. 1991;**49**:297.

- 15.-Navarrete-Espinoza J., Navarrete-Cadena E., Escandon-Romero C., Escobedo de la Peña J. Prevalencia de parasitosis intestinal en la población infantil de Santiago Jamiltepec Oaxaca. *Rev Med IMSS (Méx)*.1993; **31**: 157.
- 16.-Treviño-García., Manzo N., Escandon-Romero C., Escobedo de la Peña J., Hernández-Ramos JM., Fierro-Hernández H. Amibiasis in the epidemiologic transition in Mexico its morbidity and mortality trends in the IMSS. *Arch Med Res*. 1994; **25**:393.
- 17.-Ravdin JI.Pathogenesis of disease causable of *E. histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis*. 1986; **8**:247.
- 18.-Hidalgo ME., Hernández A., Keene W., McKerrow JH. Orozco E. Relación directa entre secreción de enzimas proteolíticas y virulencia en *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 1990.**21**;(Supl 1):133
- 19.-Avila EE., Calderón J. *Entamoeba histolytica*: A surface associated cysteine proteasas. *Exp Parasitol*. 1993; **76**:232.
- 20.-McKerrow JH., Sun E., Rosenthal PJ., Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*.1993; **47**: 821.
- 21.Redd SL., Keene WE., McKerrow JH., Gigli I. Cleavage of the C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol*. 1989; **143**: 189.
- 22.-Kelsall BL.- Ravdin JI. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *J Infec Dis*. 1993; **168**:1319.
- 23.-Herdman SD., Tran V., Torian B., Reed SL. Cleavage of IgG by the neutral cysteine protease of *E. histolytica* . *Arch Med Res*. 1997; **28**: (Supl 1):178.
- 24.-Luaces AL., Barrett AJ. Affinity purification and biochemical Characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *E. histolytica*. *Biochem J*. 1988; **250**:903.
- 25.-Scholze H. Schulte W. On the specificity of a cisteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biochem Acta*. 1988; **47**:115.
- 26.-Montfort I., Pérez-Tamayo R., Pérez-Montfort R., González-Canto A., Olivos A. Purification and immunologic characterization of 30 kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*. 1994; **80**:607.
- 27.-Lushbaugh WB., Hofbauer AF., Pittman FE. *E. histolytica*: Purification of cathepsin-B. *Exp Parasitol*. 1985; **59**:328.
- 28.-Keene WE., Petitt MG., Allen S., McKerrow JH The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*. 1986; **163**: 536.

- 29.-Spinella S., Petek F., Gayral Ph., Rigotherier MC. A novel cysteine protease in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res (Méx). 1997; **28**:180.
- 30.-Navarro-García F., Chávez-Dueñas L., Tsutsumi V., Posadas del Río F., López-Revilla R. *Entamoeba histolytica*: Increase of enterotoxicity and of 53 and 75 kDa Cysteine Proteinases in a clona of higher virulence. Exp Parasitol. 1995; **80**:361.
- 31.-Scholze H., Löhden-Bedinger U., Muller G., Bakker-Gunwald T. Subcellular distribution of amebapain the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1992; **23**: 105.
- 32.-Ostoa-Saloma P., Cabrera N., Becker I., Pérez-Montfort R. Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. Mol Biochem Parasitol. 1989 ;**32**:133.
- 33.-Becker I., Pérez-Montfort R., Pérez-Torres A., Rondán-Zarate A., Montfort I., Pérez-Tamayo R. *Entamoeba histolytica*: localization of 30 kDa cysteine proteinase using a monoclonal antibody. Exp Parasitol. 1996;**82**:171.
- 34.- De Meester F., Shaw E., Scholze H., Stolarsky T., Mirelman D. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nopathogenic *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 1990; **58**: 1396.
- 35.-Gadasi H., Kobiler D. *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. Exp Parasitol 1983; **55**:105.
- 36.-Reed SL., Keene WE., McKerrow JH. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *E. histolytica*. J Clin Microbiol. 1989; **27**:2772.
- 37.-Stanley SL., Zhang T., Rubin D., Li E. Role of the *E. histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. Infect Immun. 1995; **63**:1587.
- 38.-Becker I., Pérez-Tamayo R., Monfort I., Alvizuri AM., Pérez-Monfort R. *Entamoeba histolytica*: Role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. Exp Parasitol. 1989;**67**:268.
- 39.-Monfort I., Pérez-Tamayo R., González-Canto A., Garcia de León Ma C., Olivos A., Tello E. Role of cysteine proteinases of *E. histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. J Parasitol. 1993; **79**:98.
- 40.-Osorio LM. Circulating antibodies to histolysin, the major cysteinase of *Entamoeba histolytica* in amoebic liver abscess patients. Parasitology. 1992; **105**:207.
- 41.-Rangel A., Spinella S., Urdaneta H., Gayral Ph. Rigotherier MC. *Entamoeba histolytica* 60 kDa cysteine proteinase and its relationship with the humoral immune response. Arch Med Res. 1997; **28**:262.

ESTA TESIS DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- 42.-Trissl D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. Rev Infect Dis. 1982; 4; 1154.
- 43.-Del Muro R., Acosta E., Merino, E., Glender W., Ortiz-Ortiz L. Diagnosis of *E. histolytica* using salivary IgA antibody detection. J Infect Dis 1990; 162;1360.
- 44.-Acosta G., Barranco, C., Isibasi A., Campos R. Excreción de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoitos de *E. histolytica*. Arch Invest Méd. (Méx) 1982;13,(Supl 3);51.
- 45.-Ramos F., Valenzuela O., Morán P., González E., Ramiro M., Cedillo R., Martínez Ma C., Gómez A., Muñoz O., Melendro EI, Ximénez C. Anti-*E. histolytica* IgA antibodies in saliva of *E. histolytica* or *E. dispar* infected individuals: longitudinal study of cohorts. Arch Med Res. 1997;28:327.
- 46.-Ortiz-Ortiz L., Samacona G., Sepúlveda B., Capin NR. Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin Immunol Immunopathol. 1975; 4:127.
- 47.-Kretschmer RR. Immune phenomena in amebiasis: Surv Immunol Res. 1984; 3:1.
- 48.-Ganguly NK., Mahajan RC., Sharma S., Chandanani RE., Gupta Ak. Dutta DV. Cellular reactions to amebic antigen in invasive amoebiasis: a preliminary communication. Indian J Med Res. 1979; 69:412.
- 49.-Salata RA., Ravdin JI. A review of the human immune mechanisms directed against *E. histolytica*. Rev Infect Dis. 1986;8:261.
- 50.-Dramstein T., Klos M., Gold D., Hanh H. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for murine lymphocytes. Immunology .1980;41:347.
- 51.-Salata RA., Cox JG., Ravdin JI. The killing of virulent *Entamoeba histolytica* trophozoites by fitohemagglutinin-elicited cytotoxic T-lymphocytes. Clin Res 1984; 32:365.
- 52.-Ghadirian E., Meerovitch E. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. Parasite Immunol. 1982; 4:219.
- 53.-Ghadirian E., Meerovitch E., Kongshaun PAL. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. Infect Immun. 1983, 42:1017.
- 54.- Ghadirian E., Kongshaun PAL. Effect of silica on resistance of mice to *E. histolytica* infection. Infect Immunol. 1984; 45:399.
- 55.-Martínez-Palomo A., Murphy CF., Canales L., Segovia E., Ravdin JI. Patients treated amebic liver abscess develop a cell mediated immune response. J Immunol. 1986; 136:2633.
- 56.-Scott P., Kaufman SHE. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. Immunol Today. 1991; 12:346.

- 57.-Talamas-Rohana P., Schlie -Guzmán MA., Hernández VI., Rosales-Encina JL. T-cell suppression and selective *in vivo* activation of T-h2 subpopulation by *E. histolytica*. Infect Immun. 1995; **63**:3953.
- 58.-Canales L., Treviño N., Segovia E., Salata RA., Martínez-Palomo A., Murray HW. Amebic liver abscess developed cell-mediated immune response effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. J Immunol. 1986;**136**:1.
- 59.-Krupp IM., Antibody response in intestinal and extraintestinal amoebiasis. Am J Trop Med Hyg. 1970; **19**:57.
- 60.-Lotter H., Jackson TFHG., Tannich E., Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies sera of patients from an area endemic for amoebiasis. Trop Med Parasitol. 1995;**46**:180.
- 61.- Shaalan M., Baker RP. Detection of coproantibodies in amoebiasis of the colon: a preliminary report. Am J Clin Pathol. 1970; **54**:615.
- 62.-Mahajan RC., Agarwae SC., Chuttani PN. Coproantibodies in intestinal amoebiasis. Indian J Med Res. 1972; **60**:547.
- 63.-Sharma P., Krishna-Prasad BN., Dutta GP., Coproantibodies in intestinal amoebiasis using axenic *E. histolytica* antigen. Indian J Med Res. 1978; **68**:243
- 64.-Ximénez C., Hernández J., Melendro EI, Ramiro M., Coproanticuerpos y anticuerpos séricos antiamebianos en la amoebiasis intestinal aguda. Arch Invest Méd (Méx) 1990;**21** (Supl 1):239.
- 65.-Grundy MS., Cartwright-Taylor L., Lundin L., Huldt G. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. J Clin Microbiol. 1983;**17**:753.
- 66.-Acosta G., Cote V., Isibasi A., Kumate J. Anticuerpos anti- *E. histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. Inmunologia. 1985; **4**:24.
- 67.-Sepúlveda B., Martínez-Palomo A. Immunology of amoebiasis produced by *E. histolytica*. In : Cohen S. y Warren K. (eds). Immunology of Parasitic Infections 2a ed. Blackwell Scientific publications, Oxford. 1982;170 p.
- 68.- Norman C., Gold D., Kagan Y. The serologic response of hamsters to experimental liver inoculation with *E. histolytica* as measured by indirect hemmagglutination test and enzyme linked immunoabsorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 1979 **28**: 198.
- 69.-Lin T., Halbert S., Chiu C., Zarco R. Simple standardized enzyme linked immunoabsorbent assay for human antibodies to *E. histolytica*. J Clin Microbiol. 1981;**13** 646.

- 70.-Gandhi B., Irshad M., Chawla T. Enzyme linked protein-A an ELISA for detection of amebic antibody. Trans. R Soc Trop Med Hyg. 1987; 81:183.
- 71.-Ungar B., Yolken R., Quinn T. The use monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *E. histolytica* in fecal specimens. Am J Trop Med Hyg. 1985;34:405.
- 72.-Healy GR. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. Rev Infect Dis. 1986; 8:239.
- 73.-Diamond C., Harlow D., Cunnick C. A new medium for axenic cultivation of *E. histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72:431.
- 74.-Das P., Sengupta K., Pal S., Das D., Pal SC. Biochemical and immunological studies on soluble antigens of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 1993; 79: 365.
- 75.-Sawhney S., Chakravarti N., Jain P., Vinayak K. Immunogenicity of axenic *E. histolytica* antigens and its fractions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980; 74:26.
- 76.-Acosta H., Muñoz ML., Calderón J. Caracterización de moléculas superficiales de *E. invadens*. Arch Invest Med. (Méx) 1978; 1: 175.
- 77.-Chang SM., Lin CM., Dusanic DG., Cros JH. Antigenic analysis of two axenized strains of *E. histolytica* by two dimensional immunoelectrophoresis. Am J Trop Med Hyg. 1979; 20:845.
- 78.-Krupp IM., Definition of the antigenic pattern of *E. histolytica* and immunoelectrophoretic analysis of patients response to amebic disease. Am J Trop Med Hyg. 1977; 26:387.
- 79.-Ali-Khan Z., Merovitch E. Studies of the purification of *Entamoeba histolytica* antigen by gel filtration . Can J Microbiol. 1970; 16:485.
- 80.-Aust-Kettis A., Thorstensson R., Utter G. Antigenicity of *E. histolytica* strain NIH:200: a survey of clinically relevant antigenic components. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32:512.
- 81.-Ximénez C., Sosa O., Leyva O., Morán P., Melendro EI. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. Ann Trop Med Parasitol. 1992; 86: 121.
- 82.-Myung K., Buech D., Jackson T., Stanley S.Jr. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *E. histolytica* antigen-based ELISA. Arch Med Res. 1992; 23: 285.
- 83.-Arroyo R., Orosco E. Localization and identification of adhemiba, a protein wichs participates in the adhesion of *Entamoeba histolytica* to human erythrocytes and epithelian cells. Arch Invest Méd (Méx) 1986;17 (Supl 1): 135.

- 84.- Chadee K., Petri WA., Innes DJ., Ravdin JI. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Clin Invest. 1987; 80: 1245.
- 85.-Orozco E., Arroyo R., Rodríguez MA., García-Rivera G. Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion deficient-mutants and monoclonal antibodies. In Molecular strategies of parasitic invasion. Agabian N, Goodman H, Nogueira E. (Eds) Alan R, Liss Inc. New York. 1987; 531.
- 86.-Ravdin JI., John JE., Johnston LI., Innes DJ., Guerrant RL. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. Infect immun. 1985 ; 48: 292.
- 87.-Rosales-Encina JL., Meza I., López de León A., Talamás-Rohana P., Rojkind M. Isolation of 220 kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. J infect Dis. 1987; 156: 790.
- 88.-Salata RA., Ravdin JI. N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis. 1985; 151: 816.
- 89.-Meza I., Cázares F., Rosales-Encina JL., Talamás-Rohana P., Rojkind M. Use of antibodies to characterize a 220 kilodaltons surface protein from *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis. 1987; 156 (5): 798.
- 90.-Isibasi A., Santa Cruz M., Ramírez A., Kumate J. Inmunoquímica de una lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9: NIH cultivado en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. Arch Invest Méd. (Méx). 1982; 13:51.
- 91.-Isibasi A., Santa Cruz M., Soto-Montaña X., Ramírez A., Kumate J. Localización en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de una lipopeptidofosfoglicana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. Arch Invest Méd. (Méx) 1982; 13(Supl 3):57.
- 92.-Treviño-García N., Feria-Velasco A., Ruiz de Chávez Y., De la Torre M. Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx). 1980; 11(supl 1). 179.
- 93.-Sánchez ME., Martínez-Palomo A. Inducción de inmunidad anti*amibiana* en primates subhumanos con antígeno lisosomal de *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Méd (Méx). 1980; 11(Supl 1):247.
- 94.-Johnson W. Ribosomal Vaccines 1. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersenia pestis*. Infect Immun. 1972; 3: 947.
- 95.- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248.
- 96.-Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680-685.

- 97.-Hunkapiller MW., Lujan E., Ostrader F., Haad CE. Isolation of microgram quantities of protein from polyacrylamide gels for aminoacid sequence analysis. *Methods Enzimol.* 1983;91:227.
- 98.- Hudson L., Hay CF. Isolation and structure of immunoglobulins. in: *Practical Immunology.* Blackwell Scientific Publications. 1989. pp 281.
- 99.-Lee Ch., Levin A., Branton D. Cooper Stainig: a five-minutes protein stain for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1987; 166: 308.
- 100.-Scholze H., Tanich E. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzimol.* 1994; 224: 512.
- 101.-Pérez-Monfort R., Ostoa-Saloma P., Velazquez-Medina L., Montfort I., Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;26:87.
- 102.-Sagrest, J.P; Jackson, R.L. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate. *Methods Enzimol*, 1972, 28: 54.
- 103.-Woodward MP., Young WW., Bloodgood RA. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J Immunol Methods.* 1985;78:143.
- 104.-Towbin, H; Staehelin, T; Gordon, G. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulosa sheets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979, 76: 4350.
- 105.-Elson OC., Ealding W., Lefkowitz J. A lavage technique allowing repeated measurements of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J Immunol Methods.* 1984;67:101.
- 106.-Lawson EQ., Hedlun BE., Ericson ME., Mood DA., Litman GW., Middaugh R. Effect of carbohydrate on protein solubility. *Arch Biochem Biophys.* 1983; 220:572.
- 107.-Neugebauer JM. Detergents: an overview. *Methods Enzimol.* 1990; 182:239.
- 108.-Hjelmeland ME. Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzimol.* 1990;182: 253.
- 109.-Beynon JR., Salvesen G. (ed) *Proteolytic enzymes A Practical approach.* IRL-Pres. Inglaterra. 1989,pp .
- 110.- Aley SB., Scott WA., Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* 1980;152:391.

- 111.-López-Revilla R., Bermudez-López C., Chaves -Dueñas L. Preservation of cysteine proteinases and other *Entamoeba histolytica* proteins from autoproteolysis. Arch Med Res. 1997;**28**:103.
- 112.-Torres-Padilla ME., Carrero JC., Ortiz-Ortiz L. A 148 kDa secretory proteinase from *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 1997;**28**:186.
- 113.-Tanich E., Scholze H., Nickel R., Horstman RD. Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nopathogenic *E. histolytica*. J Biological Chem. 1991;**266**:4798.
- 114.-Reed SL., Bouvier J., Hirata K., Que X., Pollack AS., Engel JC., Guollin F., McKerrow JH: A unique cysteine proteinase gene of pathogenic *Entamoeba histolytica* correlations with virulence. Arch Med Res. 1992;**23**:181.
- 115.-Jackson TFHG., Gathiram V., Simjee AE. Seroepidemiological study of antibody response to the zimodemes of *E. histolytica*. Lancet i. 1989:716.
- 116.-Eakin AE., Bouvier J., Sakanari JA., Craik Ch S., McKerrow JH. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. Mol Biochem Parasitol. 1990;**38**:1.
- 117.-Bruchhaus Y., Brattig NW., Tannich E. Recombinant expression purification and biochemical characterization of superoxide dismutase of *E. histolytica*. Arch Med Res. 1992;**23**:27.
- 118.-Aceti A., Dennica A., Celestino D., Caferro M., Levi O., Catalini N. Salivary IgA antibody detection in invasive amebiasis in asymptomatic infection. J Infect Dis. 1991; **164**: 613.
- 119.-Ximénez, C; Leyva,O; Morán, P; Ramos, F; Melendro, E.I. *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. Ann Trop Med Parasitol. 1993;**87**:31.
- 120.-Escandón RC., Gómez H JC., Soto CJ., Ramos JM., Olvera AJ. Detection of anti-*Entamoeba histolytica* IgA salivary antibodies: Evaluation of its diagnostic capability in a rural setting. Arch Med Res. 1997;**28**:306
- 121.-Stanley S Jr., Serodignosis of invasive amebiasis using a recombinant *E. histolytica* protein. JAMA. 1991; **266**: 1984.
- 122.-Flores MB., Reed SL., Ravdin JI., Torian BE. Serologic reactivity to purified recombinant and native 29-kDa peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol. 1993; **31**:1403.