



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
CAMPUS IZTACALA**

**PROTECCIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO  
AMIBIANO MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES  
EN HÁMSTERES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE  
CON TROFOZOÍTOS DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

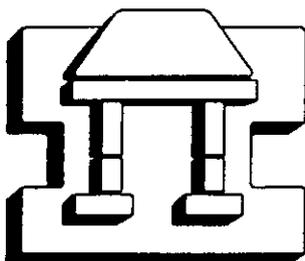
**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**NORMA SANJUAN RODRÍGUEZ  
JOSÉ JUÁN VÁZQUEZ HERNÁNDEZ**

TUTOR:

**M. EN C. MARÍA DEL ROSARIO GONZÁLEZ VALLE**



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo del Dr. Jesús Calderón Tinoco.**

## AGRADECIMIENTOS

- Agradecemos de manera especial a la M en C. María del Rosario González Valle por apoyarnos en la culminación de este proyecto. Así como a su valiosa amistad durante estos últimos años y desearle suerte en los proyectos que está por concluir.
- Al Dr. Jesús Calderón por darnos un espacio en su laboratorio para la realización de este trabajo, así como a sus valiosas pláticas llenas de enseñanzas para entender el papel de un Investigador.
- Al Dr. Jesús Serrano por habernos dedicado parte de su tiempo para la revisión de este trabajo así como a sus comentarios y críticas.
- A la futura Dra. Laura Rivero por esa valiosa amistad y por los momentos buenos y malos que siempre fueron un aliciente para llegar a las metas propuestas, te deseamos lo mejor.
- A las Auxiliares de Investigación: Biol. María Luisa Labra Barrios y a la QFB. Silvia Galindo Gómez por su asistencia metodológica para la realización de este proyecto, así como a su gran amistad.
- A los Técnicos de Laboratorio: María Yolanda Sánchez Chávez y Celso Sánchez Islas por la preparación del material del laboratorio.
- De manera especial a nuestros amigos: Angélica, Miriam y Jerónimo; a los compañeros de siempre: Luis, Aldo, Ramón, Jorge, Omar, Gabriel y Yolanda.

## INDICE

RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN	
a) <i>Introducción</i> .....	1
b) <i>Antecedentes</i> .....	6
c) <i>Justificación</i> .....	11
1 OBJETIVOS.....	13
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
a) <i>Cultivos celulares:</i>	
- <i>Entamoeba histolytica</i> (HM1:IMSS).....	15
- Línea celular de hepatocitos humanos (HepG2).....	15
b) <i>Obtención y purificación de los anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana de E. histolytica.</i>	
- Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.....	16
- Producción del líquido ascítico en ratones Balb/c.....	16
- Purificación de los anticuerpos monoclonales con Sulfato de Amonio.....	16
c) <i>Anticuerpos policlonales de conejo anti-IgG de ratón marcados con fluoresceína o biotina.</i>	
- Obtención y purificación de IgG de conejo anti-IgG de ratón.....	17
- Marcaje con isotiocianato de fluoresceína.....	18
- Marcaje con <i>N</i> -hidroxisuccinimida derivada de la biotina.....	18
d) <i>Tinción celular de trofozoítos por Inmunofluorescencia indirecta.</i>	
- Tratamiento para amibas fijadas.....	19
- Tratamiento para amibas sin fijar.....	20

e) Prueba de ELISA .....	20
f) Ensayo de inhibición de la adhesión de amibas a hepatocitos	
- Prueba experimental.....	21
- Prueba para controles.....	22
- Tinción celular de amibas y hepatocitos.....	22
g) Modelo del absceso hepático amibiano en hámster	
- Porcentaje de lesión.....	24
- Análisis histológico.....	24

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

a) Reconocimiento de proteínas de superficie de <i>E. histolytica</i> por anticuerpos monoclonales utilizando microscopia de fluorescencia y confocal.....	26
b) Reconocimiento de las proteínas recombinantes 170CR y SREHP de <i>E. histolytica</i> por anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana.....	33
c) Inhibición de la adhesión de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> a hepatocitos humanos mediante anticuerpos monoclonales.....	37
d) Valoración del papel protector de dos anticuerpos monoclonales anti-adhesinas de <i>E. histolytica</i> , en el daño hepático amibiano en hámster	
- Porcentaje de protección.....	49
- Análisis histológico de las lesiones hepáticas.....	56

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
--------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>
--------------------------	-----------

<b>APÉNDICE.....</b>	<b>71</b>
----------------------	-----------

<b>GLOSARIO.....</b>	<b>75</b>
----------------------	-----------

## RESUMEN

La amibiasis es una de las enfermedades que causan el mayor índice de mortalidad en todo el mundo. La infección es producida por la ingestión de quistes de *Entamoeba histolytica* y su posterior colonización en la mucosa intestinal en forma de trofozoíto. En infecciones muy severas el trofozoíto atraviesa la barrera intestinal e invade al hígado, provocando abscesos hepáticos amibianos que pueden llevar a la muerte del paciente. La capacidad de invadir y provocar daño a los tejidos, puede atribuirse a varios factores que han sido agrupados dentro tres eventos principales: 1) adhesión, 2) lisis y 3) fagocitosis de la célula blanco. Dentro de estos, la adhesión es un factor indispensable para llevar acabo el daño celular. Este mecanismo es mediado por adhesinas de la amiba, entre las que destacan las adhesinas de 260kda (inhibida por Gal/GalNac) y de 47-52kDa (SREHP) por su importancia en los mecanismos de virulencia de la amiba. La adhesina de 260kDa es un heterodímero formado por una subunidad pesada de 170kDa y una subunidad ligera de 35kDa. Dentro de la subunidad pesada se ha definido un dominio rico en cisteínas (649-1208 aminoácidos) que media la adhesión e inhibe el complemento (denominada 170CR). Este dominio se fusionó con la secuencia genética de la proteína Glutation S transferasa (GST) obteniendo la proteína recombinante 170CR/GST. La adhesina SREHP es una molécula de superficie con una región extracelular rica en serinas (52 de 233 aminoácidos), octapéptidos y dodecapéptidos repetidos en tandem. Parte de la secuencia genética de SREHP ha sido fusionada a la proteína Antranilato sintetasa (TrpE) dando origen a la proteína recombinante SREHP/TrpE. Hasta la fecha se ha reportado que la inmunización con ambas proteínas puede prevenir el desarrollo del absceso hepático amibiano en animales infectados experimentalmente, sin embargo, todavía no se han determinado los epitopos relevantes de estas adhesinas y los mecanismo que activan la citotoxicidad celular dependiente de contacto. Por lo que el objetivo de este trabajo fue seleccionar a los anticuerpos monoclonales que reconocen a las dos adhesinas principales y determinar si

bloquean la adhesión celular y la formación del absceso hepático amibiano en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos, mediante inmunización pasiva. Logramos seleccionar 12 anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas de membrana externa de *E. histolytica*. De los cuales, 3 reconocieron a la proteína recombinante 170CR/GST (C5E1, 3D7E5 y C4C2) y 3 a la proteína recombinante SREHP/TrpE (C9F10, C11E11 y C16D3). En la prueba de adhesión, los anticuerpos monoclonales C5E1 y C4C2 anti-170CR y los anticuerpos monoclonales C9F10, C11E11 y C16D3 anti-SREHP bloquearon la adhesión de los trofozoítos a hepatocitos humanos de manera significativa, por lo que los anticuerpos C5E1 (170CR/GST) y C9F10 (SREHP/TrpE) fueron considerados para determinar su papel protector en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica*. La inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal C9F10 inhibió la formación del absceso hepático amibiano en el 80% de los animales infectados mientras que el anticuerpo C5E1 inhibió la formación del absceso hepático en el 50% de los animales infectados.

## INTRODUCCIÓN

La amibiasis es producida por el protozooario-parásito *Entamoeba histolytica*, el cual se estima que infecta a 50 millones de personas en el mundo y cerca del 10% desarrollan la enfermedad. Esta enfermedad produce 50 mil muertes por año, siendo la tercera causa de muerte por infecciones de parásitos después de la malaria y esquistosomiasis (Walsh, J., 1988). La prevalencia de la infección por *E. histolytica* es más frecuente en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y de excretas, este factor es preponderante para que los países subdesarrollados en América Latina mantengan una tasa elevada de la infección (OMS, 1997).

La amibiasis en México es considerada un problema de salud, se estima que aproximadamente el 8.4 % de la población ha estado expuesta a la amibiasis, resultando en 1 millón de casos de amibiasis y 1,216 muertes (Caballero y cols., 1994). En un estudio reciente llevado a cabo por el Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica se reportaron en el año 2000 aproximadamente 1,159,000 casos de amibiasis intestinal y 5,700 casos de absceso hepático amibiano (SUIVE, 2000).

La amibiasis es diagnosticada principalmente por la identificación de parásito en las heces ó mediante un exudado. Sin embargo, puede existir confusión en el diagnóstico debido a que en el tracto gastrointestinal se encuentran presentes un gran número de especies de *Entamoeba* no patógenas (*E. dispar*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis* y *E. polecki*) entre las que destaca *E. dispar* por presentar características morfológicas y genéticas similares a *E. histolytica*. Recientemente *E. dispar* ha sido considerada como la especie no patógena ya que no esta asociada con los síntomas gastrointestinales, ni con la amibiasis invasiva en los diferentes pacientes estudiados, mientras que *E. histolytica* es considerada la especie patógena y el agente etiológico de la colitis amibiana y de abscesos hepáticos amibianos (Petri y cols., 1993).

La amibiasis es iniciada cuando la forma de quiste del protozoario parásito *E. histolytica* es ingerido en alimentos y agua contaminada, en este estado el quiste es transportado hasta el intestino delgado donde se desenquista hacia la forma de trofozoíto gracias a la acción del jugo gástrico y los ácidos biliares; los trofozoítos que son liberados en el intestino delgado migran hasta el colon adhiriéndose al moco colónico y a la lámina epitelial donde crecen, se multiplican y re-enquistan para ser liberados junto con las heces y continuar un nuevo ciclo de infección (Figura 1). En el colon los trofozoítos pueden comportarse como comensales inofensivos cursando con una infección asintomática similar a la producida por *E. dispar* pero bajo ciertas circunstancias como el decline en la inmunidad del hospedero o el cambio en la flora bacteriana del intestino se puede favorecer que la amiba invada la mucosa intestinal (Martínez-Palomo, A., 1993). En general, la propagación posterior de la enfermedad ocurre por extensión directa desde el hígado hasta la pleura, pulmón derecho y pericardio. En casos más graves se da la destrucción del tejido muscular con perforación, provocando la diseminación de las amibas a través del torrente sanguíneo hacia el hígado con mayor frecuencia, provocando los llamados abscesos hepáticos (Brown y Neva, 1983).

Esta capacidad de invadir y provocar daño a los tejidos puede atribuirse a varios factores que han sido analizados con profundidad. La invasión de la mucosa intestinal por *E. histolytica* es un proceso activo mediado por el parásito y pueden ser reconocidos tres eventos principales: adhesión, citotoxicidad y fagocitosis. 1) La adhesión de la amiba a la célula blanco es el primer paso en la producción del daño. En este primer evento participan proteínas de superficie de la amiba denominadas adhesinas que reconocen a carbohidratos presentes en la célula blanco, ya que en presencia de ciertos monosacáridos como Galactosa ó *N*-Acetil-D-Galactosamina se inhibe la adhesión y se disminuye el daño celular. (Ravdin y Guerrant., 1981). 2) Después de la adhesión y el reconocimiento se ha observado que la amiba inmediatamente produce daño sobre la superficie celular mediante la libera-

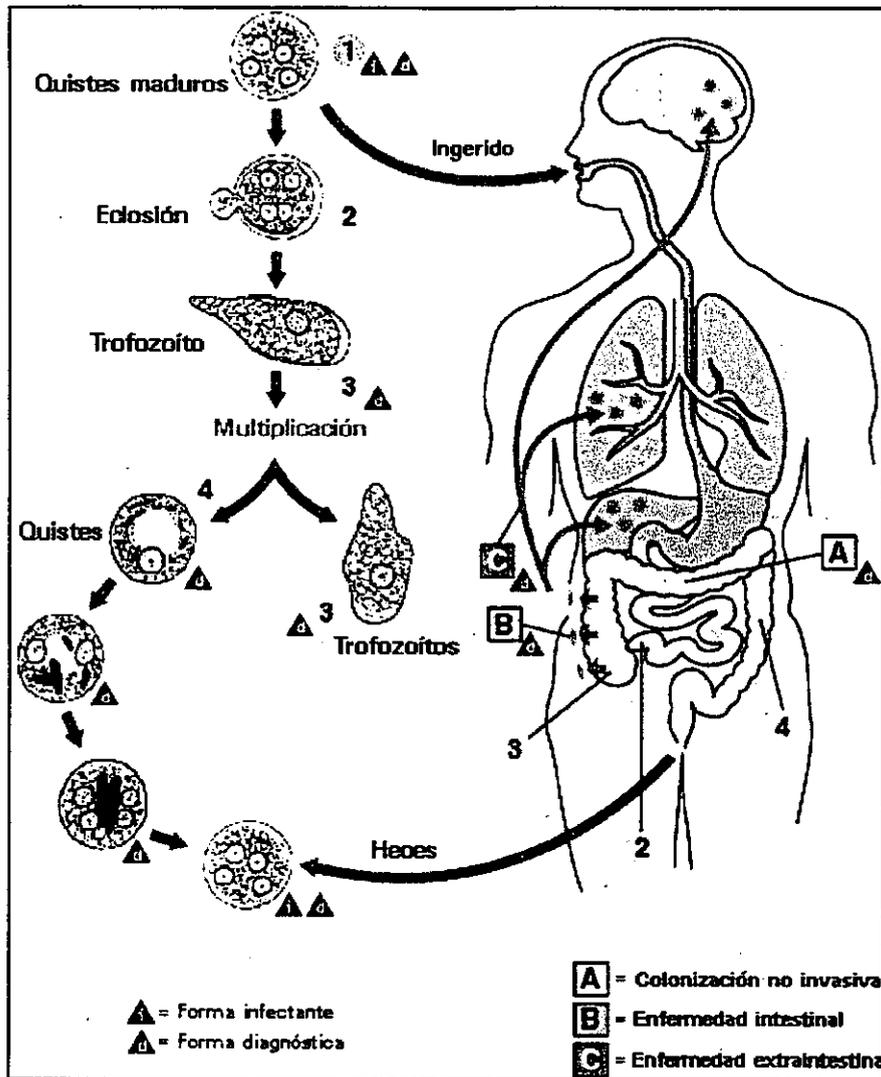


Figura 1.- Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. La infección por *Entamoeba histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros (1) en alimentos, agua o manos contaminados con heces. El desenquistamiento (2) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos (3) son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes (4) que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A: infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal), o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones cerebro etc. (C: enfermedad extraintestinal). Se ha establecido que las formas invasivas y no invasivas representan especies separadas: *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente, que son morfológicamente indistinguibles. (Tomado de Amibiasis, CDC, Atlanta, 1999).

ción de proteasas como colagenasas y cisteín proteasas entre las mas importantes (Muñoz y cols., 1984; Keene y cols., 1990) y proteínas formadoras de poros que alteran la permeabilidad de la membrana plasmática que conlleva a la lisis celular (Young y cols., 1982; Rosales-Encina y cols., 1987; Leippe y cols., 1994) y 3) finalmente la amiba puede fagocitar los restos celulares; este mecanismo en pruebas *in vitro* puede ser bloqueado mediante fármacos como la citocalasina B y D que inhiben la polimerización de los filamentos de actina de la amiba (Ravdin y Guerrant., 1981)(Figura 2).

Otros factores involucrados en la patogenicidad de la amiba son los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero; dentro de los mecanismos más importantes se encuentra el alto recambio molecular en la membrana de la amiba que modula su comportamiento virulento como la variación antigénica y la capacidad para deshacerse de anticuerpos unidos a su membrana por medio de la ingestión ó exfoliación de estos (Calderón y cols., 1980); también se ha descrito que es capaz de perder la susceptibilidad a la lisis por el complemento durante su adaptación a tratamientos repetitivos de suero, este fenómeno podría estar mediado por la adhesina de 260kDa, la cual posee la capacidad de inhibir la actividad del complejo de ataque a membrana (MAC). Se ha observado que las cistein proteasas de la amiba degradan inmunoglobulinas de clase IgG, IgM e IgA, evitando su acción sobre los trofozoítos y la acción del complemento (Tran y cols., 1998). Recientemente también se ha observado que *E. histolytica* pudiera estar jugando un papel importante en la muerte celular de la célula blanco de una manera directa o indirecta mediante el fenómeno de apoptosis. La señal de apoptosis comúnmente es transmitida mediante el ligando de Fas (Fas L) o el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF R). Sin embargo, los trofozoítos parecen inducir apoptosis por una vía alterna a estas dos principales ya que son capaces de inducir apoptosis en células murinas desprovistas del ligando de Fas ó del receptor de TNF (Ragland y cols., 1994; Velázquez y cols., 1998; Seydel y Stanley., 1998).

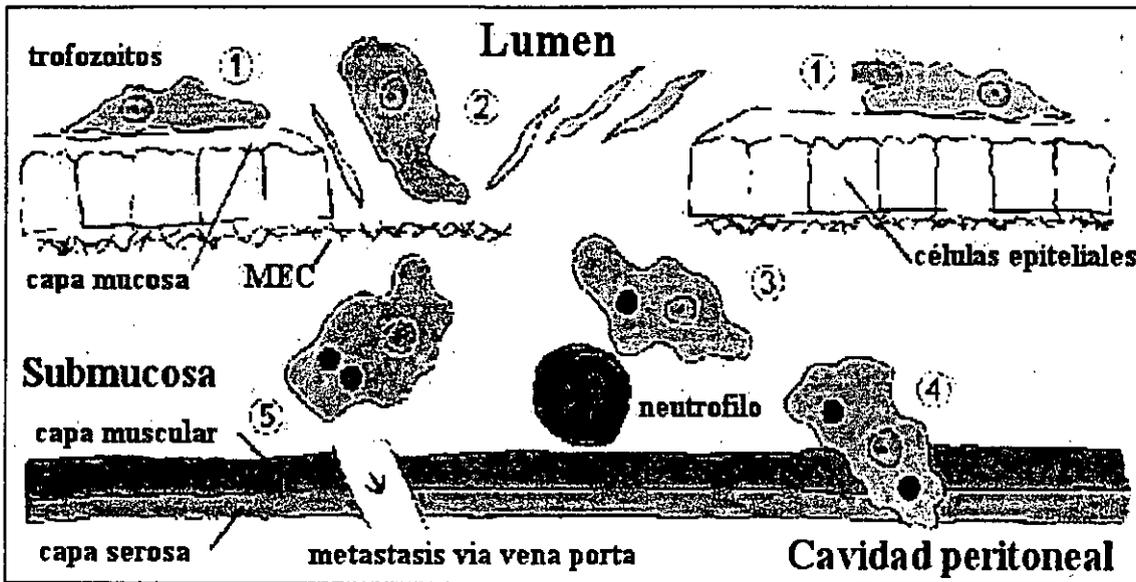


Figura 2.- Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*. 1) Los trofozoitos colonizan la superficie mucosa del intestino grueso, adhiriéndose a la capa mucosa e ingieren bacterias y restos celulares del lumen. La adhesión es mediada principalmente por la lectina de 260kDa. 2) El rompimiento de la barrera mucosa puede llevar a la muerte dependiente de contacto de las células epiteliales. La lectina de 260kDa juega un papel importante en la actividad citolítica. Adicionalmente el rompimiento del tejido de la matriz extracelular (MEC) implica que las proteasas están también involucradas en la patogénesis. 3) Los trofozoitos pueden continuar avanzando lateralmente y hacia abajo en la submucosa produciendo una úlcera en forma de botón de camisa. Los neutrófilos y otros efectores inmunes también son lisados. 4) Los trofozoitos también pueden penetrar en la capa muscular y serosa provocando una perforación intestinal. La perforación de la pared intestinal es un evento dramático que puede llevar a la peritonitis y filtración en la cavidad abdominal. 5) Los trofozoitos también pueden ganar acceso al sistema circulatorio y pueden ser diseminados. El hígado es sitio primario de la amibiasis extraintestinal y la diseminación hematogénea a otros órganos es raro. La metástasis al hígado involucra la vena porta, la cual acarrea sangre del colon directamente al hígado. La diseminación a otros tejidos más frecuente vincula la extensión directa de las lesiones hepáticas o colónicas .

## Antecedentes

Los factores anteriormente descritos parecen ser los de mayor relevancia en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la importancia de la adhesión como un mecanismo crucial en la virulencia de la amiba ha sido demostrada por varios investigadores (Takeuchi y Phillips., 1975; Mora-Galindo y cols., 1978; Ravdin y Guerrant., 1981; Li, E. y cols., 1988; Rosales-Encina y cols., 1987). Recientemente se ha confirmado que la adhesión de los trofozoítos con la célula blanco es necesaria para que los demás factores de citotoxicidad (e.g. amebaporos, cistein proteasas y fosfolipasa A) actúen en la lisis celular ó en la colonización e invasión del tejido intestinal (López y cols., 2000).

Existen evidencias que indican que la adhesión del trofozoíto a la célula blanco es mediada por adhesinas. Estas proteínas han sido localizadas en la membrana externa de los trofozoítos de *E. histolytica*. Hasta la fecha han sido caracterizadas un gran número de adhesinas con diferente peso molecular (260, 220, 150, 112, 66 y 52-47kDa). Dentro de este grupo destacan por su importancia en los mecanismos adhesión y virulencia de la amiba, la adhesina de 260kDa denominada lectina inhibible por Gal/GalNac (Galactosa y *N*-Acetil-D-Galactosamina)(Petri y cols., 1987a) y la adhesina de 52-47kDa denominada SREHP de la abreviación en inglés serine rich *Entamoeba histolytica* protein (Stanley y cols., 1990).

La adhesina inhibida por Gal/GalNac es una molécula compleja que tiene propiedades de lectina ya que se une a residuos de carbohidratos con Galactosa y *N*-Acetil-D-Galactosamina expuestos en las glicoproteínas de la célula blanco; esta proteína es considerada esencial para el daño ocasionado en la célula blanco, debido a que en presencia de Galactosa y *N*-Acetil-D-Galactosamina se inhibe el daño celular en un modelo *in vitro* (Ravdin y Guerrant., 1981). Esta proteína también se ha visto involucrada en mediar la resistencia a lisis por los componentes del complemento (Braga y cols., 1992). La lectina inhibible por Gal/GalNac es un

heterodímero de 260kDa formado por una subunidad pesada de 170kDa y una subunidad ligera de 35kDa unidas por enlaces disulfuro. La subunidad pesada de 170kDa es más inmunogénica que la subunidad ligera de 35kDa ya que anticuerpos monoclonales y policlonales obtenidos contra la proteína de 260kDa nativa ó desnaturalizada reconocen sólo a la subunidad de 170kDa. Los anticuerpos monoclonales obtenidos contra la subunidad pesada bloquean la adherencia de la ameba a las células epiteliales del ovario del hámster chino (células CHO) y a mucinas colónicas, sugiriendo que el dominio de adhesión reside dentro de la subunidad pesada (Petri y cols., 1987b). Sin embargo, la localización del dominio de adhesión en la región 170kDa esta en controversia ya que aún no se determina su localización (Lotter y cols., 1997; Tavares y cols., 2000).

Los genes que codifican para la subunidad pesada y ligera son miembros de una familia de multigenes con cinco a siete miembros (Ramakrishnan y cols., 1996). La subunidad pesada de 170kDa es codificada por cinco de estos genes, tres de los cuales codifican polipéptidos similares en el 95% de sus aminoácidos. La secuencia de aminoácidos derivados de los tres genes sugiere que la subunidad pesada es una proteína integral de membrana, con dominios citoplásmico, transmembranal y extracelular. El dominio extracelular puede ser dividido en tres regiones de acuerdo a la composición de aminoácidos: los aminoácidos amino-terminales del 1 a 187 tienen 3.2% de cisteína y 2.1% de triptófano, los aminoácidos 188-378 están desprovistos de cisteínas y los aminoácidos 378 a 1209 tiene 10.8% de residuos de cisteína, por lo cual se le denomina a esta región como rica en cisteínas (170CR) (Mann y cols., 1991)(Figura 3A). Dentro de esta secuencia se ha definido que la región rica en cisteínas contiene los posibles sitios que median la adhesión y la inhibición del complemento (Lotter y cols., 1997). Parte de la secuencia que codifica para la región rica en cisteínas (170CR) de la subunidad de 170kDa (aminoácidos 649 al 1209) ha sido utilizada para producir una proteína recombinante. La secuencia de esta porción se fusionó con la proteína glutatión S transferasa (GST)

para purificar a las proteínas recombinantes. Esta proteína recombinante 170CR/GST es antígenicamente similar a la proteína nativa ya que es reconocida por suero de pacientes con absceso hepático en un 90% de los casos (Zhang y cols., 1992). En ensayos de inmunización con la proteína recombinante 170CR/GST en jerbos, la formación del absceso hepático amibiano disminuye en el 27% de los animales infectados en comparación con el grupo control con 81% de animales infectados (Mann y Petri., 1991).

Por otra parte la proteína SREHP fue obtenida mediante el aislamiento de RNAm de una cepa patogénica de *E. histolytica* (HM1:IMSS). La proteína nativa SREHP migra en una región de 52 a 47kDa en SDS-PAGE, sin embargo, el péptido codificado tiene un tamaño de 25kDa, por lo que se sugiere que esta sufre modificaciones post-transcripcionales. La secuencia de aminoácidos derivados del cDNA de esta clona presenta un alto contenido de serinas (52 de 233 aminoácidos), una posible secuencia señal, múltiples octapéptidos y dodecapéptidos repetidos en tandem y una región transmembranal. Esta estructura primaria es similar en la secuencia de aminoácidos a los antígenos repetitivos de *Plasmodium falciparum* en la fase de circunsporozoito (Stanley y cols., 1990)(Figura 3B).

La función de la proteína SREHP parece estar relacionada con la adhesión amibiana, esto se demostró gracias a la creación de una proteína recombinante de la SREHP acoplada a la proteína Antranilato sintetasa (TrpE)(Stanley y cols., 1990); la obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína quimera (SREHP/TrpE), inhiben la adhesión de la amiba a células epiteliales CHO en un 70%. (Stanley y cols., 1990). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado un sitio de unión a carbohidratos que pudiera relacionarse con este efecto. En pruebas posteriores con la proteína recombinante SREHP/TrpE, se ha encontrado que tiene una alta inmunogenicidad ya que alrededor del 80% de los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano tienen anticuerpos que reaccionan contra esta proteína (Stanley y



*cols.*, 1991). En ensayos de inmunización de jerbos con la proteína recombinante SREHP/TrpE la formación de abscesos hepáticos amibianos disminuyó en el 64% de los animales infectados (Zhang y *cols.*, 1994).

Sí bien, la función de la proteína SREHP esta actualmente tratándose de definir, se ha descubierto que la proteína nativa promueve la migración de la amiba *in vitro*, por lo que se especula que la proteína SREHP también pudiera servir como una señal de atracción entre los trofozoítos de *E. histolytica* e incrementar la producción de factores solubles (ameboporos, cistein proteasas, colagenasa, fosfolipasas A etc.) involucrados en la invasión y destrucción del tejido. (Stanley y *cols.*, 1995).

Hasta la fecha se reporta que la inmunización con los antígenos amibianos recombinantes 170CR/GST y SREHP/TrpE, pueden prevenir el desarrollo de absceso hepático amibiano en animales infectados experimentalmente; esto también se mostró mediante la inmunización pasiva de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (abreviado en inglés SCID) con anticuerpos mono y policlonales que reconocen a las proteínas recombinantes 170CR/GST y SREHP/TrpE. Se han encontrado anticuerpos en animales inmunizados con la subunidad de 170kDa que reconocen epitopos capaces de inhibir o epitopos capaces de incrementar la adhesión celular de los trofozoítos a su célula blanco en pruebas *in vitro* (Petri y Ravdin., 1991). Sin embargo, aunque anticuerpos policlonales anti-SREHP protegen la formación de abscesos hepáticos amibianos aún no se ha definido un epitopo relevante de esta proteína en la virulencia de la amiba (Zhang y *cols.*, 1994).

A pesar de la importancia de este parásito, falta mucho por conocer acerca de la inmunidad protectora contra la infección amibiana. Un mejor entendimiento de la naturaleza protectora contra *E. histolytica* puede proveer información de la patogénesis amibiana, como un factor crítico en el desarrollo de una vacuna para prevenir la amibiasis. Las pruebas de inmunización con los antígenos amibianos

recombinantes de la SREHP/GST y 170CR/TrpE relacionados con la adhesión, pueden proteger del desarrollo de los abscesos hepáticos amibianos en diferentes modelos experimentales *in vivo* (jerbos, ratones con inmunodeficiencia severa combinada y hámsteres). Este efecto protector también ha sido demostrado mediante la inmunización pasiva en ratones SCID con anticuerpos policlonales anti-*E. histolytica*, anticuerpos policlonales de humano anti-amiba obtenidos de pacientes con absceso hepático amibiano y con anticuerpos monoclonales contra antígenos de lipofosfoglicano de superficie de la amiba (Cheng y cols., 1998). Este sistema parece ser de gran utilidad para determinar el papel que juegan estas proteínas en los mecanismos de virulencia de la amiba y en la localización de los epitopos relevantes de adhesión y citotoxicidad de estas proteínas, así como la identificación de nuevos componentes de la membrana involucrados en los mecanismos de adhesión y virulencia de la amiba.

### **Justificación**

A pesar del avance que se ha tenido en el estudio de la amibiasis, esta es considerada todavía como un problema de salud pública. La alta frecuencia de la infección en todo el mundo, aún despierta el interés de los investigadores por intentar desarrollar nuevas estrategias contra la amibiasis. El conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad ha contribuido al descubrimiento de antígenos que pueden generar una respuesta inmune protectora. Dentro de estos antígenos destacan la proteína SREHP y la subunidad pesada de 170kDa de la lectina inhibible por Gal/GalNac que están involucradas en los mecanismos de adhesión, sin embargo aún no se ha determinado como participan en la protección de animales infectados experimentalmente. Por lo que es importante ampliar los estudios sobre las proteínas que participan en los mecanismos de adhesión de la amiba y su papel en la citotoxicidad dependiente de contacto. El reconocimiento de estas proteínas mediante la creación de anticuerpos monoclonales ha contribuido a determinar el papel que juegan en la producción de daño hepático amibiano (Stanley y cols., 1994; Petri, W., 1996;

Velázquez y cols., 1995; González-Valle, R., 1996).

En base a estos antecedentes nosotros decidimos evaluar el reconocimiento de un panel de 18 anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana de *E. histolytica*, contra dos de los principales antígenos de *E. histolytica*; la proteína SREHP y una porción de la subunidad pesada de 170kDa denominada 170CR en sus versiones recombinantes (SREHP/TrpE y 170CR/GST) y establecer el papel de protección que tienen en la formación del absceso hepático amibiano en un grupo de hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica*.

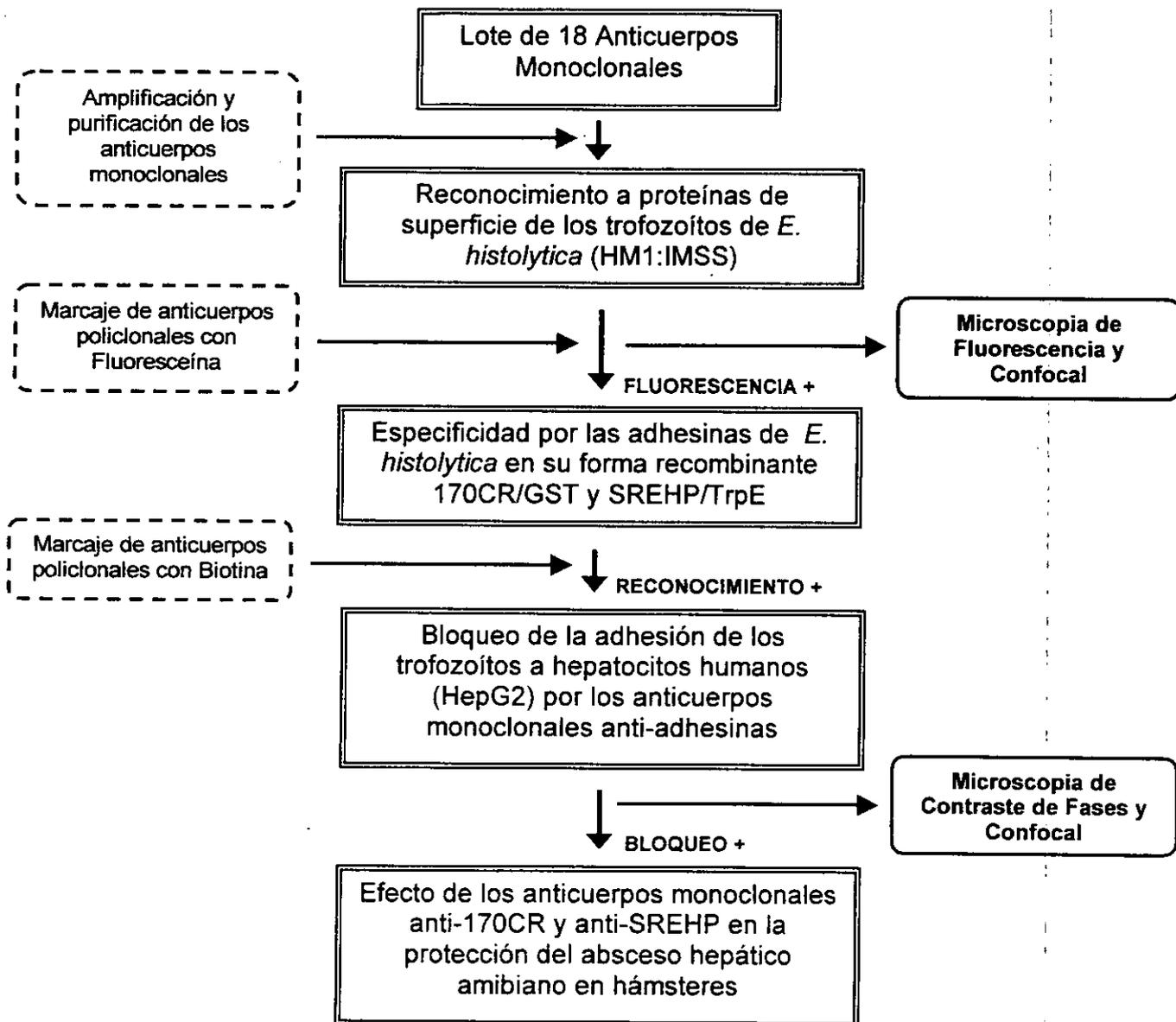
## OBJETIVO GENERAL

Determinar en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* la protección al daño hepático amibiano por inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales anti-proteínas de superficie de *E. histolytica*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el reconocimiento a proteínas de superficie de trofozoítos de amiba por anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana de *Entamoeba histolytica*.
- 2.- Determinar el reconocimiento a las proteínas recombinantes 170CR/GST y SREHP/TrpE por los anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas de superficie de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.
- 3.- Determinar la inhibición de la adhesión de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (HM1:IMSS) a hepatocitos humanos (HepG2) mediante anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana de *Entamoeba histolytica* en un modelo *in vitro*.
- 4.- Valorar el daño hepático amibiano en hámsteres infectados experimentalmente que recibieron la inmunización pasiva de anticuerpos monoclonales anti-adhesinas de *Entamoeba histolytica* mediante análisis histológico del hígado y la evaluación del porcentaje de daño hepático amibiano.

## ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA



## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVOS CELULARES

#### ***Entamoeba histolytica* (Cepa: HM1-IMSS).**

Los trofozoítos de las cepas HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* se cultivaron axenicamente en tubos de vidrio en medio BI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino (ver Apéndice) a 37°C durante ~ 72 hr (Diamond y cols., 1979). Una vez alcanzada la confluencia, los trofozoítos fueron cosechados mediante el cambio del medio de cultivo para descartar las amibas no adheridas al tubo mientras que los trofozoítos adheridos fueron incubados en agua-hielo (~ a 4°C) durante 10 min para despegarlos con flujos repetidos de medio con la pipeta. La suspensión obtenida fue centrifugada a 1,500 rpm para concentrar a los trofozoítos y cuantificarlos. Finalmente los trofozoítos contados fueron ajustados con un volumen de medio BI-S-33 (suplementado) de acuerdo al número de trofozoítos requerido.

#### **Línea celular de hepatocitos humanos (HepG2).**

La línea celular HepG2 (ATCC HB 8065) fue cultivada en botellas de plástico de 25cm<sup>2</sup> con medio DMEM suplementado con suero de ternera bovino al 10% (ver Apéndice) a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A las 72 hr o hasta que las células se encontraban al 80% de confluencia; se cosecharon con Tripsina (0.055%) y EDTA (0.58mM) diluidas en PBS (pH 7.4)(ver Apéndice) a los 2 min se retiró la tripsina y se agregó medio DMEM, se golpeó ligeramente la caja para despegar las células y se lavaron dos veces con un volumen igual de medio de cultivo a 1,500 rpm durante 5 min. Finalmente el paquete celular obtenido fue resuspendido y ajustado de acuerdo al número de hepatocitos requerido.

## **OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PROTEÍNAS DE *E. histolytica***

### **Cultivo de hibridoma productores de anticuerpos monoclonales**

Los 18 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana de *E. histolytica* fueron obtenidos por Ávila y Calderón en 1993. Los hibridomas, se obtuvieron de ratones BALB/c inmunizados con esferas de sílica gel recubiertas de lípidos sintéticos y proteínas de la fracción de membrana total de *Entamoeba histolytica*. Estos hibridomas fueron cultivados en botellas de plástico de 25cm<sup>2</sup> con medio DMEM suplementado con suero de ternera bovino al 10% e incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante ~48 a 72 hr hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Las células se cosecharon y se lavaron por centrifugación a 1,500 rpm durante 5min. El paquete formado fue resuspendido con PBS (pH 7.4) para determinar el número de células del hibridoma.

### **Producción de líquido ascítico en ratones BALB/c**

La producción de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo por formación del líquido ascítico en ratones BALB/c (hembras). Cada ratón fue inyectado por vía intraperitoneal con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14-ácido tetrametildecanoico) 10 días antes de la inoculación de los hibridomas. Se inoculó con 5 x 10<sup>6</sup> células de los hibridomas por ratón en 0.5 ml de PBS(pH 7.4). Después de 2 semanas de la inoculación, se extrajo el líquido ascítico y se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 min para eliminar las células sanguíneas y el tejido adiposo. Finalmente la suspensión fue congelada a -20°C para su conservación y su posterior uso.

### **Purificación de los anticuerpos monoclonales por precipitación con Sulfato de Amonio.**

Los anticuerpos monoclonales contenidos en el líquido ascítico fueron purificados por precipitación con sulfato de amonio saturado (SAS)(ver Apéndice). Al líquido

ascítico obtenido, se le agregó un volumen igual de amortiguador de fosfatos salino (PBS pH 7.4) y de acuerdo a este volumen se le agregó un volumen igual de SAS, llevando la solución a una concentración final del 50%. El SAS fue adicionado por goteo a 4°C en agitación constante y al final se incubó durante 30 min en agitación constante a 4°C. Posteriormente el precipitado fue centrifugado a 2,100 rpm durante 15 min a 4°C y la pastilla formada se resuspendió con 0.25 volúmenes de la solución inicial. Esta solución puede contener proteínas del plasma además de las inmunoglobulinas del suero, por lo que fue conveniente re-precipitar dos veces más con una concentración final de SAS al 40% por goteo con agitación constante a 4°C y se incubó 30 min a 4°C con agitación constante. Este precipitado se centrifugó a 2100 rpm durante 15 min a 4°C y la pastilla formada se resuspendió en PBS. El exceso de sales de la solución fue eliminado por diálisis con PBS (pH 7.4) a 4°C con 6 cambios (un volumen 100 veces mayor al de la muestra), al finalizar la diálisis se centrifugó a 4,000 rpm durante 30 min 4°C para retirar el material insoluble y determinar la concentración inmunoglobulinas en el espectrofotómetro de UV a una longitud de 280nm (Garvey y cols., 1977).

## **ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO ANTI-IgG DE RATÓN MARCADOS CON FLUORESCEÍNA O BIOTINA.**

### **Obtención y purificación de Inmunoglobulinas de conejo anti-Ig de ratón**

La producción de los anticuerpos anti-Ig de ratón se realizó en un conejo macho Nueva Zelanda de 3.5 Kg. El conejo fue inmunizado con una suspensión de 0.5ml de IgG de ratón a una concentración de 200 µg/ml y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, la cual fue inyectada a lo largo del lomo por medio de varios piquetes subcutáneos. Después de 15 días se le aplicó un refuerzo con la misma dosis pero con adyuvante incompleto de Freund. A los 10 días de aplicado el refuerzo se tomó una muestra de sangre con el propósito de determinar el título de anticuerpos mediante la prueba de ELISA. Cuando el título de anticuerpos fue alto se procedió a

obtener el suero para purificar los anticuerpos policlonales por precipitación con SAS (descrito anteriormente) y se determinó la concentración de proteínas.

### **Marcaje con Isotiocianato de Fluoresceína de las Ig's de conejo.**

1mg de Ig de conejo purificada fue colocada en una membrana de diálisis MWOC (10-12KDa) y fue ajustado su pH a 9.5 mediante diálisis en una solución amortiguadora de carbonatos (0.1M, pH 9.5) durante toda la noche a 4°C. Al terminó de la diálisis se removió la solución y se colocó en tubos de plástico. Al mismo tiempo, el fluorocromo FITC se disolvió en Dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final de 1mg/ml, adicionando 1 ml de esta solución por cada 100 mg de la Inmunoglobulina de conejo. Posteriormente ambos componentes fueron mezclados y cubiertos con papel aluminio para colocarse en una plato giratorio a 4°C durante 18 hr en oscuridad. Terminado el tiempo de conjugación los anticuerpos fluoresceínados fueron purificados en una columna de intercambio catiónico de DEAE celulosa (DE-52 Whatman) para remover el exceso de FITC no acoplado. La columna fue equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos (PB)(ver Apéndice), mezclando por cada gramo de DEAE celulosa 5 ml de PB y 1 ml de este gel por cada 30 mg de anticuerpo policlonal de conejo. La columna fue lavada con la solución amortiguadora de fosfatos (PB) y los anticuerpos fueron eluidos con PBS (pH 6.3)(ver Apéndice). Finalmente la concentración de anticuerpos marcados con fluoresceína fue estimada obteniendo la absorbancia de la solución a 280 nm en el espectrofotómetro de UV (Hermanson, G., 1996).

### **Marcaje con *N*-hidroxisuccinimida derivada de la biotina**

Las Inmunoglobulinas de conejo anti-Ig de ratón fueron dializadas contra una solución amortiguadora de bicarbonatos (0.1M y pH 8.5) durante toda la noche a 4°C en una membrana de diálisis de MWOC (10 a 12KDa) para ajustar su pH a 8.5 antes de ser mezclada con la biotina. La *N*-hidroxisuccinimida derivada de la biotina fue disuelta en agua bidestilada (desionizada, estéril y libre de pirógenos) a una

concentración final de 50 mg de biotina en 1 ml de agua bidestilada. Posteriormente se mezclaron 10 mg de biotina por cada 100 mg de IgG de conejo y se incubaron durante 18 hr a 4°C, al término de la conjugación los anticuerpos marcados fueron purificados por diálisis contra la solución amortiguadora de PBS (pH 7.4), durante toda la noche para que se difundiera la biotina no conjugada. La concentración final de los anticuerpos fue obtenida midiendo la absorbancia de la solución a 280 nm (Bayer y cols., 1980).

## **TINCIÓN CELULAR DE TROFOZOÍTOS POR INMUNO-FLUORESCENCIA INDIRECTA**

### **Tratamiento para amibas fijadas**

Se ajustaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1 ml de la solución amortiguadora APS (ver Apéndice) y fueron lavados con APS a 1,200 rpm durante 5 min para eliminar algunos componentes del medio de cultivo BI-S-33. El paquete celular obtenido se resuspendió en 500  $\mu$ l de APS y 500  $\mu$ l de una mezcla de fijadores (ver Apéndice) durante 15 min a temperatura ambiente mezclando constantemente; una vez concluido el tiempo se realizaron 2 lavados con AP (ver Apéndice) a 1,200 rpm durante 5 min, al paquete obtenido se le agregó 500  $\mu$ l de Azul de Evans (ver Apéndice) para evitar la autofluorecencia y se dejó incubar con el colorante durante 30 min a temperatura ambiente; al finalizar el tiempo, se realizaron 2 lavados con AP a 1,200 rpm durante 5 min para eliminar el exceso de colorante y el paquete obtenido fue resuspendido en 1ml de AP.

Posteriormente de esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ l que contenían ~100,000 trofozoítos, se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-proteínas de membrana a una concentración final de 150 $\mu$ g/ml en AP durante 1 hr a temperatura ambiente. Enseguida se lavaron dos veces con AP a 1,200 rpm durante 5 min y el paquete obtenido se resuspendió con IgG de conejo anti-Ig de ratón acoplada a FITC

a una dilución 1:40 en AP y se dejó incubar 1 hr a temperatura ambiente en oscuridad, el exceso de IgG de conejo no unido fue eliminado mediante dos lavados con AP y centrifugados a 1,200 rpm durante 5 min. Finalmente el paquete obtenido fue resuspendido con 30 µl de AP y 10 µl de Vectashield (fijador para fluorescencia).

#### **Tratamiento para amibas sin fijar**

Se utilizaron ~100,000 trofozoítos en 100 µl de APS mantenidos a 4°C para cada anticuerpo monoclonal probado. Los trofozoítos fueron tratados con el anticuerpo monoclonal correspondiente a una concentración final de 150 µg/ml en APS, dejándose incubar 1 hr a 4°C, terminado el tiempo los trofozoítos fueron lavados dos veces a 1,200 rpm por 5 min a 4°C. El paquete obtenido se resuspendió con IgG de conejo anti-Ig de ratón fluoresceinado a una dilución 1:40 en APS y se dejó incubar 1 hr a 4°C en oscuridad, al terminó de la incubación los trofozoítos fueron lavados dos veces con APS a 1,200 rpm durante 5min a 4°C. El paquete obtenido fue resuspendido con 30 µl de APS y 10 µl de Vectashield, manteniéndose a 4°C todo el tiempo hasta su observación en el microscopio de fluorescencia. Cabe destacar que este mismo tratamiento fue utilizado en los trofozoítos para el análisis de microscopia confocal.

Como control de fluorescencia en ambos tratamientos (amibas fijadas y sin fijar), la inespecificidad del anticuerpo secundario acoplado a FITC (IgG de conejo anti-IgG de ratón) fue determinada al no agregar el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína de membrana.

#### **PRUEBA DE ELISA.**

Las placas de ELISA de 96 pozos fueron cubiertas con la proteína recombinante 170CR/GST ó SREHP/TrpE a una concentración final de 10 µg/pozo en una solución reguladora de carbonatos (ver Apéndice) y se dejaron incubar toda la noche

a 4°C. Al siguiente día, las placas fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween (ver Apéndice), se bloquearon los pozos con PBS-Tween-BSA al 1.0% durante 30 min a 37°C y el exceso de BSA fue eliminado con 5 lavados de PBS-Tween.

Posteriormente se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-proteína de membrana a una concentración de 5 µg/pozo y se dejó incubar 2 hr a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados con PBS-Tween y se adicionó a cada pozo el anticuerpo secundario de conejo (IgG de conejo anti-Ig de ratón acoplada a biotina) diluido 1:1000 en PBS-Tween, dejándose incubar 2 hr a 37°C, eliminando los anticuerpos no unidos con 5 lavados de PBS-Tween. Enseguida se adicionó la estreptoavidina acoplada a peroxidasa y se dejó incubar durante 1hr a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados a la placa con PBS-Tween y se adicionó a cada pozo peróxido de hidrógeno y el cromógeno ABTS (ver Apéndice), considerando 1 ml de ABTS para cada 1 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente con agitación constante en oscuridad, terminado el tiempo se paró la reacción con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N y la placa fue leída inmediatamente en el espectrofotómetro a una longitud de 414 nm. Para el control de especificidad del anticuerpo secundario de conejo (IgG de conejo anti-Ig de ratón biotinilado) no se agregó el anticuerpo monoclonal correspondiente.

## **ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE AMIBAS A HEPATOCITOS**

### **Prueba experimental.**

Se utilizaron ~150,000 trofozoítos vivos (contenidos en 50µl de medio BI-S-33) y fueron tratados con 60 µg (60 µl) de cada uno de los anticuerpos monoclonales que reconocieron a las proteínas recombinantes 170CR/GST y SREHP/TrpE de *E. histolytica* y se dejaron reaccionar durante 30 min a 4°C. Esta cantidad de

anticuerpo monoclonal utilizada fue la óptima en la que se pudo ver el efecto inhibitorio ya que en concentraciones inferiores de 30 y 45  $\mu\text{g}$  el efecto es parcial (González-Valle, R., 1996).

A la par se obtuvieron ~200,000 hepatocitos humanos (HepG2) en un volumen de 40  $\mu\text{l}$  de medio DMEM y posteriormente ambos grupos celulares fueron mezclados y se agregaron a un porta objetos excavado cubierto, dejándose incubar 4 hr a 4°C para determinar mejor el efecto de agregación celular. Concluido el tiempo las preparaciones fueron observadas al microscopio de contraste de fases.

#### **Prueba para controles.**

Para el control positivo de adhesión los trofozoítos no fueron tratados con el anticuerpo monoclonal. En su lugar los trofozoítos fueron tratados con 60  $\mu\text{l}$  de medio BI-S-33 y se dejaron incubar durante 30 min a 4°C, después se les agregaron los 200,000 hepatocitos y se dejaron incubar durante 4 hr a 4°C. Posteriormente fueron observados al microscopio de contraste de fases.

Para el control negativo de la adhesión los trofozoítos fueron tratados con 30  $\mu\text{l}$  de *N*-Acetil-Glucosamina (Gluc/Nac) a 250mM y 30  $\mu\text{l}$  de *N*-Acetil-D-Galactosamina (Gal/Nac) a 250mM, como inhibidores naturales de la adhesión y se dejaron incubar durante 30 min a 4°C. Finalmente se agregaron 200,000 hepatocitos y se dejaron incubar durante 4 hr a 4°C.

#### **Tinción celular de amibas y hepatocitos.**

Adicionalmente, se realizó la tinción celular de los trofozoítos y hepatocitos en las pruebas de inhibición celular para distinguir a los dos tipos celulares. Para esta prueba se colectaron  $1 \times 10^6$  hepatocitos (HepG2) en 1,900  $\mu\text{l}$  de DMEM suplementado y se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo monoclonal anti-MHC clase

I (dilución 1:100) durante 1hr a 4°C, posteriormente se realizaron 2 lavados con DMEM suplementado, por 5 min a 1200 rpm a 4°C con el fin de quitar el exceso de anticuerpo y se dejó incubar con 100 µl del anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a rodamina con 1,900 µl de DMEM suplementado durante 1hr a 4°C, una vez concluido el tiempo se realizaron 2 lavados con medio DMEM suplementado durante 5 min a 1200 rpm a 4°C y se ajustó la pastilla en 100 µl de APS y se tomó para cada anticuerpo monoclonal 20 µl (200,000 hepatocitos).

Al mismo tiempo se colectaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 1 ml de APS y de esta suspensión se tomaron 150,000 trofozoítos (150 µl) para cada anticuerpo monoclonal, posteriormente los trofozoítos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 5 min y la pastilla obtenida se resuspendió con 50 µl del anticuerpo monoclonal (150 µg/ml) correspondiente (C9F10, C5E1, C3 y C11E11), dejándose incubar 30 min a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, los trofozoítos fueron lavados dos veces con APS durante 5 min a 1200 rpm para eliminar los anticuerpos no unidos. La pastilla obtenida fue resuspendida con 100 µl del anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón fluoresceínado (dilución 1:10 en APS) y se dejó incubar 1 hr a 4°C en oscuridad. Finalmente los trofozoítos fueron lavados dos veces con APS.

Al finalizar el tratamiento, los hepatocitos y las amibas fueron mezclados y se dejaron incubar 4 hr a 4°C (realizándose por triplicado todas las condiciones). Terminado el tiempo de incubación, las células fueron observadas al microscopio confocal. Para el control del segundo anticuerpo solo se utilizó el anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón fluoresceínado y para el control positivo de adhesión no se utilizó ningún anticuerpo.

## MODELO DEL ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO EN HÁMSTER.

### Porcentaje de lesión

Para observar el papel protector de los anticuerpos monoclonales en el daño hepático amibiano, se utilizaron 72 hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*) de 8 a 10 semanas de edad, mantenidos en el Bioterio del CINVESTAV con purina y agua *ad libitum*. Estos fueron separados aleatoriamente en tres grupos de 24 hámsteres cada uno; los dos primeros grupos fueron inmunizados pasivamente con 1mg del anticuerpo monoclonal C5E1 (anti-170CR) o el anticuerpo monoclonal C9F10 (anti-SREHP) y el tercer grupo fue inmunizado con 1mg de IgG de ratón normal como control. Después de 24 hr se les inyectó a cada grupo por vía intraperitoneal  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *E. histolytica* y después de 24 hr del reto, se les dio un refuerzo con el anticuerpo monoclonal ó la IgG de ratón respectivamente. Una semana después los hámsteres fueron sacrificados para determinar los porcentajes de lesión. ( $\text{Peso de la lesión} / \text{Peso total del hígado} \times 100 = \% \text{ de lesión}$ ). Los datos obtenidos se analizaron mediante el estadístico de ANOVA, para determinar si existían diferencias significativas con respecto al grupo control.

### Análisis histológico

Una vez que se cuantificó la lesión de los hígados extraídos, el tejido sano y el tejido con lesiones se fijaron en una solución de formol al 15% (en PBS pH 7.4) durante ~72 horas. Posteriormente este tejido se deshidrató con una serie progresiva de alcoholes (70, 80, 90, 96 y 100%) 2 hr en cada uno y con xilol durante 20 min para aclarar al tejido.

Finalmente, el tejido se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de ancho de las muestras seleccionadas y se tiñeron de forma rutinaria con Hematoxilina y Eosina (Lee, G., 1968) para observarse al microscopio óptico y realizar el análisis histopatológico, tomando en cuenta los siguientes parámetros: presencia, apariencia

y abundancia de trofozoítos; cantidad del infiltrado de células inflamatorias; congestión y hemorragia en el tejido; tamaño y localización de la lesión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE *E. histolytica* POR ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL.

Los resultados obtenidos por el ensayo de inmunofluorescencia indirecta con los trofozoítos fijados demostró que los anticuerpos monoclonales C3, C9F10, C8, C11E11, C6F10, C4C2, C16D3, C11G11, 3D7E5, C5F1, C5E1 y 3E2H9 dieron fluorescencia positiva sobre la superficie celular, mientras que los anticuerpos restantes C4H8, 3E2F4, 3E2F7, 3E2G5, C2H11 y 3E2H7 no reconocieron ninguna proteína de la superficie de *Entamoeba histolytica*. (Tabla 1 y Figura 4). La fluorescencia positiva en la superficie de los trofozoítos, demostró que estos 12 anticuerpos monoclonales están dirigidos contra proteínas externas de la membrana de *E. histolytica*.

Por otra parte, los 6 anticuerpos monoclonales que no dieron fluorescencia podrían estar dirigidos contra proteínas internas por lo que su especificidad no es evidenciada. La producción de estos anticuerpos monoclonales sin reconocimiento por proteínas de la membrana externa se vió favorecida por la forma en que se les dio origen, ya que se utilizaron proteínas totales de membrana que se reconstituyeron en membranas artificiales de lípidos quedando en la reconstitución posiblemente proteínas de membrana de los organelos amibianos (e.g mitocondrias y núcleo) ó epitopos del dominio citoplasmático de proteínas de superficie que quedaron invertidos en la reconstitución, dejando expuestos sus epitopos en el proceso de reconocimiento por el sistema inmune y la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos contra estos antígenos.

Adicionalmente para corroborar el reconocimiento de los 12 anticuerpos monoclo-

Tabla 1.- Reconocimiento de un lote de 18 anticuerpos monoclonales a las proteínas de superficie de *E. histolytica*, utilizando la prueba de Inmunofluorescencia indirecta.

ANTICUERPO MONOCLONAL	RECONOCIMIENTO
C3	POSITIVO
C9F10	POSITIVO
C8	POSITIVO
C11E11	POSITIVO
C6F10	POSITIVO
C4C2	POSITIVO
C16D3	POSITIVO
C11G11	POSITIVO
3D7E5	POSITIVO
C5F1	POSITIVO
C5E1	POSITIVO
3E2H9	POSITIVO
C4H8	NEGATIVO
3E2F4	NEGATIVO
3E2F7	NEGATIVO
3E2G5	NEGATIVO
C2H11	NEGATIVO
3E2H7	NEGATIVO

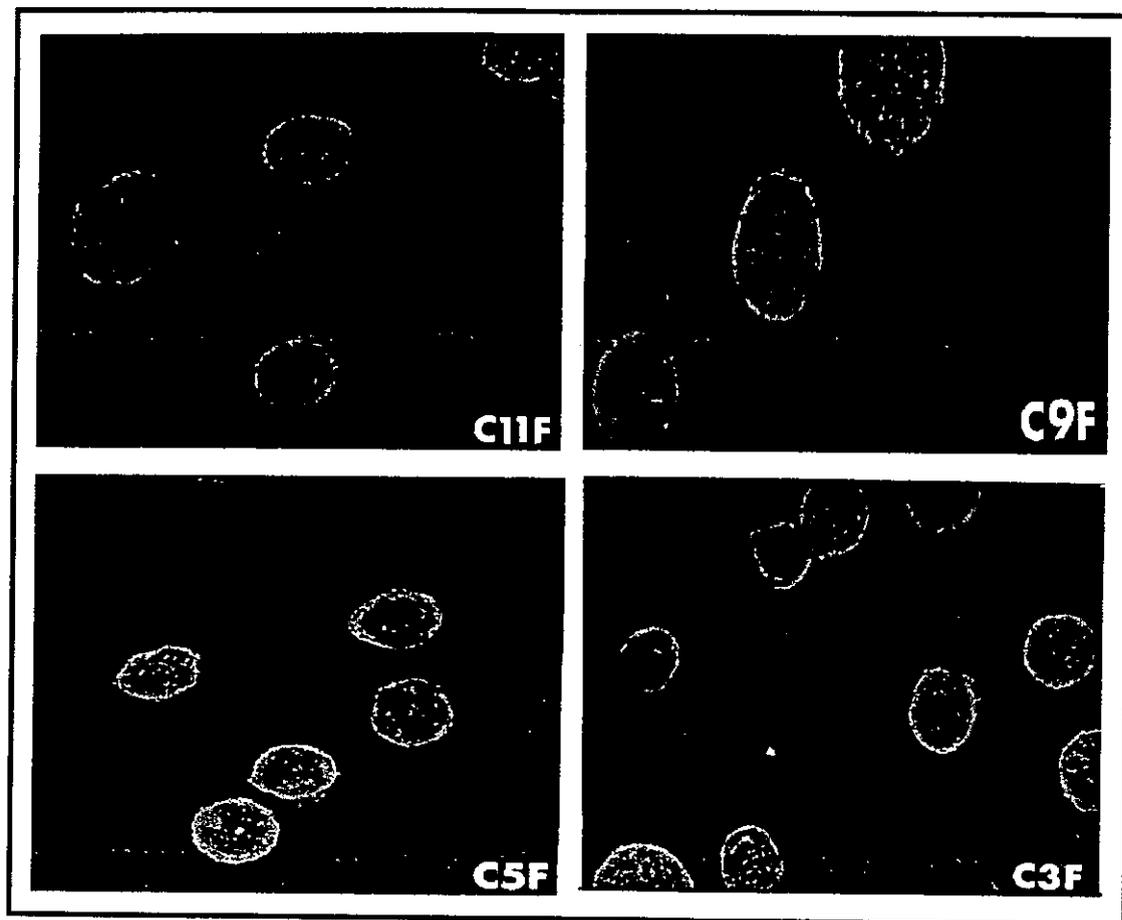


Figura 4.- Anticuerpos monoclonales con reconocimiento a proteínas de membrana de trofozoitos fijados mediante inmunofluorescencia indirecta. En las imágenes se muestran el reconocimiento positivo de los anticuerpos monoclonales C9F10, C5E1, C11E11 y C3 a proteínas de membrana, como se puede observar la tinción de fluorescencia en trofozoitos fijados (F) es sobre toda la superficie de la amiba.

nales positivos sobre las proteínas de membrana externa fue necesario observar los ensayos de inmunofluorescencia al microscopio confocal para tener una perspectiva de toda la superficie de los trofozoítos mediante una serie de cortes virtuales sobre la superficie celular (obtenida por un programa de la computadora). Las imágenes obtenidas al microscopio confocal demostraron que en la reconstrucción de los cortes ópticos la fluorescencia solo correspondió a la capa superficial de los trofozoítos confirmando la especificidad de los anticuerpos por proteínas de membrana externa (Figura 5 y 6).

En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta los trofozoítos de *E. histolytica* fueron tratados con los fijadores (formaldehído-glutaraldehído) para evitar el alto recambio molecular y la posible excreción o fagocitosis de los anticuerpos sobre la membrana de la amiba (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991) ya que estos mecanismos han sido relacionados con la evasión de la respuesta inmune de la amiba y pudieran interferir con el reconocimiento específico de nuestros anticuerpos monoclonales sobre la membrana. Es por eso que fue necesario realizar ensayos de reconocimiento con trofozoítos sin fijar, para descartar el posible efecto de los fijadores en el reconocimiento de las proteínas de superficie de la amiba. Los trofozoítos vivos fueron mantenidos a 4°C, para disminuir su motilidad y la polarización de sus receptores así como para disminuir su metabolismo (Rodríguez y cols., 1989 y 1994; Santos y cols., 1990). Bajo esta condición también se observó el reconocimiento positivo de los 12 anticuerpos monoclonales sobre la membrana de la amiba al igual que con los trofozoítos fijados, sin embargo, los patrones de fluorescencia en este ensayo fueron diferentes (Figura 7); En comparación con los trofozoítos fijados en donde la fluorescencia fue homogénea, los trofozoítos vivos presentaron dos patrones de fluorescencia; 1) fluorescencia polarizada (e.g. C11E11 y C3) y 2) fluorescencia sobre el contorno de la superficie celular de los trofozoitos (e.g. C9F10 y C5E1). Estas diferencias podría deberse a que los trofozoitos vivos mantenidos a 4°C, son capaces de tener actividad en su membrana y producir una

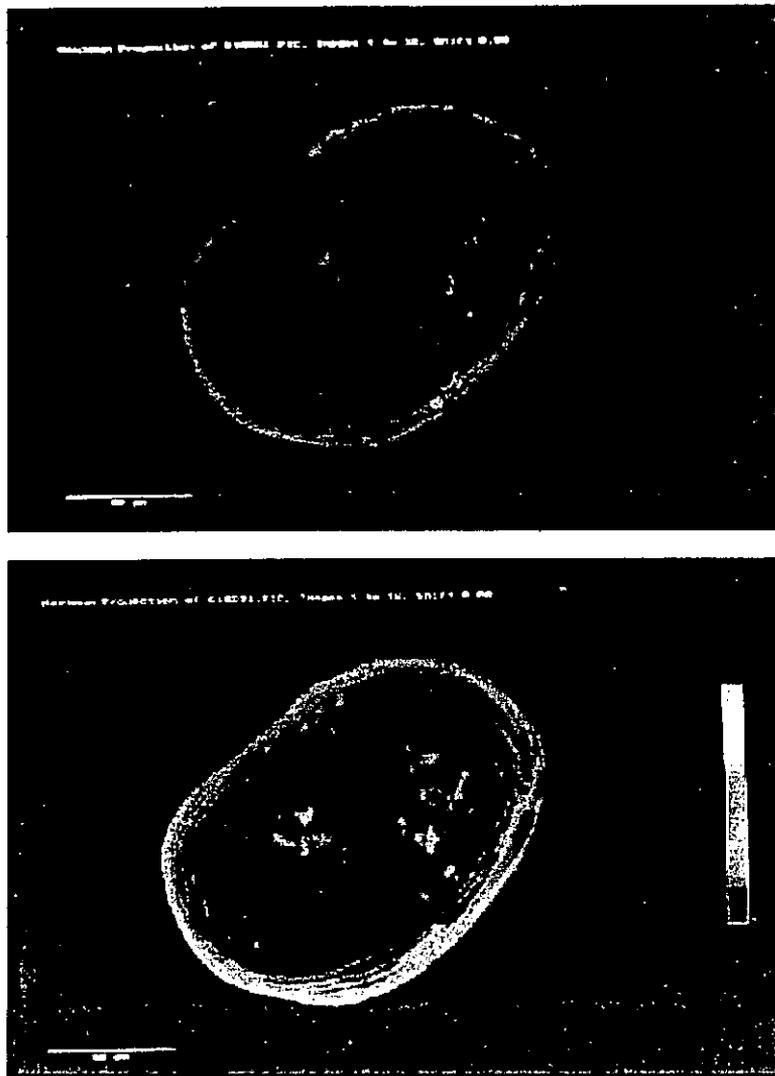


Figura 5.- Fotografías tomadas en el microscopio confocal. En la imagen de arriba muestra una composición de varios cortes de la superficie de los trofozoitos de *E. histolytica* teñidos con el anticuerpo monoclonal C16D3, destacando que la fluorescencia sólo se observó en el contorno de los cortes realizados. En la imagen de abajo se muestra el patrón de intensidad de fluorescencia de la misma imagen. La intensidad de fluorescencia esta determinada por el patrón de coloración; mayor intensidad color naranja y menor intensidad color azul.

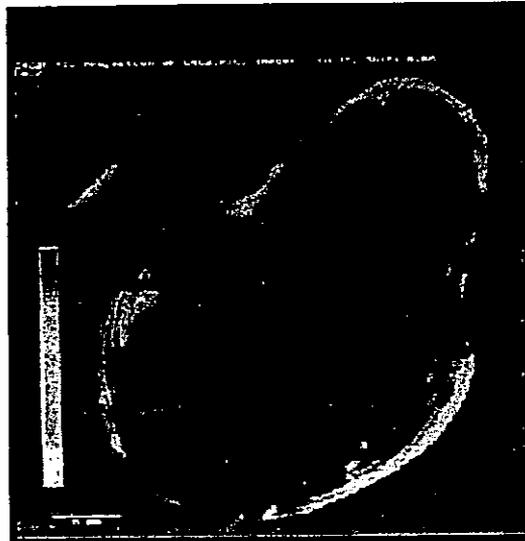
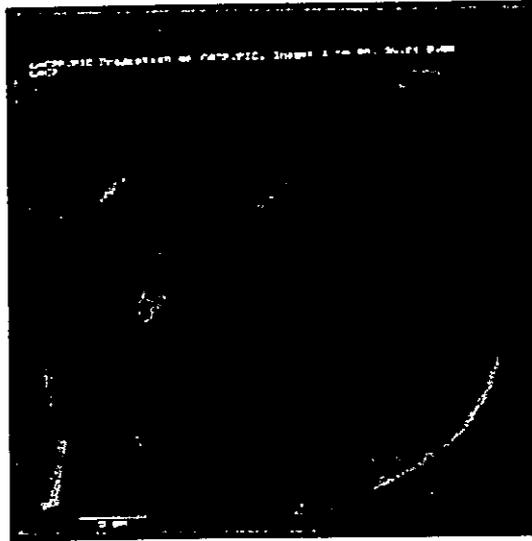


Figura 6.- Fotografías tomadas en el microscopio confocal. En la imagen de arriba se muestra una composición de varios cortes de la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* teñidos con el anticuerpo monoclonal C4C2, destacando que la fluorescencia solo se observó en el contorno de los cortes realizados. En la imagen de abajo se muestra el patrón de intensidad de fluorescencia de la misma imagen determinada por el patrón de coloración; la mayor intensidad esta relacionada con el color naranja mientras una menor intensidad esta dada por el color azul.

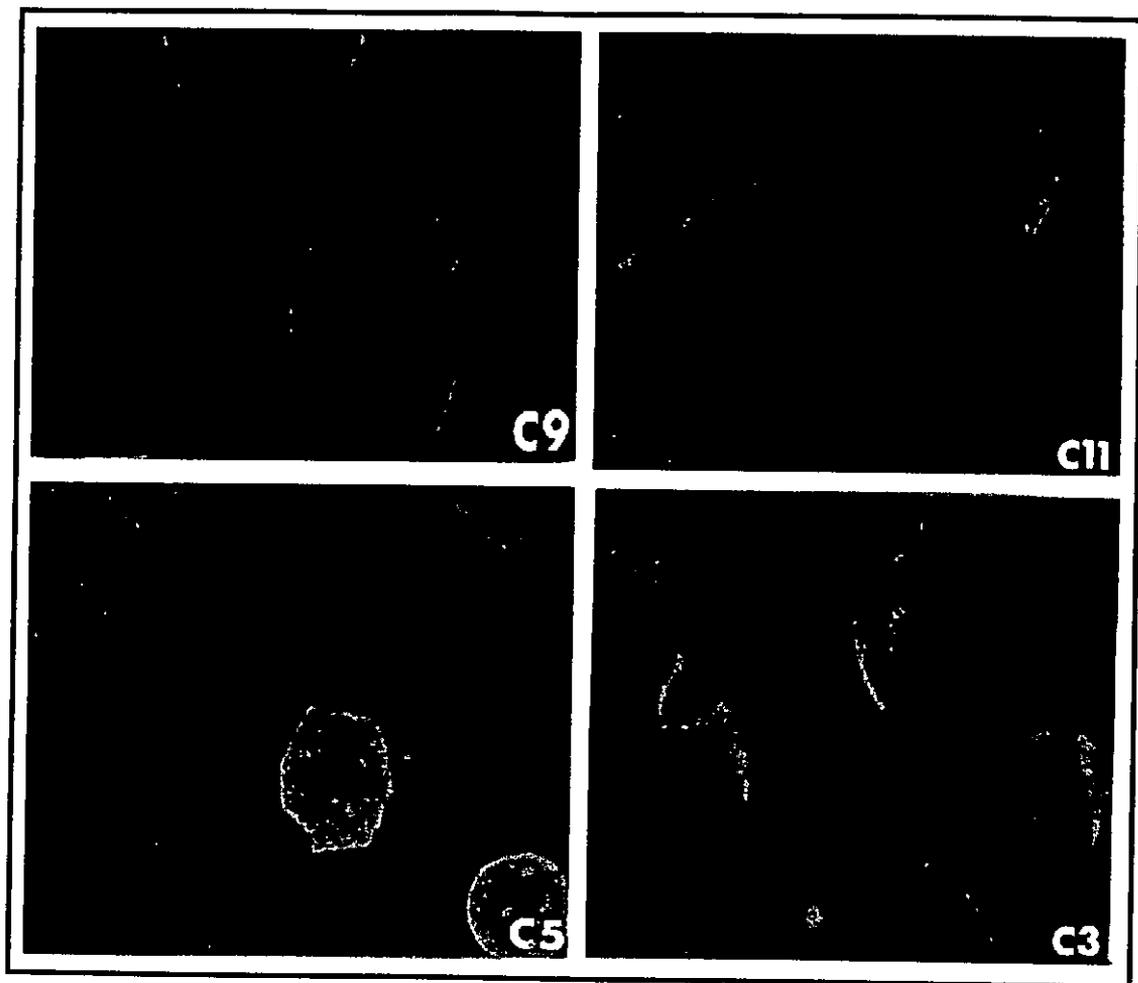


Figura 7.- Anticuerpos monoclonales con reconocimiento a proteínas de membrana de trofozoítos vivos mediante Inmunofluorescencia indirecta. En las imágenes se muestra el reconocimiento positivo de los anticuerpos monoclonales C9F10, C5E1, C11E11 y C3 contra proteínas de membrana de trofozoítos vivos mantenidos a 4°C. Como se puede observar la tinción de fluorescencia en esta condición, se observa polarizada con los anticuerpos monoclonales C11E11 y C3 y en todo el contorno de la superficie celular de los trofozoítos con los anticuerpos monoclonales C9F10 y C5E1.

distribución real de las proteínas en la membrana de acuerdo a las necesidades de la amiba en ese momento; mientras en los trofozoítos muertos o fijados, las proteínas no pueden sufrir cambios en la membrana.

Los resultados nos sugieren que algunos de nuestros anticuerpos monoclonales con fluorescencia positiva podrían estar reconociendo proteínas de membrana involucradas en los mecanismos de virulencia de la amiba, como ha sido demostrado por varios investigadores, entre estas proteínas podríamos destacar a las que participan en el fenómeno de adhesión como uno de los principales factores que contribuyen al daño celular (Rosales-Encina y cols., 1987; Arroyo y Orozco., 1987; Rodríguez y cols., 1994). La mayoría de las adhesinas de *E. histolytica* han sido caracterizadas de acuerdo a sus pesos moleculares. Sin embargo aun se desconoce como estas proteínas tras reconocer a su ligando inducen la liberación de los factores de citotoxicidad y la lisis celular de las células del hospedero.

#### **RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES 170CR/GST Y SREHP/TrpE DE *E. histolytica* POR ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

Los 12 anticuerpos monoclonales que dieron fluorescencia positiva en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica*, se utilizaron en el ensayo de ELISA para analizar el reconocimiento a proteína recombinante 170CR/GST; se observó que los anticuerpos monoclonales C4C2, 3D7E5 y C5E1 fueron positivos en reconocer a esta proteína. El reconocimiento positivo fue determinado por un valor de absorbancia superior al valor de la media + una desviación estándar (también definido como valor de corte) de los anticuerpos monoclonales probados (Velázquez y cols., 1995) para seleccionar a los anticuerpos monoclonales con un alto reconocimiento a la proteína recombinante 170CR/GST. Los anticuerpos con reconocimiento positivo presentaron valores de absorbancia de 2.200 superior al

valor de corte de 2.039 (Tabla 2). Estos resultados nos confirmaron la alta inmunogenicidad de la región 170CR; en reportes previos se ha demostrado que esta región es la porción más inmunogénica de la subunidad de 170kDa; la cual es reconocida por sueros de pacientes con absceso hepático en un 90% de los casos (Zhang y cols., 1992). Por otra parte, se ha observado que la región 170CR está involucrada en los mecanismos de adhesión y citólisis de un gran número de células humanas (células del epitelio del colon, neutrófilos, macrófagos y linfocitos T)(Burchard y Bilke., 1992) pero hasta el momento existe confusión de la localización de los epitopos para la adhesión y citotoxicidad dentro la región 170CR.

Los anticuerpos monoclonales con reconocimiento positivo para la proteína recombinante SREHP/TrpE fueron C16D3 y C9F10 por presentar valores de absorbancia de 2.111 y 2.200 respectivamente, superiores al valor de corte de 1.955 mientras que el anticuerpo monoclonal C11E11 presentó una absorbancia menor de 1.920 muy cercano al valor de corte por lo que fue considerado para pruebas posteriores (Tabla 2). Estos resultados nos confirmaron la alta inmunogenicidad de la proteína nativa SREHP, como ha sido demostrado a través del reconocimiento de los anticuerpos de pacientes con absceso hepático amibiano en más del 80% de los casos analizados (Stanley y Calderón, 1991). Como se ha descrito anteriormente esta proteína recombinante corresponde a una región de octapéptidos y dodecapéptidos repetidos en tandem ricos en serinas muy semejante a la estructura de los antígenos principales del circumsporozoito. La proteína nativa SREHP se localiza en la superficie de la membrana plasmática de los trofozoitos amibianos y puede fungir como un potente factor quimiotáctico para las amibas (Stanley y cols., 1995). Sin embargo, aun no se ha determinado una función específica de esta proteína que contribuya a la virulencia de la amiba.

Los anticuerpos restantes C8, C6F10, C5F1, C3 y C11G11 fueron negativos en el

reconocimiento de las dos proteínas recombinantes por presentar valores de absorbancia menores (Tabla 2). Estos anticuerpos monoclonales podrían reconocer a otras proteínas de superficie de *E. histolytica* relacionadas con la adhesión o citotoxicidad de la amiba. Dentro de este grupo podríamos destacar a las proteínas relacionadas con la adhesión como las adhesinas de 220, 150 y 112kDa (Rosales-Encina y cols., 1987; Cheng y cols., 1998; Arroyo y Orozco., 1987), las proteínas de 90, 70, 60, 50, 40 y 24kDa parcialmente caracterizadas en cepas deficientes de adhesión (Rodríguez y Orozco, 1994) y proteínas de la superficie celular con una función distinta a la adhesión como ha sido descrito por varios investigadores, entre las que destacan el receptor de la fibronectina, la neuroaminidasa, fosfolipasa A, sialogliproteínas, entre otras (Mann y Petri ., 1991). También existe la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales negativos estén dirigidos contra epitopos diferentes dentro de las proteínas nativas de 260kDa y SREHP y que no puedan ser evidenciados ya que las proteínas recombinantes utilizadas contienen sólo una parte de las proteínas nativas.

El anticuerpo monoclonal 3E2H9 tuvo un reconocimiento positivo para ambas proteínas, con un valor de absorbancia de 2.200 en ambos ensayos (Tabla 2). El comportamiento de este anticuerpo puede deberse al reconocimiento de un epitopo parecido presente en ambas proteínas o bien al reconocimiento cruzado favorecido por la linealidad de las proteínas recombinantes SREHP/TrpE y 170CR/GST. Sin embargo, estas dos posibilidades tendrían que demostrarse con experimentos de afinidad entre el anticuerpo y los dos antígenos; una prueba rápida para demostrar la especificidad de este anticuerpo, sería por la técnica de inmunodifusión doble. En donde la presencia de una banda de precipitación en forma de arco, nos indicaría que el anticuerpo reconoce a epitopos idénticos aunque no sea el mismo antígeno. Pero debido a la complejidad de este anticuerpo, lo descartamos para pruebas posteriores.

Tabla 2.- Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales con fluorescencia positiva (anti-proteínas de membrana) a los antígenos recombinantes 170CR/GST y SREHP/TrpE de *E. histolytica* mediante la prueba de ELISA.

ANTICUERPO MONOCLONAL	PROTEINA RECOMBINANTE 170CR/GST (Absorbancia)	PROTEINA RECOMBINANTE SREHP/TrpE (Absorbancia)
C3	0.511	0.417
C9F10	1.337	2.111
C8	0.557	0.743
C11E11	0.364	1.920
C6F10	0.543	0.251
C4C2	2.200	1.141
C16D3	1.074	2.200
C11G11	1.364	0.780
3D7E5	2.200	1.489
C5F1	1.867	1.447
C5E1	2.200	1.409
3E2H9	2.200	2.200

Nota: Valor de corte (media + 1 valor de la desviación estándar) para: 170CR/GST = 2.040 y SREHP/TrpE = 1.950 a una absorbancia de 414nm.

## **INHIBICIÓN DE LA ADHESION DE TROFOZOÍTOS DE *E. histolytica* (HM1:IMSS) A HEPATOCITOS HUMANOS (HepG2) MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

Los 6 anticuerpos monoclonales con reconocimiento positivo contra las proteínas recombinantes SREHP/TrpE o 170CR/GST fueron analizados con el fin de observar su papel en la inhibición de la adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* a células humanas en ensayos *in vitro*. En estos ensayos utilizamos la línea celular de hepatocitos humanos (HepG2), como célula blanco de la amiba (González-Valle, R., 1996).

Los anticuerpos monoclonales C9F10, C16D3 y C11E11 específicos contra la proteína recombinante SREHP/TrpE, tuvieron un efecto positivo en la inhibición de la adhesión (Tabla 3). La inhibición por estos tres anticuerpos monoclonales anti-SREHP fue determinada por la ausencia de agregados celulares heterotípicos (amiba-hepatocito) y por la gran cantidad de amibas aisladas ó en tetrámeros (pequeños agregados homotípicos) como se observa en las imágenes obtenidas al microscopio de contrastes de fases (Figura 8). Los trofozoítos de *E. histolytica* presentes en estas imágenes son las células de mayor tamaño con un gran número vacuolas en su interior y los hepatocitos son células pequeñas con una apariencia tersa (González-Valle, R., 1996). La morfología y tamaño de ambos tipos celulares también fue analizada por inmunofluorescencia indirecta en el microscopio confocal; en estas imágenes los trofozoítos se muestran teñidos en color verde (fluoresceína) y los hepatocitos en color rojo (rodamina) confirmando la inhibición de la adhesión de los trofozoítos a los hepatocitos (Figura 13A). El efecto inhibitorio con estos anticuerpos monoclonales fue muy similar al presentado por el grupo control positivo, en el que la adhesión fue inhibida con los monosacáridos *N*-Acetil-D-Galactosamina y *N*-Acetil-Glucosamina (Figura 12B), mientras que en comparación con el grupo control negativo (sin ningún inhibidor; anticuerpo ó azú-

Tabla 3.- Inhibición de la adhesión de los trofozoítos a hepatocitos humanos (HepG2) mediante los anticuerpos monoclonales anti-adhesinas de *E. histolytica* (170CR, SREHP y otras adhesinas) en un modelo *in vitro*.

ANTICUERPO MONOCLONAL	ANTIGENOS DE MEMBRANA	INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN
C9F10	SREHP	Positivo
C11E11	SREHP	Positivo
C16D3	SREHP	Positivo
C5E1	170CR	Positivo
3D7E5	170CR	Negativo
C4C2	170CR	Positivo
C6F10	Otras adhesinas	Positivo
C8	Otras adhesinas	Positivo
C5F1	Otras adhesinas	Positivo
C3	No adhesina	Negativo
C11G11	No adhesina	Negativo

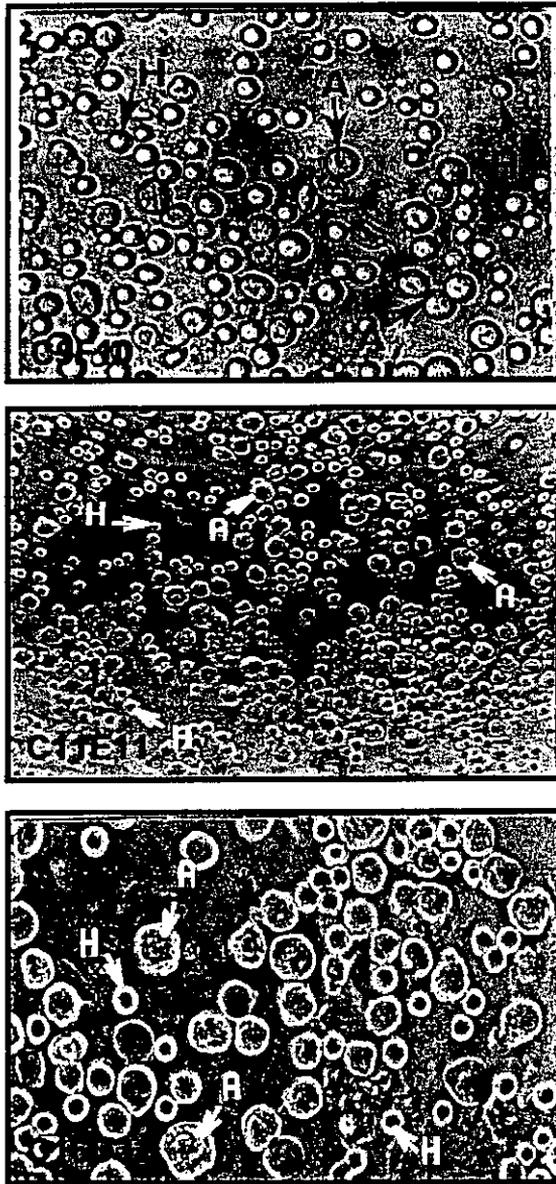


Figura 8.- Anticuerpos monoclonales positivos en la prueba de inhibición de la adhesión de trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) a hepatocitos humanos (HepG2). Este grupo de anticuerpos corresponde a los que reconocieron a la proteína recombinante SREHP. Las imágenes muestran el efecto en la inhibición de la adhesión celular por los anticuerpos monoclonales C9F10, C11E11 y C16D3. Los trofozoítos son las células más grandes (A) y los hepatocitos son las células pequeñas (H).

car) fue totalmente diferente ya que en este grupo se observó la formación de grandes agregados heterotípicos que dan la apariencia de racimos (Figura 12A).

Este efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-SREHP confirmó la participación de la proteína SREHP en los mecanismos de adhesión y la especificidad de estos anticuerpos por epítomos involucrados en el reconocimiento de hepatocitos humanos por la amiba (Ravdin y cols., 1981; Petri y cols., 1989 y 1994; Saffer y cols., 1991; Zhang y Stanley., 1994 y 1995). Cabe destacar que este efecto de inhibición de la adhesión ya ha sido demostrado por otros investigadores con un grupo de anticuerpos policlonales anti-SREHP (Zhang y Stanley., 1994 y 1995) y con otros tipos celulares (e.g células CHO y eritrocitos), pero favorablemente, nosotros logramos seleccionar tres anticuerpos monoclonales (C9F10, C11E11 y C16D3) que inhiben la adhesión de los trofozoítos a hepatocitos humanos y los posibles epítomos relacionados con los mecanismos de adhesión. La función de esta proteína SREHP en la actualidad no es clara, sin embargo, con estos datos podemos confirmar su importancia en los mecanismos de adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica*.

Los anticuerpos monoclonales C4C2 y C5E1 específicos contra la proteína recombinante 170CR/GST también tuvieron un efecto positivo en la inhibición de la adhesión (Tabla 3). las imágenes obtenidos en el microscopio de contrastes de fases mostraron que ambos anticuerpos lograron impedir la formación de los agregados celulares heterotípicos (amibas-hepatocitos) y en consecuencia solo se observó un gran número de trofozoítos y hepatocitos aislados (Figura 9). Las imágenes obtenidas por microscopia confocal, confirman este efecto inhibitorio, en el que los trofozoítos no se adhieren a los hepatocitos humanos (Figura 13B). Este efecto fue significativo al compararlo con el grupo control positivo, en donde el efecto inhibitorio es muy similar (Figura 12A), mientras que en el grupo control negativo es totalmente diferente ya que los trofozoítos muestran una gran adhesión celular formando grandes agregados celulares heterotípicos (Figura 12B). Por otra parte, el



Figura 9.-Los anticuerpos monoclonales C5E1, C4C2 y 3D7E5 reconocieron a la proteína recombinante 170CR/GST, pero solo los anticuerpos monoclonales C5E1 y C4C2 fueron positivos en la prueba de inhibición de la adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) a hepatocitos humanos (HepG2), mientras que el anticuerpo monoclonal 3D7E5 no tuvo este efecto. Los trofozoítos son las células más grandes (A) y los hepatocitos son las células pequeñas (H).

anticuerpo monoclonal 3D7E5 específico contra la proteína recombinante 170CR/GST, no tuvo efecto inhibitorio en el ensayo de adhesión (Tabla 3) ya que se observó a los trofozoítos formando agregados celulares heterotípicos similares a los del grupo control negativo, aunque de menor tamaño (Figura 9 y 12B).

La inhibición de la adhesión por los anticuerpos monoclonales C4C2 y C5E1 coinciden con los trabajos realizados por Petri y colaboradores (1989), donde se ha observado que anticuerpos policlonales contra la subunidad de 170kDa interfieren en la adhesión de los trofozoítos a células CHO en un 100%. Así mismo, Saffer y Petri (1990) encontraron que un grupo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la lectina inhibible por Galactosa (o de 260kDa) tienen la capacidad de inhibir la adherencia de la amiba y disminuir la citotoxicidad. Se ha descubierto que dentro de la subunidad pesada (170kDa) de la proteína nativa de 260kDa, existen tres regiones pépticas con diferente función (CP, PR y CR) de las cuales destaca la región CR (también definida como 170CR; ubicada en el carboxilo terminal) por su participación en la disminución del daño hepático en ratones inmunizados con este polipéptido (Soong Ch. y cols., 1994; Lotter y cols., 1997). Esta región de ~600 aminoácidos ha sido fragmentada en dos regiones 170CR1 y 170CR2 para determinar la secuencia peptídica correspondiente a la adhesión y se ha observado que la región 170CR2 confiere un mejor efecto protector en jerbos inmunizados que el fragmento 170CR1. De acuerdo a estos resultados, nosotros creemos que el anticuerpo monoclonal 3D7E5 que no inhibe la adhesión pudiera estar reconociendo un epitopo dentro del fragmento 170CR1 por lo que no tiene efecto en inhibir la adhesión celular. Sin embargo, puede ser relevante para la citotoxicidad celular ó en la inhibición del complemento como ha sido descrito en la subunidad pesada de 170kDa (Lotter y cols., 1997).

Complementariamente a estos resultados los anticuerpos monoclonales C8, C6F10, C5F1, C3 y C11G11 que no reconocieron a las proteínas recombinantes

170CR/GST y SREHP/TrpE en el ensayo de ELISA pero que fueron positivos para la fluorescencia de superficie (Tabla 2), fueron probados en el ensayo de adhesión, para comparar su función con respecto a los anticuerpos positivos contra la adhesina inhibida por Gal/Nac y a la proteína SREHP. De este grupo los anticuerpos monoclonales C8, C6F10 y C5F1 tuvieron un efecto positivo en inhibir la adhesión de la amiba a los hepatocitos humanos (Tabla 3). Las imágenes obtenidas al microscopio de contraste de fases, mostraron que estos tres anticuerpos monoclonales impidieron la formación de los agregados heterotípicos (Figura 10). Estos resultados parecen coincidir con los estudios realizados por otros investigadores donde se han encontrado otras proteínas de superficie involucradas en los mecanismos de adhesión y que presentan propiedades de adhesinas. De acuerdo a estas observaciones los anticuerpos monoclonales C8, C6F10 y C5F1 podrían estar dirigidos contra las adhesinas de 220kDa (Rosales-Encina y cols., 1987), 112kDa (Arroyo y Orozco., 1987), 150kDa (Cheng y Tachibana., 1998) o a las proteínas de 90, 70, 50 y 24kDa que parecen estar involucradas en el reconocimiento a la célula blanco y en el fenómeno de adhesión (Rodríguez y Orozco., 1994). Aunque también existe la posibilidad de que estos anticuerpos estén dirigidos contra otros epítomos de las proteínas de 260kDa ó SREHP que no están presentes en las recombinantes o bien que reconozcan epítomos de otras adhesinas no caracterizadas, por lo cual con esta herramienta podríamos determinar la relevancia de nuevas adhesinas en la patogenicidad de la amiba.

Finalmente los otros dos anticuerpos monoclonales de este grupo C3 y C11G11 no tuvieron un efecto positivo en la inhibición de adhesión celular (Tabla 3), ya que en las imágenes obtenidas en el microscopio de contraste de fases y confocal no se observó la inhibición de la adhesión de los trofozoítos a los hepatocitos, favoreciéndose la agregación celular entre ambos tipos celulares (Figura 11 y 13C). Sin embargo, no descartamos que estos anticuerpos puedan ser específicos contra otras proteínas encontradas en la fracción membranal de los trofozoítos de *E. histo-*

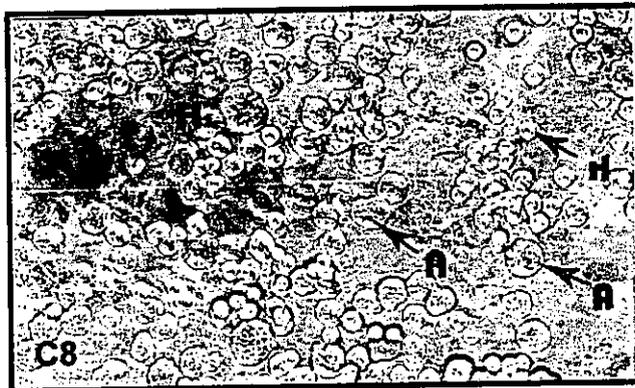
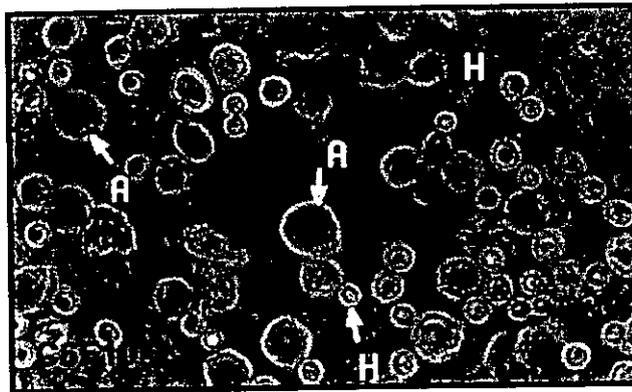
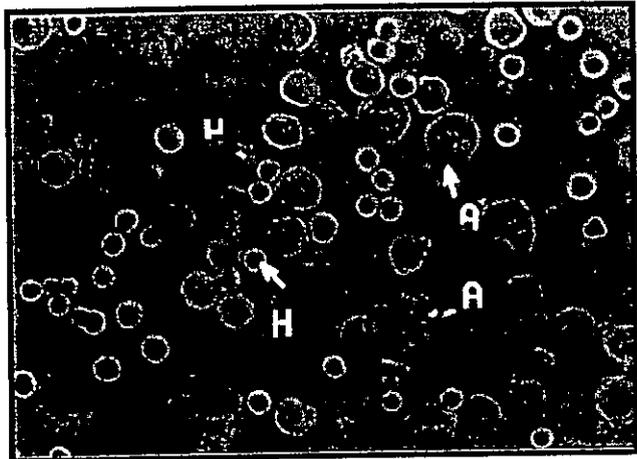


Figura 10.- Anticuerpos monoclonales positivos a la prueba de inhibición de la adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1: IMSS) a hepatocitos humanos (HepG2). Las imágenes muestran el efecto en la inhibición celular por los anticuerpos monoclonales C5F1, C6F10 y C8. En algunos casos se puede observar que formaron dímeros o trímeros de amibas (A), con 1 o 2 células hepáticas (H) unidas.

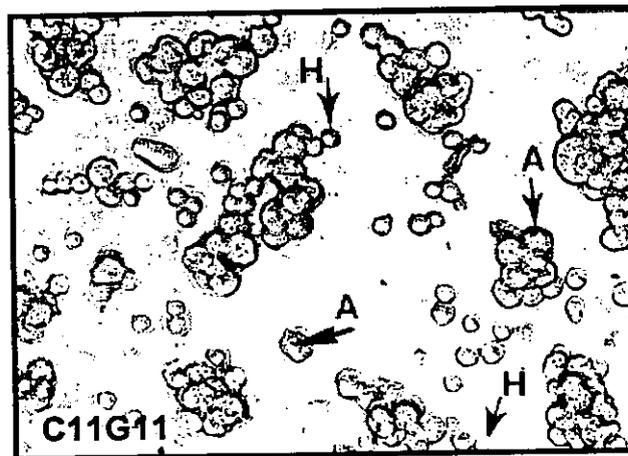
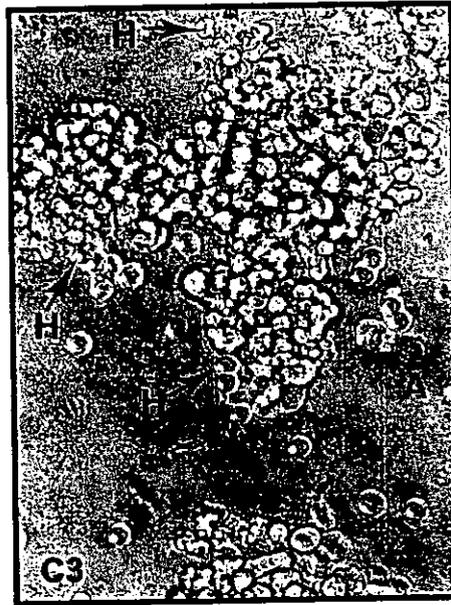


Figura 11.- Anticuerpos monoclonales negativos al ensayo de inhibición de la adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) a hepatocitos humanos (HepG2). Mostramos las imágenes de los anticuerpos monoclonales C3 y C11G11, los cuales no tienen efecto inhibitorio en la formación de agregados celulares entre las amibas (A) y los hepatocitos (H). Cabe destacar que estos anticuerpos monoclonales no reconocieron a las proteínas recombinantes SREHP/TrpE y 170CR/GST.

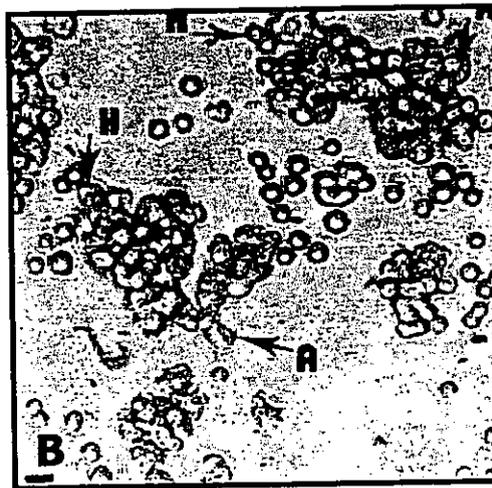
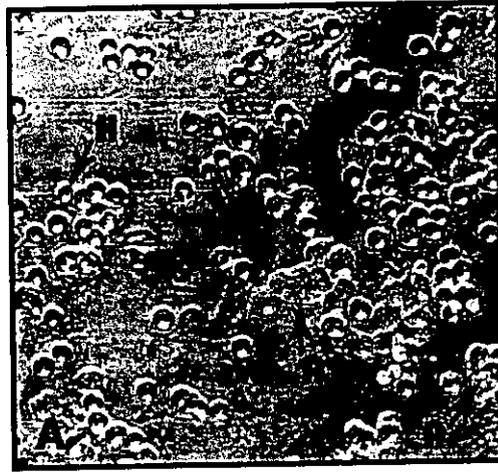


Figura 12.- Grupos controles para el ensayo de adhesión de los trofozoítos a hepatocitos humanos (HepG2). En la imagen inferior (A) se muestra el control positivo de inhibición de la adhesión, en esta condición la formación de agregados heterotípicos es inhibida por una mezcla de azúcares (Gluc/Nac y Gal/Nac). En la imagen superior (A) se muestra el control negativo de inhibición de la adhesión; los agregados heterotípicos de amibas y hepatocitos son observados en forma de racimos celulares. Las células de mayor tamaño son las amibas (A) en las que se distingue un gran número de vacuolas y las células más pequeñas son hepatocitos (H) que tienen una apariencia uniforme y tersa.

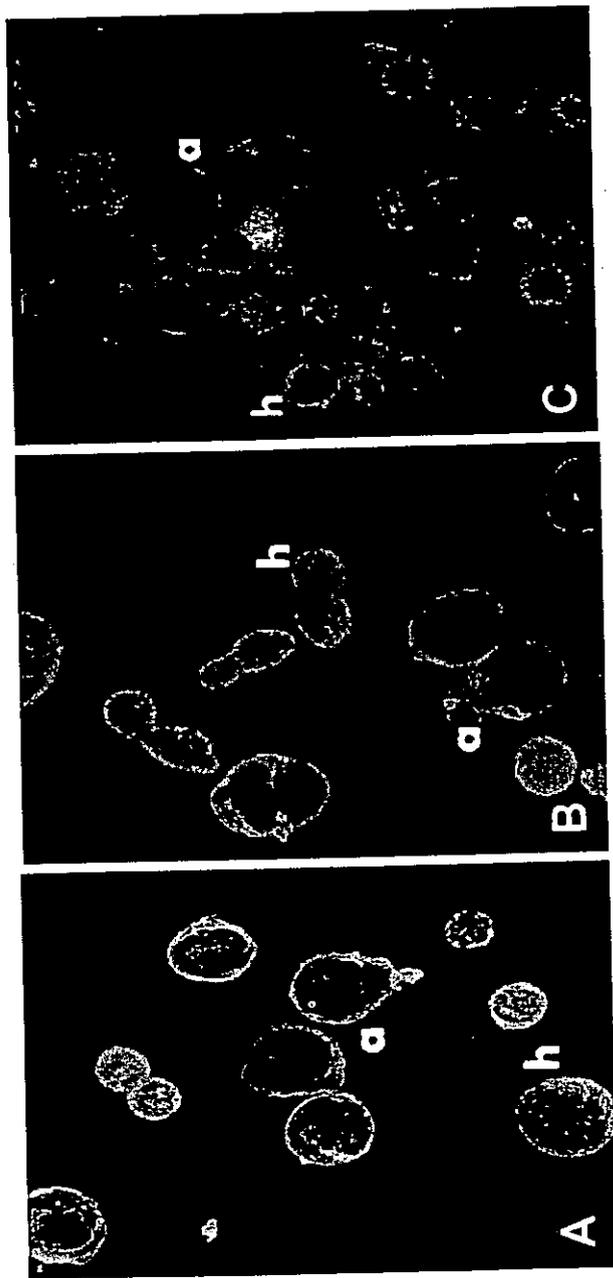


Figura 13.- Adhesión de trofozoítos de *E. histolytica* a células hepáticas humanas (HepG2) analizadas por microscopía confocal. En la primera micrografía (A) se puede observar el efecto inhibitorio del anticuerpo monoclonal C9F10 (reconoce a SREHP) en la adhesión de los trofozoítos (verde) a los hepatocitos humanos (rojo). En la segunda micrografía (B) también se puede observar la inhibición de la adhesión de trofozoítos y hepatocitos humanos por parte del anticuerpo monoclonal C5E1 que reconoce a la proteína de 170kDa y en la última micrografía (C) podemos observar a el anticuerpo monoclonal C3 que no inhibe la adhesión de los trofozoítos a los hepatocitos humanos y además de que no reconoce a las proteínas recombinantes SREHP/TrpE ó 170CR/GST.

*lytica* como proteasas, lipasas, fosfolipasa A y proteínas formadoras de poros (Mckerrow., 1993; Rosenberg., 1989).

Después de analizar estos dos grupos de anticuerpos monoclonales específicos y no específicos contra las proteínas recombinantes SREHP/TrpE y 170CR/GST (Tabla 3), es importante destacar el papel que tienen las proteínas que participan en la adhesión de la amiba para unirse a células hepáticas humanas y a otros tipos celulares descritos anteriormente. El efecto inhibitorio de la adhesión celular por los anticuerpos monoclonales contra estos dos principales antígenos de superficie coincide con el efecto que tiene otros anticuerpos policlonales y monoclonales producidos contra estos antígenos. En una forma indirecta la obtención de un anticuerpo que afecte la patogenicidad de la amiba nos daría pie a la obtención de una proteína relevante que podría ser considerada candidata para la generación de una vacuna en el ser humano a futuro. Comúnmente la caracterización de nuevas proteínas involucradas en los mecanismos de adhesión han sido obtenidas por el reconocimiento de anticuerpos monoclonales que bloquean la adhesión celular *in vitro* (Rodríguez y cols., 1994; González-Valle, R., 1996), la importancia de estas adhesinas en la patogenicidad sobre el hospedero también podría ser analizada en un modelo *in vivo* en roedores susceptibles a la infección por *E. histolytica* (jerbos, ratones SCID y hámster) mediante el desarrollo del absceso hepático (Petri y cols., 1994; Stanley y cols., 1994; Shibayama y cols., 1998) y de una manera indirecta el papel que tienen estos anticuerpos monoclonales en la inhibición celular *in vitro* podría ser determinado por la disminución del daño causado en el hígado. Por lo que para nosotros fue sugerente evaluar el papel protector que tiene los anticuerpos monoclonales C9F10 (anti-SREHP) y C5E1 (anti-170CR) que inhiben la adhesión de la amiba a hepatocitos humanos (*in vitro*) a través de en un ensayo *in vivo* en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica*, para valorar el daño hepático amibiano.

## VALORACION DEL PAPEL PROTECTOR DE DOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-ADHESINAS DE *E. histolytica* EN EL DAÑO HEPATICO AMIBIANO EN HÁMSTER.

### Porcentaje de protección.

En el grupo control, los 24 hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica* y tratados con IgG de ratón normal desarrollaron abscesos hepáticos (100% de los animales infectados), confirmando la sensibilidad del hámster a la infección por *E. histolytica* y la utilidad de este modelo para el estudio de los mecanismo de patogénesis de la amiba (Shibayama y cols., 1998). En este grupo, el porcentaje promedio de lesiones en el hígado fue de 30.8% (Figura 14), sin embargo, los porcentajes de lesión fueron variables desde un 3% a un máximo de 72.88%, destacando que hubo en el rango de 31 a 40% de lesión 7 hámsteres y en el rango de 11 a 20% de lesiones 5 hámsteres (Figura 15).

En el grupo experimental tratado con el anticuerpo monoclonal C5E1 (anti-170CR), de los 24 hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de amiba solo 12 hámsteres desarrollaron absceso hepático, con un efecto protector del 50% en cuanto al número de animales utilizados, lo cual coincide con los resultados de 50 y 60% de protección mediante la inmunización con la porción de 170kDa (Petri y Ravdin., 1991). En este grupo experimental, el porcentaje promedio de lesiones en el hígado fue del 17.8% (Figura 14), aunque estos porcentajes también fueron variables desde 5.98% hasta 34.97%, la mayor frecuencia de lesión fue en el rango de 21 a 30% con 4 animales (Figura 15).

En el grupo experimental de 24 animales infectados con trofozoítos de amiba y tratados con el anticuerpo monoclonal C9F10 (anti-SREHP), solo 5 hámsteres desarrollaron abscesos hepáticos con rangos de lesión entre 1 y 10% (Figura 14 y 15), protegiendo al 80% de los animales infectados. y con un promedio de lesiones

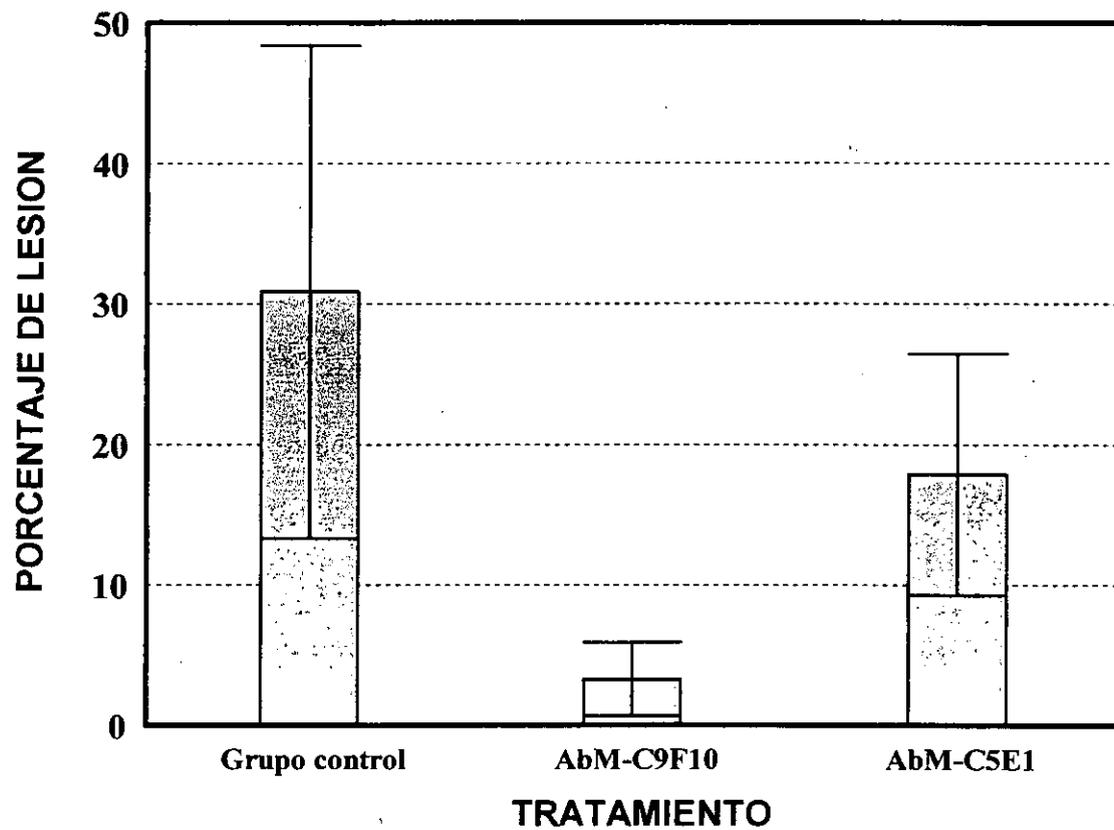


Figura 14.- Efecto de los anticuerpos monoclonales C9F10 (anti-SREHP) y C5E1 (anti-170CR) en la protección del daño hepático amibiano en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica*.

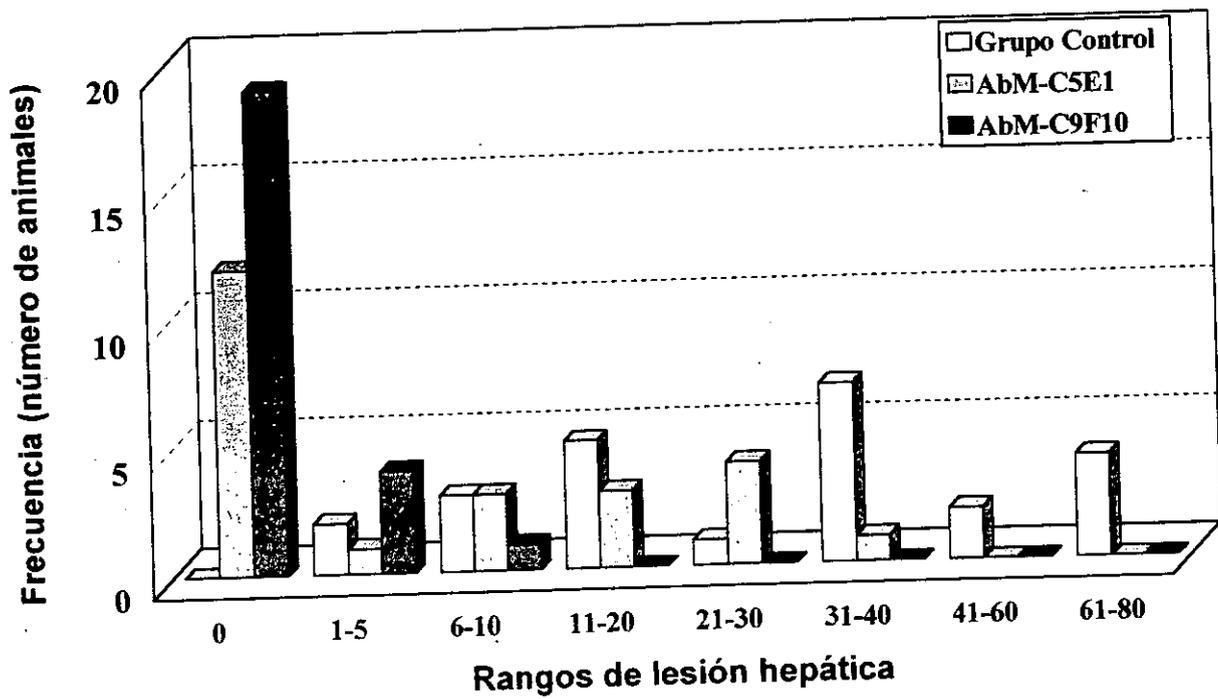


Figura 15.- Frecuencias de los porcentajes de lesión hepática en hámsteres infectados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica* e inmunizados pasivamente con los anticuerpos monoclonales C9F10 y C5E1.

de 3.2%. Este efecto del 80% de protección con el anticuerpo C9F10 es mas relevante que el del grupo tratado con el anticuerpo C5E1 con 50% de animales protegidos y el grupo control con 0% de animales protegidos. Cabe destacar que los hámsteres tratados con el anticuerpo monoclonal C9F10 desarrollaron abscesos hepáticos de un menor tamaño que los abscesos hepáticos observados en los hámsteres tratados con el anticuerpo monoclonal C5E1 y el grupo control tratado con IgG de ratón normal, de acuerdo a las imágenes obtenidas de los hígados examinados (Figura 16).

El análisis comparativo de los grupos experimentales y el grupo control mostró los siguientes resultados. Los hámsteres tratados con el anticuerpo monoclonal C5E1 (anti-170CR) desarrollaron abscesos hepáticos en la mitad de los hámsteres inmunizados con un porcentaje de lesión de 17.8%, mientras que el grupo control presentó un porcentaje de lesión más grande de 30.8%. La desviación estándar en ambos grupos fue grande (8.6 y 17.8 respectivamente), lo que conlleva a que se superpongan los rangos (Figura 14); pero el análisis estadístico con la prueba de ANOVA para dos factores demostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con el anticuerpo monoclonal C5E1 ( $P = 0.05$ ). Esta discrepancia puede deberse a la variación de los datos obtenidos y no quiere decir que el anticuerpo C5E1 no tenga un efecto protector importante en el desarrollo del absceso hepático amibiano. Esta variación era de esperarse ya que la respuesta ante la presencia de un microorganismo patógeno es diferente en cada individuo debido a las características genéticas. Sin embargo, creemos que el numero de hámsteres utilizados en esta prueba, ayudó a homogenizar el comportamiento de la población y a determinar el efecto protector del anticuerpo monoclonal C5E1.

El mecanismo probable por el cual, el anticuerpo monoclonal C5E1 protegió, puede ser porque el anticuerpo reconoce un epitopo involucrado en los mecanismos de adhesión y parece ser importante para la virulencia de la amiba de acuerdo a la dis-

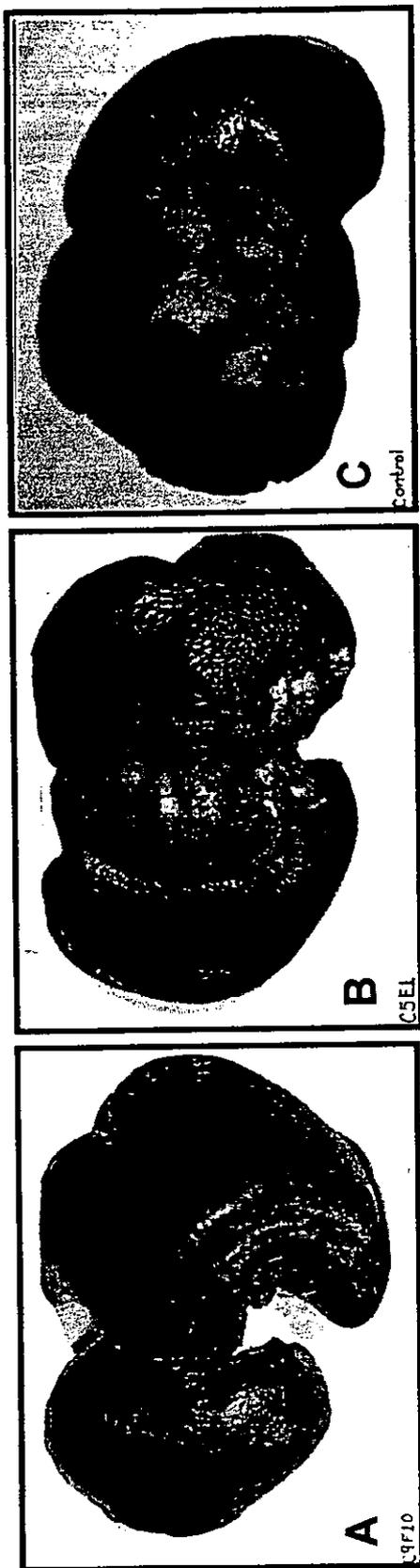


Figura 16.- Fotografías del daño hepático ocasionado por los trofozoitos de *E. histolytica* en presencia de anticuerpos monoclonales. A) En la fotografía de la izquierda se puede observar que el anticuerpo monoclonal C9F10 (anti-SREHP) impidió la formación de abscesos hepáticos en la mayor parte de la superficie del hígado. B) En la fotografía del centro se puede observar que el anticuerpo monoclonal C5E1 impidió parcialmente el daño ocasionado por las amibas ya que se observaron varios abscesos hepáticos de diferente tamaño. C) En la fotografía de la derecha se puede observar que los anticuerpos irrelevantes en el reconocimiento de la amiba (Igs de ratón normal) no tienen ningún efecto en la formación de abscesos hepáticos por lo que el tamaño y el número de los abscesos es abundante en la mayor parte de la superficie del hígado.

minución del daño hepático en el 50% de los animales infectados. Es importante probar diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal C5E1 ya que según antecedentes (González-Valle, R., 1996) a diferentes concentraciones el anticuerpo monoclonal C5E1 se comporta de manera muy diferente y es probable que a una concentración más alta pueda tener un mejor efecto en la protección del daño hepático amibiano. En trabajos recientes se ha propuesto que la región 170CR contiene los sitios potenciales de adhesión, citotoxicidad y evasión de la repuesta inmune, y que la inmunización en jerbos con el fragmento 170CR2 (aminoácido 939 al 1,053) protege en un 62%, mientras que la inmunización con la región completa (fragmentos 170CR1 y 170CR2) protege en un 81% (Lotter y cols., 1997). La protección obtenida con ambos fragmentos es diferente a nuestros resultados, pero no descartamos que el porcentaje de lesión en los hámsteres tratados con C5E1 pueda deberse a que los epitopos de citotoxicidad y evasión de la respuesta inmune encontrados en la subunidad pesada de 170kDa no son bloqueados totalmente ya que no debemos olvidar que nosotros estamos trabajando con un anticuerpo monoclonal (C5E1) que reconoce solo un epitopo. Por lo que consideramos que el efecto del anticuerpo monoclonal C5E1 sea una inhibición parcial del sitio de adhesión de la amiba sin evitar la acción de los otros epitopos dentro la región 170CR.

El anticuerpo monoclonal C9F10 que reconoce a la proteína recombinante SREHP/TrpE protegió al 80% de los animales infectados. En comparación con el grupo experimental tratado con el anticuerpo monoclonal C5E1 este parece conferir mejor protección en el modelo *in vivo*. La desviación estándar obtenida del grupo tratado con el anticuerpo monoclonal C9F10, muestra una clara diferencia significativa con el grupo C5E1 y el grupo control (Figura 14), al igual que con la prueba de ANOVA ( $P = 0.05$ ). La disminución del daño en presencia del anticuerpo C9F10 fue alto considerando que los hámsteres presentaron porcentajes de lesión menores al 10%, además de que en la mayoría de los hámsteres tratados no se desarrollo ninguna lesión (Figura 15). En trabajos anteriores también se ha

demostrado la importancia de la proteína SREHP en los mecanismos de virulencia de la amiba, por ejemplo la inmunización pasiva con anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante SREHP/TrpE protegió a los ratones inmunodeficientes (SCID) en un 100% (Zhang y Stanley., 1994) y la inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal murino específico para la región de repetidas en tandem (denominado 2D4) también protegió pero con una eficiencia menor al 30% (Zhang y Stanley., 1994). Por lo que el reconocimiento de un epítipo con una función de protección tan importante como lo es nuestro anticuerpo C9F10, es trascendental como herramienta para la localización de epítipos relevantes en el mecanismo de adhesión que pudiera ser la principal función de la proteína SREHP y que además protege de manera importante (80%) la formación de absceso hepático amibiano.

Nosotros creemos que la respuesta protectora del anticuerpo monoclonal C9F10 en el hámster pueda deberse principalmente a la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos como NK, eosinófilos y neutrófilos. La protección mediada por el sistema de complemento a través de su activación por anticuerpos (vía clásica) también es considerado un mecanismos potencial, aun cuando se ha observado que los trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS son resistentes a la lisis por complemento cuando son incubados *in vitro* con anticuerpos monoclonales (Mogyoros y cols., 1986). Finalmente el mecanismo principal por el cual el anticuerpo monoclonal C9F10 puede proteger contra el desarrollo del absceso hepático es por la propia inhibición de la adhesión de la amiba a los hepatocitos, considerando que la citolisis de las células del hospedero por los trofozoitos es dependiente de contacto (Ravdin y Guerrant., 1981; Arroyo y Orozco., 1987; Rosales-Encina., 1987). Por lo tanto los anticuerpos que bloquean la adhesión a las células del hospedero, pueden ser efectivos en prevenir el desarrollo de la infección amibiana. Esta conclusión nos llevó a realizar un análisis histológico de forma preeliminar para confirmar la protección de los anticuerpo monoclonales C5E1 y C9F10 al observar la estructura celular y las lesiones hepáticas presentes en cada

grupo experimental

### **Análisis histológico de las lesiones hepáticas.**

Para corroborar el grado de daño hepático causado por los trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de los anticuerpos monoclonales anti-adhesinas (C5E1 y C9F10) se realizaron cortes histológicos del hígado de diferentes zonas lesionadas. La mayoría de los cortes histológicos observados en el grupo control (inmunizado con IgG de ratón normal) presentaban abscesos hepáticos múltiples de agudos a subcrónicos con infiltrado inflamatorio agudo, sangre hemolizada y colágena. En algunos abscesos se encontraron trofozoítos, necrosis coagulativa severa e infiltrado celular (Figura 17). La causa principalmente de estas lesiones se puede deber a que los trofozoítos provocan necrosis lítica del parénquima y de la pared vascular.

En el grupo inmunizado con anticuerpo monoclonal C5E1, se pudieron observar abscesos hepáticos sobreagudos de gran tamaño (aislados) o abscesos múltiples en algunas regiones del hígado e infiltrado inflamatorio periportal de moderado a severo con diferentes tipos celulares como polimorfonucleares y eosinófilos. En otras zonas lesionadas se observaron trofozoítos en degeneración, necrosis y tejido en reparación donde se observa colágena y neovascularización (Figura 18C). Sin embargo, se observaron regiones en el hígado sin daño aparente, por lo cual no descartamos la posibilidad de que este anticuerpo tenga un efecto importante en la disminución de las lesiones ocasionadas por la amiba y su relación con la inhibición de porcentaje del daño hepático amibiano en el 50% de los hámsteres infectados, considerando que el efecto protector de este anticuerpo sea mediante el reconocimiento a un epitopo importante de la proteína nativa de 170kDa que el trofozoito requiere para adherirse al hepatocito, en consecuencia se evita la activación de los factores de citotoxicidad dependientes de contacto y el daño ocasionado al tejido hepático.

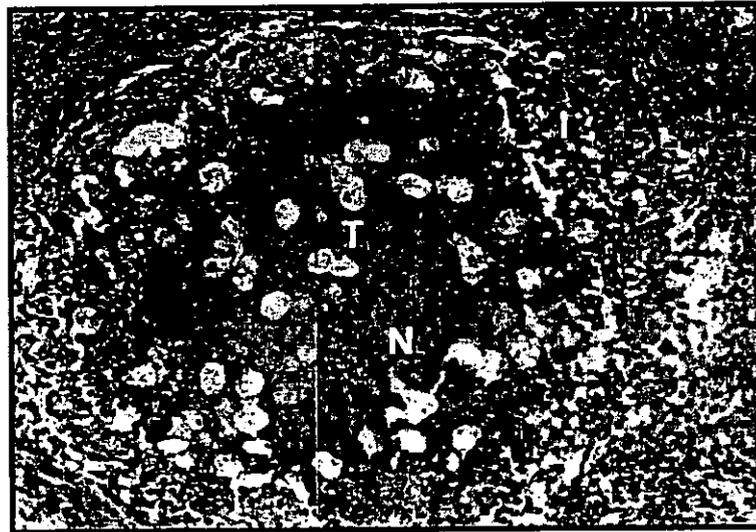
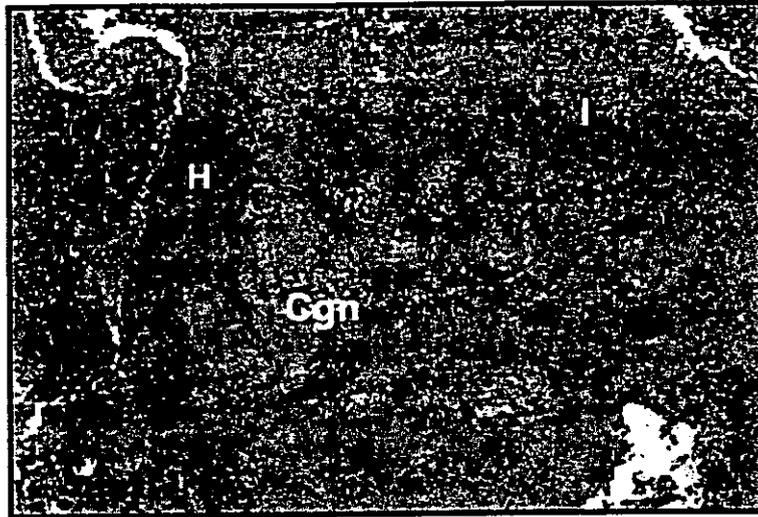


Figura 17.- Cortes histológicos del hígado del hámster tratado con IgG de ratón normal. En la imagen superior se muestra lesión producida por la amiba; presencia de sangre hemolizada (H), infiltrado inflamatorio (I) y colágena (Cgn) (Aumento 400X). En la imagen inferior se muestra un absceso en el que se observa necrosis central coagulativa severa (N), trofozoítos en degeneración (T) e infiltrado inflamatorio (I) (Aumento 800X).

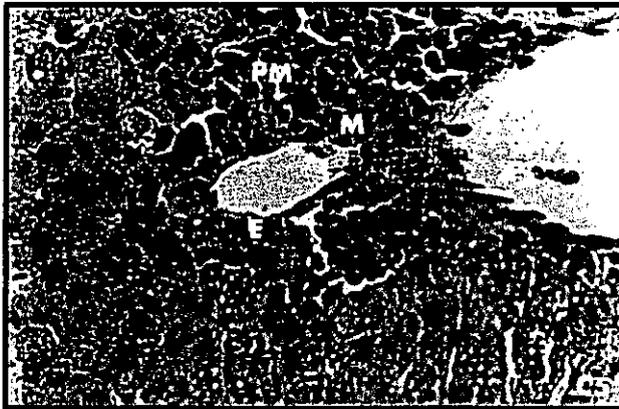
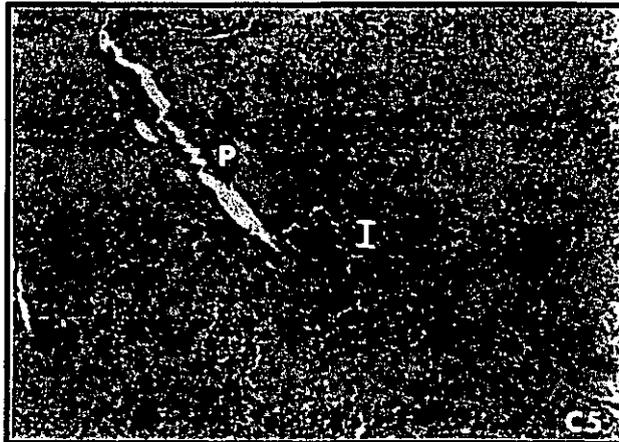


Figura 18.- Cortes histológicos del hígado del hámster tratado con el anticuerpo monoclonal C5E1(anti-170CR). En la imagen superior se observa infiltrado celular (I) moderado en la vena porta (P)(400X). En la imagen central se muestra infiltrado celular de polimorfonucleares (PM), células mononucleares (M) y eosinófilos (E)(800X). En la imagen inferior se observa tejido de reparación con presencia de colágena (Cgn) y neovascularización (Nv)(800X).

El grupo inmunizado con el anticuerpo monoclonal C9F10 presentó abscesos pequeños y únicos cercanos a la cápsula, sin trofozoítos con escaso infiltrado celular en el espacio portal y con hepatocitos que presentan esteatosis la cual es una lesión reversible (Figura 19); probablemente los trofozoítos que penetraron fueron rápidamente destruidos, por lo que el daño observado no es considerable ya que la mayor parte del hígado mantiene la estructura morfológica normal. Estas observaciones corroboran el efecto protector del anticuerpo monoclonal C9F10 que reconoce a la proteína SREHP, en la disminución de las lesiones del hígado en el 80% de los hámsteres infectados, sin embargo, hasta el momento no se sabe qué función tenga la proteína SREHP y la forma en que pudiera estar participando en la protección del daño amibiano, pero de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo nosotros creemos que este anticuerpo al unirse a un epitopo de la proteína nativa SREHP impide el contacto del trofozoíto a su célula blanco y se bloqueen los mecanismos de citotoxicidad del trofozoíto, dependientes de contacto.

El grupo tratado con el anticuerpo monoclonal C9F10, en comparación con el grupo tratado con el anticuerpo monoclonal C5E1 y el grupo control presentó un mejor efecto protector, lo que nos refleja el efecto que puede tener cada uno de estos anticuerpos en la protección del daño hepático amibiano de acuerdo a su especificidad y la función de estas proteínas (170CR y SREHP) en los mecanismos de virulencia de la amiba.



Figura 19.- Cortes histológicos del hígado del hámster tratado con el anticuerpo monoclonal C9F10 (anti-SREHP). En la imagen superior se muestra un absceso (Abs) pequeño único por debajo de la cápsula (800X). En la imagen central se observa la vena porta (P) con infiltrado celular de leve a moderado (400X) y en la imagen inferior se observa a la vena central (C) con daños que aún son reversibles (400X).

## CONCLUSIONES

I) Del lote de 18 anticuerpos monoclonales probados; 12 anticuerpos monoclonales reconocen proteínas de membrana externa de *E. histolytica* mientras que los 6 anticuerpos restantes no reconocen a proteínas de membrana externa.

II) Los anticuerpos monoclonales C4C2, 3D7E5 y C5E1 reconocen a la proteína recombinante 170CR/GST, mientras que los anticuerpos monoclonales C16D3, C9F10 y C11E11 reconocen a la proteína recombinante SREHP/TrpE.

III) Los anticuerpos monoclonales C5E1 y C4C2, específicos contra la proteína recombinante 170CR/GST inhiben la adhesión de los trofozoítos a células hepáticas humanas en un modelo *in vitro*. Los anticuerpos monoclonales C9F10, C11E11 y C16D3 específicos contra la proteína recombinante SREHP/TrpE inhiben la adhesión de los trofozoítos a células hepáticas humanas en un modelo *in vitro*.

IV) La inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal C9F10 tuvo un efecto protector en el 80% en los hámsteres infectados (5 / 24), mientras que el anticuerpo monoclonal C5E1 protegió el 50% de hámsteres infectados (12 / 24).

## BIBLIOGRAFÍA

Arroyo R. y Orozco E. 1987. Localization and identification of *Entamoeba histolytica* adhesin. Mol. Biochem. Parasitol. 23: 151-158.

Ávila E. y Calderón J., 1993. *Entamoeba histolytica* trophozoites: A superface associated cysteine protease. Exp. Parasitol. 76: 232-241.

Bayer, E. A. y Wilchek, M. 1980. The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. Methods Biochem. Anal. 26: 1-45.

Braga, L., Ninomiva, H., McCoy, J. y cols. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 90:3 1131-7

Brown, H.W. y Neva, F.A. 1983. Basic Clinical Parasitology, Fifth Edition. Englewood Cliffs: Prentice/Hall International Inc. pp. 119-126.

Burchard G. y Bilke R. 1992. Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. Parasitol Res. 78: 146-153.

Calderón J., Muñoz M. y Acosta H. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. J. Exp. Med. 151: 184-193.

Caballero y cols. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 412-419.

Diamond, L., Harlow, D. y Cunnick, C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:4 431-2.

Dodson J. y cols., 1999. Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. J. Infect. Dis. 179: 460-466.

Cheng X., Kaneda, Y. y Tachibana H. 1999. Protection of hamsters from amebic abscess formation by a monoclonal antibody to a 150kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Res. 85: 78-80.

Cheng X., Kaneda, Y. y Tachibana H. 1998. Identification of the 150kDa surface antigeno of *Entamoeba histolytica* as a galactose- and *N*-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. Parasitol. Res. 84: 632-639.

Espinosa-Cantellano, M. y Martínez-Palomo, A. 1991. *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. Exp. Parasitol. 79: 424-435.

Garvey, J.S., Cremer, N.E., y Sussdorf, D.H. (1977) In: Methods in Immunology. Pub. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Readings Mass. pp 545

González-Valle, M. R., 1996. Tesis de Maestría en Biología Celular. Estudios de adhesinas de *E. histolytica* mediante anticuerpos monoclonales. CINVESTAV-IPN, México D. F. p: 1-33.

Hermanson G. T. 1996. Bioconjugates techniques. Academic Press, Inc. San Diego, CA.

Keene W., Hidalgo M., Orozco E. y Mckerrow J. 1990. *Entamoeba histolytica*:

correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp. Parasitol.* 71: 199-206.

Lee G. L. 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>ra</sup> Edición. Ed. Mc Graw Hill book company. USA.

Leippe M. y Müller-Eberhard H. 1994. The pore forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicol.* 87: 5-18.

Li, E., Becker, A. and Stanley, S. L., Jr. Use of Chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion. *J. Exp. Med.* 167:1725-1730, 1988.

López R., Montfort I. y Pérez-Tamayo R. 2000. Galactose specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 86: 226-231.

Lotters H., Zhang T., Seidel K., Stanley S. y Tannich E. 1997. Identification of Epitope the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring Antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J. Exp. Med.* 10: 1793-1801.

Mann, B., Torian, B., Vedbick, T. y Petri, W. 1991. Sequence of the cysteine-rich heavy subunit of the galactose lectin of *E. histolytica*. *Am. J. Med. Sci.* 297: 163-167.

Mann B. y Petri W. 1991. Cell surface proteins of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Today.* 7: 173-176.

Martínez-Palomo. A. 1993. Parasitic amebas of the intestinal tract. *In* " Parasitic Protozoa " (Kreier, J. P., and Backer, J. R., Eds.), 2<sup>nd</sup> ed., p. 65-141. Academic

Press, New York.

Mckerrow J., Sun E., Rosenthal P. y Bouvier J. 1993. The proteases and pathogenesis of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 821-853.

Mogyoros M., Calef E. y Gitler C. 1986. Virulencia of *Entamoeba histolytica* correlates with the capacity to develop complement resistance. *Isr. J. Med. Sc.* 22: 915-917.

Mora-Galindo J., Martínez-Palomo A. y Chávez B. 1978. Interacción entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. *Arch. Invest. Med.* 9 [Suppl. 1]: 261-274.

Muñoz M., Rojkind M., Calderón J., Tanimoto M., Arias S. y Martínez-Palomo A. 1984. *Entamoeba histolytica*: Collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool* 31: 468-470.

OMS/PAHO/UNESCO: Reporte de una consulta de expertos en amebiasis. Reporte semanal epidemiológico de la OMS. 72: 97-9.

Petri, W., Smith R. Schlesinger P. y Ravdin J. 1987a. Isolation of the galactose binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80: 1238-1244.

Petri W., Joyce M., Broman J. y Ravdin J. 1987b. Reconognition of the galactose or N-acetyl-galactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect. Immun.* 55: 2327-2331.

Petri W., Chapman M., Snodgrass T., Mann BJ. Broman J. y Ravdin J. 1989.

Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 264: 3007-3012.

Petri W. y Ravdin J. 1991. Protection of gerbils from amebic liver abscess by with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Infec. Immun. 59: 97-101.

Petri, W., Graham C. y Diamond, L. 1994. Host-parasite relationships in amebiasis: Conference report. J. Infect. Dis. 169: 483-484.

Petri, W.A. 1996. Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: fom lab bench to bedside. J. Investig. Med. 44: 24-35.

Ragland B., Vaux D., y Petri W. 1994. *Entamoeba histolytica*: Target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. Exp. Parasitol. 79: 460-467.

Ramakrisnan G., Ragland B., Purdy J. y Mann B. 1996. Physical mapping and expression of gene encoding the N-acetyl-D-galactosamina adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Mol. Microbiol. 19: 91-100.

Ravdin, J. y Guerrant, R. 1981. Role adherence in citopathogenic, mechanisms of *Entamoeba histolytica* study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68: 1305-1313.

Rodríguez M., Hernández F., Santos L. y Orozco E. 1989. *Entamoeba histolytica*: Molecules involved in the target cell-parasite relationship. Mol. Biochem. Parasitol. 37: 87-100.

Rodríguez M., Orozco E. y Arroyo R. 1994. Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites involved in the adhesion to target cells. Arch Med. Res. 25 (2): 205-210.

Rosales-Encina J., Meza I., López A., Talamás P. y Rojkind M. 1987. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. J. Inf. Dis: 156: 790-797.

Rosenberg y cols. 1989. Isolation, characterization, and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 327-248.

Saffer L. y Petri W. 1991. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. Infect. Immun. 59: 4681-4683.

Santos L. y Orozco E. 1991. Characterization of proteins from *Entamoeba histolytica* which participate in the interaction of target cells from different species. Arch. Invest. Med. 21 (Suppl. 1): 197-202

Seydel K. y Stanley S. 1998. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. Infect. Immun. 66: 2980-2983.

Soong, C., Kain, K., Abd-Alla, Jackson, T. y Ravdin, J. 1994. A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectina is efficacious as unit vaccine in the gerbils model of amebic liver abscess. J. Infect. Dis. 171: 645-651.

Stanley S., Jackson T., Reed S. y Calderón J. 1991. Serodiagnosis of invasive

- amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. JAMA. 266: 1984-1986.
- Stanley, S. 1990. Cloning on expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4976-4980.
- Stanley, S. 1994. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* and human erythrocytes. J. Immunol. Meth. 166: 243-250.
- Stanley, S, Zhang T. y Rubin D. 1995a. Role of *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. Infect Immun. 63: 1587-1590.
- Stanley S., Tian K., Koster J. y Li E. 1995b. The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetyl-glucosamine residues. J. Biol. Chem. 270 (8): 4121-4126.
- Shibayama M., Campos R., Ramirez A., y Tsutsumi V. 1998. *Entamoeba histolytica*: Liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters, *Mesocricetus auratus*. Exp. Parasitol. 88: 20-27.
- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). Reporte semanal. Semana 44 del 2000.
- Takeuchi A. y Phillips B. 1975. Electron microscope studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea pig. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 34-48.

Tavares P., Sansonetti P. y Guillén N. 2000. Cell polarization adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Microbes Infect.* 2: 643-649.

Tran V., Herdman D., Torian B. y Reed S. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect. Dis.* 177: 508-511.

Velázquez, C., Valette, I., Cruz, M., Labra, M., Montes, J., Stanley, S. y Calderón, J. 1995. Identificación of immunogenic epitopes of the 170-kDa subunit adhesin of *Entamoeba histolytica* in patients with invasive amebiasis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995. 42: 636-641.

Velázquez C., Shibayama M., Aguirre J., Tsutsumi V. y Calderón J. 1998. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasitol. Immun.* 20: 255-262.

Young, J., Young T., Lu L., Unkeless J. y Cohn Z. 1982. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156: 1677-1690.

Young, J. and Cohn, A. Z. 1985. Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*. *J. Cell. Biochem.* 29: 299-308.

Walsh J. A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In " Amebiasis. Human infections by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin. 1<sup>ra</sup> Ed. p. 83-105. Churchill Livingstone, London.

Zhang Y., Li E., Jackson T., Zhang T. y Stanley S. 1992. Use of a recombinant 170-

kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domains of the native molecule. J. Clin. Microbiol. 30: 2788-2792.

Zhang T., Cieslak L., Foster C., Kunz-Jenkins y Stanley S. 1994. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Parasite Immunol. 16: 225-230.

Zhang T., Li E., y Stanley S. 1995. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SERHP antibody response. Infect. Immun. 63: 1349-1355.

## APÉNDICE

### MEDIOS DE CULTIVO Y PREPARACION DE SOLUCIONES

#### MEDIOS

##### BI-S-33

Para preparar 1,600 ml de medio:

- Biosato (peptonas)	55.17g
- Glucosa	18.39g
- NaCl	3.678g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.839g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.103g
- L-Cisteína hidrociorada	1.839g
- L-Ácido ascórbico	0.367g
- Citrato de amonio ferrico	0.051g

Mezclar todos los componentes y repartir 10ml por tubo, en tubos con tapón de rosca de 13ml. Esterilizar por autoclave durante 15min a 121°C, 15 lb y enfriar a temperatura ambiente. El medio BI-S-33 al momento de su uso, fue suplementado con suero bovino adulto al 10%.

##### DMEM (Medio Dulbeco Modificado).

- Suero fetal bovino	10 %.
- Piruvato	11 mg.
- Aminoácidos no esenciales	0.1 mM.
- L-glutamina	2.0 mM.
- Bicarbonato	0.075 %.
- Penicilina	100 U/ml.
- Estreptomicina	100 µg/ml.

## SOLUCIONES

### Solución Reguladora de Fosfatos Salina (PBS), pH 7.4.

- Fosfato Básico de Sodio ( $\text{NaHPO}_4$ ) 71 g (0.5M)
- Fosfato Dibásico de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 69 g (0.5M)
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ) 87.6 g (1.5M)

Diluir en 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, ajustar a pH 7.4 y aforar a 1000ml con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .

Preparar la solución de trabajo 1X, concentración final de fosfatos 0.01M y cloruro de sodio 0.15M.

### Solución Reguladora de Fosfatos Salina (PBS), pH 6.3.

- Fosfato Básico de Sodio ( $\text{NaHPO}_4$ ) 12.42 g (17.5mM)
- Fosfato Dibásico de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 12.07 g (17.5mM)
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ) 7.3 g (250mM)

Diluir en 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, ajustar a pH 6.3 y aforar a 500ml  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .

### Sulfato de Amonio Saturado (SAS).

- En 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada agregar 400g sulfato de amonio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], disolver por calor y seguir agregando sulfato de amonio hasta saturar la solución y ajustar a pH 7.4 con hidróxido de amonio ( $\text{NaOH}$ ) 2N. Filtrar la solución y almacenar a temperatura ambiente.

### Solución Reguladora de Fosfatos (PB).

- A) Fosfato Dibásico de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2.485 g /1000 ml (17.5mM)
- B) Fosfato Básico de Sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 2.553 g /1000 ml (17.5mM)

Tomar 975 ml de la solución A y agregar la solución B hasta alcanzar un pH 6.3.

Solución Reguladora de Fosfatos Ácido y Básico Salino (APS).

- Fosfato Básico de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ) 0.18 g (15mM).
- Fosfato Dibásico de Potasio ( $\text{K}_2\text{PO}_3$ ) 0.23 g (15 mM).
- Cloruro de sodio (NaCl) 10.22 g (175mM).

Diluir en 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, ajustar a pH 7.0 y aforar a 1000ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Mezcla de Fijadores:

- Formaldehído 3.7ml (3.7 %).
- Glutaraldehído 7.5 $\mu$ l (0.0075 %).

Tomar la cantidad marcada de cada fijador y aforar a 100 ml de APS.

Solución Reguladora de Fosfatos Ácido y Básico (AP).

- Fosfato Básico de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ) 11.9 g (100mM).
- Fosfato Dibásico de Potasio ( $\text{K}_2\text{PO}_3$ ) 15.6 g (100mM).

Diluir en 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, ajustar a pH 7.2 y aforar a 1000ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Colorante Azul de Evans:

- Azul de Evans 0.25 mg (0.0025 %).

Disolver el colorante en 90 ml de la solución reguladora PB (0.1 M, pH 7.2) y aforar a 100ml con PB..

#### Solución Reguladora de Carbonatos.

- A) Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.59 g / 1000 ml (15mM)
- B) Bicarbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ) 2.93 g / 1000 ml (28mM)

Mezclar ambas soluciones y ajustar el pH a 9.6 agregando el volumen necesario de la solución B) y almacenar a 4°C.

#### PBS-Tween 0.05%

Disolver 0.5 ml del detergente Tween 20 en 100ml de PBS 10X y aforar con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a 1000ml.

#### PBS-Tween-BSA 1.0%.

- Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0.25 g
- PBS-Tween 25ml.

Agregar la albúmina sérica en PBS-Tween y mezclar por agitación hasta disolver completamente.

#### ABTS (2,2-Azino-di-etil-benziazolinsulfato)

- A) Ácido cítrico 4.80 g / 250 ml (0.1M)
- B) Fosfato de sodio dibásico 7.09 g / 250 ml (0.2M)

Adicionar 250 ml de la solución A mas 240 ml de la solución B hasta obtener un pH 4.6. Posteriormente agregar ABTS a una concentración de 5.4 mg / 10ml del amortiguador de Citratos-Fosfatos y almacenar en alícuotas de 10 ml a -20°C.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CHO	Células epiteliales del ovario del hámster chino
170CR	Proteína recombinante de la región rica en cisteínas de la subunidad pesada de 170kDa
SREHP	Proteína de <i>Entamoeba histolytica</i> rica en serinas
kDa	Kilodaltones
GST	Glutación S transferasa
TrpE	Antranilato sintetasa
ELISA	Inmunoensayo enzimático de fase sólida
Ig	Inmunoglobulinas
ABTS	2,2-Azino-di-etil-benziazolinsulfato
PBS	Solución reguladora de fosfatos salino
BSA	Albúmina sérica bovina
AP	Solución reguladora de fosfatos ácido y básico
APS	solución reguladora de fosfatos ácido y básico salino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
DEMEM	Medio Dulbeco modificado
DMSO	Dimetilsulfoxido
SAS	Sulfato de amonio saturado
Gal/GalNac	Galactosa y <i>N</i> -Acetil-D-Galactosamina
SCID	Ratones con inmunodeficiencia severa combinada

## GLOSARIO

**Absceso hepático amibiano:** Complicación común de la amibiasis extraintestinal. Los abscesos se presentan en forma de pus, en donde la región del parénquima hepático es sustituido por restos necróticos con escasos trofozoítos y células inflamatorias. El color fluido puede variar de amarillento hasta café oscuro.

**Adhesina:** Proteínas de microorganismos patógenos involucradas directamente en la adhesión específica a la célula blanco, consideradas como factores patogénicos.

**Adhesión celular:** Fenómeno de unión de las superficies celulares expuestas en contacto; se debe a la acción de fuerzas intermoleculares.

**Adhesina de 260 kDa:** Proteína con propiedades de lectina que se unen a carbohidratos (Gal/GalNac) de glicoproteínas de la célula blanco. Formada por dos subunidades una pesada de 170kDa y otra ligera de 35kDa.

**Afinidad:** Fuerza de unión de una molécula a otra en un sitio específico.

**Amibiasis hepática:** Infección de la amiba en el hígado provocada por la penetración a la capa muscular y migración de los trofozoítos a través de la vena porta hacia el hígado.

**Anticuerpos monoclonales:** Anticuerpo producido por una sola clona de célula plasmática.

**Anticuerpos policlonales:** Anticuerpo producido por varias clonas células plasmáticas.

**Apoptosis:** Muerte celular programada. Mecanismo por el cual las células son inducidas a morir como un proceso natural de protección o por mecanismos patológicos.

**Biotina:** Marcador covalente de macromoléculas, detectada por su alta afinidad de unión a avidina o estreptoavidina.

**Citotoxicidad dependiente de contacto:** Mecanismo por el cual los trofozoítos después de adherirse son capaces de lisis a la célula blanco.

**Colonización amibiana:** Mecanismo por el cual los trofozoítos liberados se establecen en la región colónica para multiplicarse e invadir al hospedero.

**Enfermedad asintomática amibiana:** Personas infectadas por *E. histolytica* que no desarrollan síntomas de la enfermedad pero son portadores de la amiba.

**Enfermedad sintomática amibiana:** En amibiasis las personas infectadas con *E. histolytica* desarrollan la enfermedad y son valoradas por la sintomatología presentada.

**Estreptoavidina:** Proteína de unión a biotina de 68kDa.

**Evasión de la respuesta inmune:** mecanismo por el cual el parásito escapa a los mecanismos de defensa del huésped, como la mimetización de los antígenos, bloqueo del reconocimiento de los anticuerpos, la variación antigénica y la inmunosupresión.

**Hibridomas:** Célula producida por la fusión de linfocito B (productor de anticuerpo específico) a una célula de mieloma.

**Huésped:** Organismo a cuyas expensas vive un parásito.

**Inmunización pasiva:** Inyección de anticuerpos o suero inmune dentro de un organismo.

**Lectina:** Proteínas con afección por azúcares simples.

**Líquido ascítico:** Acumulación de fluidos en la cavidad peritoneal produciendo hinchazón, puede deberse a una infección, hipertensión portal y la formación de tumores.

**Lisis celular:** Destrucción de las membranas celulares.

**Necrosis:** Muerte celular en un tejido como resultado del daño por infección o por la pérdida de irrigación sanguínea.

**Patógeno:** Productor causante de una enfermedad.

**Polarización (capping):** Mecanismo por el cual la ameba moviliza los anticuerpos unidos a su membrana hacia una región de la ameba, donde se cree que pueden ser eliminados como un mecanismo de la evasión de la respuesta inmune.

**Proteína nativa:** Proteína a partir de la célula original.

**Proteína recombinante:** Proteína sintetizada a partir de los genes clonados y purificada por marcadores de selección.

**Proteína rica en serina de *Entamoeba histolytica*:** Proteína pequeña de 47-52kDa rica en serinas, sin propiedades de lectina. La estructura primaria es similar a los

antígenos repetitivos de la malaria y parece estar relacionada con los mecanismos de adhesión y la migración de amibas.

**Proteínas totales de membrana:** Fracción celular obtenida por centrifugación que nos permite separar las proteínas de las membranas de los trofozoítos de *E. histolytica*.

**Proteolipoesferas:** Esferas de silica gel recubiertas con lípidos sintéticos y proteínas de la fracción membranal total de *E. histolytica*.

**Quiste:** Fase del ciclo de vida de *E. histolytica* en la que la amiba se encierra en una membrana resistente e impermeable que la aísla del exterior.

**Regeneración:** Parte del proceso de reparación por el cual un tejido dañado activa la replicación celular para sustituir a las células muertas y mantener el tejido funcional.

**Reparación:** Proceso llevado a cabo por un tejido después de que ha sido lesionado, en la que se activan los mecanismos que limitan el daño y preparan a las células sobrevivientes para replicarse. El proceso de reparación consta de dos mecanismos: regeneración del tejido lesionado por células parenquimatosas del mismo tipo y sustitución por tejido conectivo cuando el daño no es reversible.

**Trofozoíto:** Fase del ciclo de vida de *E. histolytica* en la que coloniza el colon del huésped donde se alimenta de bacterias y restos celulares. Es la única forma infectiva.

**Valor de Corte:** Valor promedio de las absorbancias más una desviación estándar para seleccionar a los anticuerpos monoclonales con un alto reconocimiento contra el antígeno correspondiente.

**Variación antigénica:** Algunos protozoarios parásitos cambian sus antígenos de superficie durante el curso de una infección. Los parásitos con los nuevos antígenos escapan a la respuesta inmune contra los antígenos originales.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**