

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



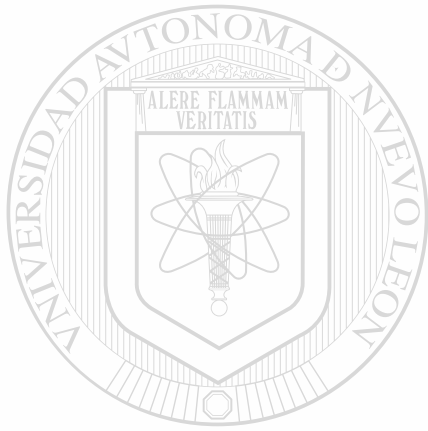
INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO  
NITRICO EN MACROFAGOS HUMANOS POR  
ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica*

POR:

M.C. FRANCISCO GONZALEZ SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
MICROBIOLOGIA

JUNIO DE 2003



UNIVERSIDAD AUT  
DIRECCIÓN GEN

**INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO  
NITRICO EN MACROFAGOS HUMANOS POR  
ANTIGENOS DE *Entamoeba histolytica***

ANL

DE NUEVO LEÓN  
BIBLIOTECAS

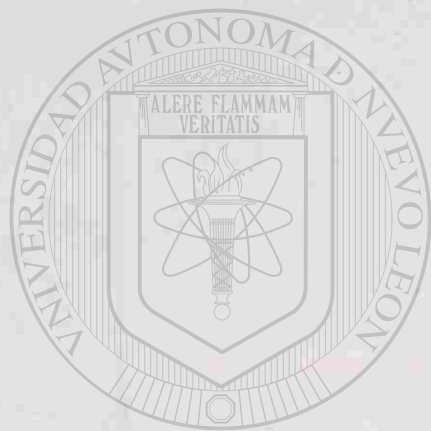
®

TD  
RC121  
.A5  
G65  
2003  
c.1

2003



1080124498



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

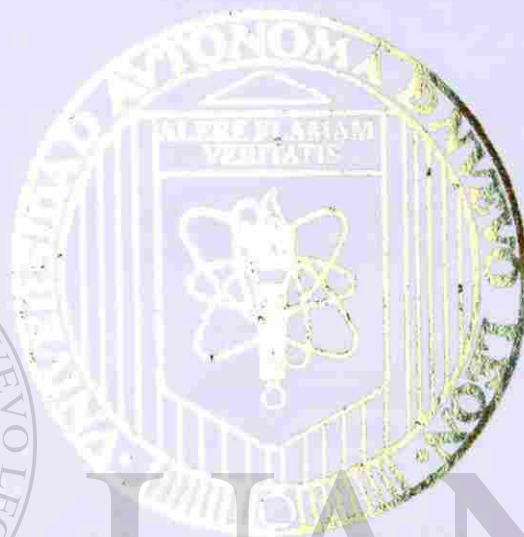
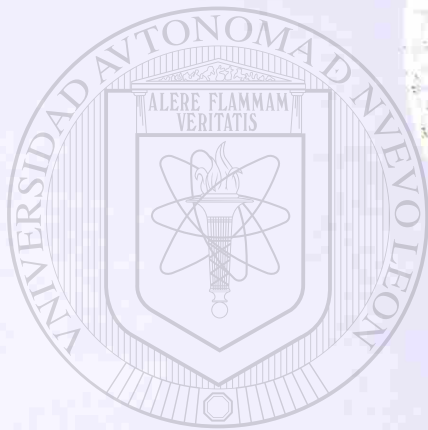
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UANL

INFECCIÓN DE PRODUCTOS *in vitro* DE ÓXIDO NITRICO EN  
CROFAGOS HUMANOS POR ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica*®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
POR

M.C. FRANCISCO GONZÁLEZ SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
Especialidad en MICROBIOLOGÍA.

Junio de 2003





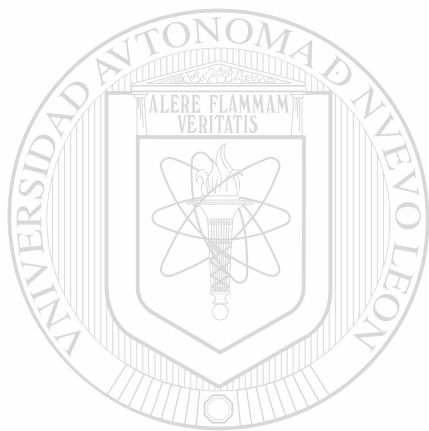
70

RC121

- A5

665

2003



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**TITULO DEL PROYECTO:**

**INDUCCION DE PRODUCCION *in vitro* DE OXIDO NITRICO EN  
MACRÓFAGOS HUMANOS POR ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica***

Aprobación por comité de tesis.



---

Dr. Salvador Said Fernández  
Presidente (Asesor de la tesis)



---

Dr. Juan Manuel Alcocér González  
Secretario (Coasesor)



---

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Vocal (Coasesor)



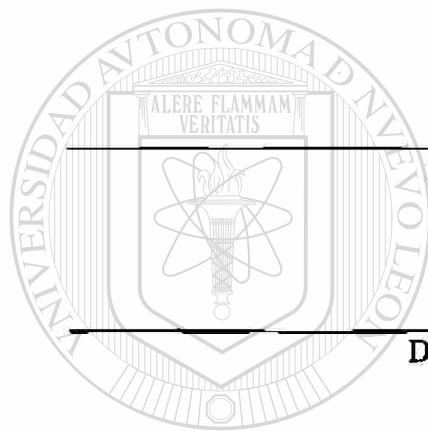
---

Dr. Benito Mata Cárdenas  
(Coasesor)



---

Dra. María Julia Verde Star  
Subdirectora de Estudios de Postgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

**El presente trabajo se realizó en:**

**División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.**

**Departamento de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Director de tesis:**

**Dr. Salvador Said Fernández**

**Asesores:**

**Dr. Juan Manuel Alcocér González**

**Departamento de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

**Departamento de Bioquímica, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL**

**Dr. Benito Mata Cárdenas**

**División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.**

**Dra María Julia Verde Star**

**Subdirección de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar mi trabajo a las personas a quien más amo

Especialmente a ti:

**ERIKA PAOLA**

A mis hijos

**SAMUEL y SAID GONZÁLEZ MORENO**

A mis padres:

**FRANCISCO GONZÁLEZ GONZÁLEZ  
ANDREA SALAZAR DE GONZÁLEZ**

A mis hermanos:

**CARMEN, RICARDO, SILVIA GUDALUPE, EMANUEL Y ELISA  
MARIA GONZÁLEZ SALAZAR**

A todos mis sobrinos:

**VICTOR; ALEJANDRO; GUILLERMO; ANDREA; JACOBO;  
ABRAHAM; ANDRES, ISAAC, y LUCERO y JUDITH ALEJANDRA**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Ahora en esta nueva era, un nuevo siglo comienza y es frecuente hablar de la red, del ciber espacio, de recibir e:mails, transferencias de información electrónicas, fotografías digitales, escáneres muy poderosos, manipulación de la información genética, creación de nuevos seres por clonación, de curación de enfermedades antes incurables. Mas sin embargo existen situaciones y enfermedades otona sencillas aún sin poder ser esclarecidas sus causas, su forma de producir daño, sin adecuadas formas de prevención e inclusive hay personas y niños que mueren o tienen secuelas por estas enfermedades. Quiero agradecer a DIOS por la oportunidad de vivir en esta era, y de poder dedicar mi tiempo en atender estos sencillos problemas, que ocasionan tanta preocupación a mis colegas médicos y que finalmente dañan la intimidad de la familia y la del ser humano.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, a la Universidad Autónoma de Nuevo

León y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología les debo la oportunidad de formarme como investigador, por todo el apoyo económico y académico recibido, mil gracias. ®

### **DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

Con toda la admiración y respeto que se merece...

**Al Dr. Salvador Said y Fernández**

Director de esta tesis, excelente persona, un gran maestro, extraordinario asesor y un buen amigo que tuvo a bien haberme aceptado como su alumno y que siempre me mostró que en la ciencia se requiere además de un gran entusiasmo una buena dosis de disciplina, buen juicio y autocrítica.

**Al Dr. Juan Manuel Alcocer González**

Co-Director de esta tesis; fue quién despertó en mi, el interés por incursionar mas a fondo en el interesante campo de la inmunología. Le agradezco la sinceridad en su trato su continua disposición para atender mis dudas, y por ser un excelente maestro director y guía para conmigo en el desarrollo del presente trabajo.

**A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**

De quien recibí muy valiosas observaciones para el desarrollo del presente trabajo, gracias por su valioso tiempo, por su colaboración y amistad.

**Al Dr. Benito Mata Cárdenas**

Le agradezco el estar siempre dispuesto a ayudarme en todos los aspectos relacionados con la presente tesis y fuera de ella. Por su gran compañerismo y su amistad, gracias.

**A la Dra. María Julia Verde Star**

Siempre dispuesta a ayudar, continuamente impulsando positivamente mi trabajo, con un gran sentido de responsabilidad y humanismo, por su gran calidez humana, gracias.

A mis compañeros de laboratorio Rebeca Palacios, Javier Vargas, Leticia Navarro, Pola Becerril, Manuel Rodríguez y la Dra. Karina González. Quienes mostraron una gran paciencia, tolerancia, cooperación y, solidaridad, además compartieron conmigo toda su experiencia y me brindaron incondicionalmente su amistad ¡Gracias!

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas, con quienes compartí momentos agradables y desafortunados, vivencias y momentos que guardo para siempre en mi mente y mi corazón.



A todo el personal de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la UANL. Que acertadamente dirige la Dra. María Julia Verde Star, quienes me facilitaron todos los trámites administrativos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a un servidor para soportar mis estudios de postgrado.

Al personal de la biblioteca del CIBIN por las facilidades otorgadas a un servidor para la obtención de material bibliográfico.

Al médico Antonio Luna De la Rosa por el apoyo con el arte gráfico necesario para el desarrollo de mi trabajo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En general a todas las personas que de una u otra forma colaboraron conmigo y me ayudaron a realizar mi trabajo

**¡Gracias!**

## NOMENCLATURA

**AHA** absceso hepático amibiano

**ATA** Antígeno total amibiano

**BCG** Vacuna de bacilos de Callmete y Guerin contra tuberculosis

**°C** Grados centígrados

**cm** Centímetros

**cols.** Colaboradores

**dl** Decilitro

**DNA** Acido desoxiribonucleico

**EHP** Extracto de hígado y páncreas

**g** Gramos

**Gal/GalNAc** Lectina que tiene afinidad por Galactosa

**g/dl** gramos por decilitro

**h** Horas

**HCl** Ácido clorhídrico

**HLA** Antígenos de histocompatibilidad

**HPLC** Cromatografía líquida de alta resolución

**iNOS** Sintetasa del óxido nítrico inducible

**IL-1** Interleucina 1

**INF- $\gamma$**  Interferón gamma

**kDa** Kilodaltons

**kg** Kilogramos

**L** Litros

**M** Concentración molar

**mM** Concentración micromolar

**MΩ** Megohms

**mg** Miligramos

**mg/ml** Miligramos por ml

**min** Minutos

**MHC** Complejos de histocompatibilidad

**ml** Mililitros

**μl** Microlitros

**mm** Milímetros

**NaOH** Hidróxido de sodio

**N** Concentración normal

**NO** Óxido nítrico

**PEHPS** Medio de cultivo PEHPS

**RNA** Ácido ribonucleico

**rpm** Revoluciones por minuto

**RPMI** Medio de cultivo RPMI-6420

**SREHP** Antígeno proteico rico en serina

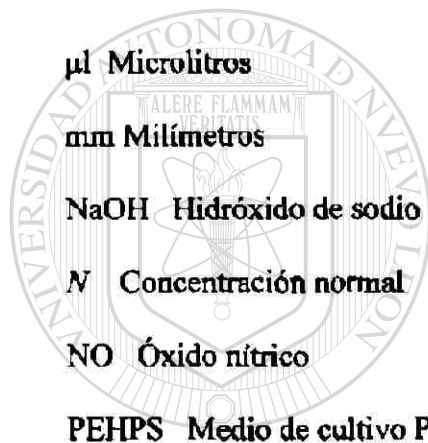
**Vols** Volúmenes

**SCID** Ratones con inmunodeficiencia combinada severa

**TNF-α** Factor de necrosis tumoral alfa

**× g** Fuerza centrífuga

**WHO** Organización mundial de la salud



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
<b>CAPITULO 1</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Amibiasis</b>	<b>1</b>
<b>1.2 El ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>:</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Taxonomía</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Aspectos generales de las respuestas humoral y celular.</b>	<b>2</b>
<b>1.5 Aspectos inmunológicos relacionados con la relación huésped/ parásito en la amibiasis.</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Importancia del Óxido Nítrico en la respuesta celular anti-<i>E. histolytica</i></b>	<b>9</b>
<b>1.7 Antígenos amibianos inductores de la respuesta inmune celular.</b>	<b>11</b>
<b>1.8.- Importancia de la inmunidad celular en la protección contra el desarrollo de AHA en animales inoculados experimentalmente</b>	<b>13</b>
<b>1.9. El problema</b>	<b>14</b>
<b>1.10 Originalidad</b>	<b>15</b>
<b>1.11 Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>1.12 Objetivo general</b>	<b>16</b>

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
1.13. Objetivos específicos	16
<b>CAPITULO 2</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL</b>	
2.1 Origen de los reactivos:	18
2.2 Material biológico:	19
2.2.1 Amibas:	19
2.2.2 Células mononucleares de sangre periférica:	19
2.3 Preparación de los Medios de Cultivo	20
2.3.1. Extracto de Hígado y Páncreas (EHP)	20
2.3.2 Preparación del PEHPS	21
2.3.3 Preparación del medio RPMI	22
2.4 Composición y Preparación de las Soluciones	23
2.4.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)	23
2.4.2 Solución de Tris HCl, pH 8.0	23
2.4.3, LPS	23
2.4.4 Solución de albúmina	24
2.4.5 Solución de glutaraldehído	24
2.4.6 Solución de fitohemaglutinina:	24
2.4.7.- Solución de [ <sup>3</sup> H- Timidina] ([ <sup>3</sup> H]-TdR)	25
2.4.8.- Soluciones para cuantificar nítritos	25

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>2.4.9. Azul de Tripano al 0.1%</b>	<b>25</b>
<b>2.4.10 Soluciones para cuantificación de proteínas por el método de Lowry et al., (1951)</b>	<b>25</b>
<b>2.4.11 Soluciones para cuantificar nitritos por el método de Griess (Green, 1982)</b>	<b>26</b>
<b>2.5 METODOS</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 Preparación de antígeno amibiano total</b>	<b>27</b>
<b>2.5.2 Cuantificación de proteínas:</b>	<b>29</b>
<b>2.5.3 Separación de células mononucleares de sangre periférica.</b>	<b>30</b>
<b>2.5.4 Determinación de la viabilidad de CMP</b>	<b>31</b>
<b>2.5.5 Activación de linfocitos de sangre venosa periférica utilizando antígenos amibianos.</b>	<b>32</b>
<b>2.5.6 Determinación de la producción de NO en cultivos de CMP.</b>	<b>33</b>
<b>2.5.7 Cuantificación de nitritos</b>	<b>34</b>
<b>2.5.8 Determinación de la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano:</b>	<b>35</b>
<b>2.5.9 Inhibición de la presentación del antígeno utilizando glutaraldehído.</b>	<b>36</b>



## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
2.5.10 Digestión del ATA con tripsina:	37
2.5.11 Producción de NO por CMP estimuladas con ATA digerido con tripsina:	37
2.5.12 Separación de fracciones del antígeno amibiano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	38
2.5.13 Preparación de las fracciones de antígeno amibiano obtenidas por HPLC para el bioensayo de producción de NO.	39
2.5.14 Determinación de la capacidad de las fracciones de antígeno amibiano separadas por HPLC para inducir la producción de NO.	39
2.5.15 Inducción de la activación de los macrófagos humanos por fracciones del antígeno amibiano para matar trofozoitos de <i>E. histolytica in vitro</i> .	40
<b>CAPITULO 3</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS</b>	
3.1 Inducción de proliferación de linfocitos humanos por antígeno amibiano	42
3.1.1 Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado en cultivos de células mononucleares periféricas.	42

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
3.1.2.- Relación temporal de la incorporación de [ <sup>3</sup> H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado.	43
3.1.3.- Proliferación de CMP inducida en función de la dosis de ATA.	44
3.2 Estimulación de la producción de NO por ATA.	44
3.3 Co-estimulación de CMP humanas por ATA, LPS e Interferón- $\gamma$ .	47
3.4 Inhibición de la producción de NO por inhibición en la presentación del antígeno.	50
3.5 Separación de fracciones del antígeno amibiano por HPLC	51
3.5.1 Fraccionamiento del ATA por HPLC.	51
3.6 Inducción de producción de NO por fracciones separadas por HPLC	52
3.6.1 Inducción de producción de NO por las fracciones de ATA.	52
3.7 Citotoxicidad sobre amibas de CMP activadas con los péptidos purificados por HPLC.	54
CAPITULO 4	56
DISCUSION	
4.1 Discusión	56

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
<b>CAPITULO 5</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSION</b>	
<b>5.1 Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>5.2 Perspectivas</b>	<b>68</b>
<b>5.3 Contribuciones</b>	<b>70</b>
<b>CAPITULO 6</b>	<b>72</b>



UANL

72

---

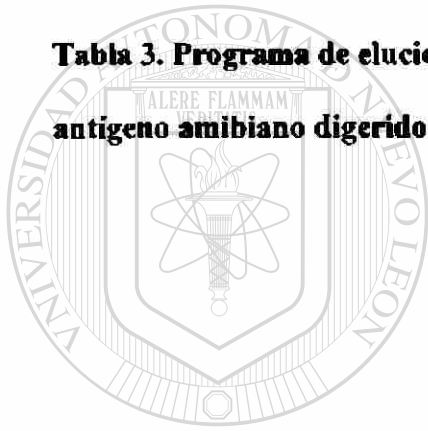
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INDICE DETABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Tabla 1. Curva estándar de seroalbúmina bovina</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 2.- Muestra los ingredientes de cada grupo de pozos durante el ensayo para determinar la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 3. Programa de elución de las fracciones del antígeno amibiano digerido con tripsina.</b>	<b>38</b>



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

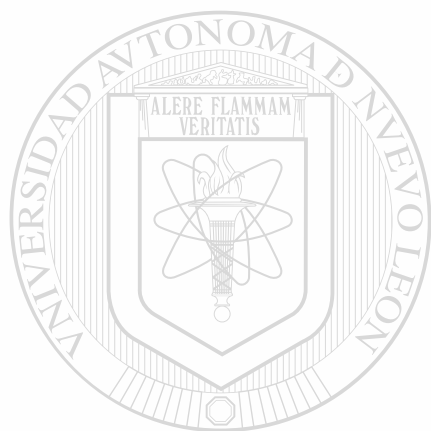


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1.- Separación de células mononucleares periféricas</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR por CMP en presencia de ATA particulado.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 3.- Relación temporal de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por ATA particulado en cultivos de CMP.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 4.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR en función de la dosis de ATA particulado.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 5.- Efecto de la dosis y el tiempo de incubación sobre la producción de NO.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 6.- Relación temporal y efecto de diferentes concentraciones de ATA para inducir producción de NO.</b>	<b>47</b>
<hr/>	
<b>Figura 7.- Co-estimulación de ATA con LPS e INF-<math>\gamma</math>.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 8.- Capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 9.- Efecto del bloqueo en la presentación del antígeno sobre la producción de NO.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 10.- Separación de fracciones del ATA por HPLC.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 11.- Inducción de la producción de NO por las fracciones del ATA separadas por CLAR.</b>	<b>53</b>

<b>Figura 12.- Inducción de producción de NO en fracciones de HPLC con concentraciones estandarizadas de antígeno.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 13.- Actividad citotóxica de macrófagos activados con los péptidos bioactivos sobre trofozoitos.</b>	<b>55</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESUMEN

Francisco González Salazar

Fecha de graduación: Junio, 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

### Título del Estudio:

INDUCCION DE PRODUCCIÓN *in vitro* DE OXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS HUMANOS POR ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica*

Número de páginas: 83

Candidato para el grado de Doctor en

Ciencias con especialidad en Microbiología

Area de estudio: Microbiología médica

### Propósito y método del estudio

La amibiasis, causada por *Entamoeba histolytica* es un problema de salud pública. La vacunación es la forma más efectiva para controlar las enfermedades infecciosas y parasitarias como la amibiasis. El óxido nítrico (NO), producido por macrófagos activados, es la principal molécula efectora en esta respuesta inmune contra *E. histolytica*. Se desconoce si existen antígenos capaces de inducir esta respuesta en células mononucleares periféricas (CMP) humanas. El objetivo del presente proyecto fue identificar antígenos de *Entamoeba histolytica* capaces de inducir esta respuesta, mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se utilizaron trofozoitos virulentos de la cepa HM-1-IMSS. Se obtuvo el antígeno amibiano total, libre de actividad de proteasas endógenas (ATA), el cual se utilizó directamente en forma particulada o soluble. Las CMP se obtuvieron de un voluntario con antecedentes de disentería amibiana. Se realizaron los siguientes ensayos en microplacas de 96 pozos: Activación de linfocitos por efecto de ATA soluble y ATA particulado, producción de NO en cultivos de CMP inducidos con LPS, ATA soluble o particulado, efecto del ATA digerido con tripsina sobre la producción de NO por CMP, separación de fracciones del antígeno amibiano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Determinación de la capacidad de las fracciones de antígeno amibiano separadas por HPLC para inducir la producción de NO. Capacidad litica de macrófagos activados por los antígenos amibianos separados por HPLC.

## **Contribuciones y conclusiones.**

El ATA es capaz de inducir proliferación de linfocitos en cultivos de CMP. El ATA induce producción de NO en cultivos de macrófagos obtenidos de sangre periférica humana. La inducción de producción de NO en cultivos de macrófagos humanos obtenidos de CMP, se incrementa por co-estimulación con INF y o LPS. La inducción de producción de NO en cultivos de macrófagos humanos obtenidos de CMP, es dependiente de la presentación del antígeno. Las fracciones del ATA digeridas con tripsina y separadas por HPLC son capaces de inducir la producción de NO en presencia de LPS. Los macrófagos humanos de cultivos de CMP, activados con las fracciones 4 y 9 separadas por HPLC. Inducen la producción de NO, además son capaces de destruir trofozoítos *in vitro*. Nuestros resultados sostienen la hipótesis planteada en el presente trabajo.

Las principales contribuciones del presente trabajo son las siguientes:

Demostramos que las CMP humanas son un modelo confiable y reproducible para analizar respuestas inmunes celulares contra antígenos de *E. histolytica*. Aislamos e identificamos dos fracciones de antígenos de *E. histolytica* que son capaces de inducir la producción de NO en cultivos de macrófagos humanos. Estos antígenos son capaces de activar a macrófagos humanos obtenidos de sangre periférica e incrementar su capacidad lítica sobre amibas virulentas *in vitro*. Abrimos un nuevo camino, con enfoque promisorio y estrategias novedosas; considerando los fundamentos de nuestra estrategia y los resultados aquí mostrados, para el desarrollo de una vacuna contra la amibiasis.

## **SUMMARY**

### **Purpose and methods of study**

Amoebiasis, caused by *Entamoeba histolytica*, is a public problem in developing countries. Vaccination is the most effective way to control most of infectious and parasitic diseases, like amoebiasis. Nitric oxide (NO), produced by activated macrophages, is the major effector molecule in the protective immune cell response against invasive *E. histolytica*. At date none *E. histolytica* antigen, capable of induce NO production in human macrophages, dependent of lymphocytes T CD 4<sup>+</sup> has been described. The objective of the present study was to identify *E. histolytica* antigens capable to induce this response *in vitro*.

*E. histolytica* HM-1 IMSS strain was used. The total amoebae antigen (TAA), free of endogenous-protease activity was prepared in soluble or particulate presentations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from a healthy participant who had amebic dysentery. The following assays were performed in 96-well culture microplates: 1) Peripheral lymphocyte activation by soluble- or particulate-ATA. 2) Determination of NO-production in PBMC induced with lipopolysaccharides (LPS) or soluble- or particulate-ATA. 3) Digestion of soluble-ATA with Trypsin. 4) Induction of NO production by digested ATA in CMP. 5) Fractionation of ATA digested with trypsin by high performance liquid chromatography (HPLC). 6) Determination of capability to induce NO production by the fractions of ATA obtained by HPLC. 7) Determination of cytotoxic capability of activated-macrophages stimulated with the antigen-fractions.

#### **Contributions and conclusions.**

ATA is capable of inducing lymphocyte proliferation in PBMC cultures, with an efficiency similar to phytohemagglutinin. ATA induces production of NO in human macrophages. The production of NO induced by ATA in PBMCs can be co-stimulated by INF  $\gamma$  o LPS, which indicates that this is not an unspecific response. Production of ATA depends on antigen presentation 4 and 9 HPLC-fractions are capable to induce a remarkable high production of NO. Human macrophages from PBMC cultures activated by HPLC-fractions numbers 4 and 9 fractions able to macrophages to kill amoebae.

#### **CONTRIBUTIONS**

We demonstrated that human PBMC are a confident model to analyze the cellular immune response induced by *E. histolytica* antigens. We isolated and identified two fractions of *E. histolytica* capable to induce *in vitro* production of NO in human macrophages. We showed that these antigens are capable to activate human macrophages and improve their lytic activity against virulent amoebae *in vitro*. We open a new way, with an interesting a novel promissory strategies, to design and develop a new vaccine against amebiasis.

Firma del Asesor \_\_\_\_\_

Dr. Salvador Said Fernández.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

#### 1.1 Amibiasis

La amibiasis es un problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en los países en desarrollo (Walsh, 1988). Esta enfermedad es producida por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. Las formas clínicas más frecuentes son la disentería y el absceso hepático amibiano (AHA) (Petri, 1996). Se considera que en el mundo existen 50 millones de casos de disentería y AHA y poco más de 100,000 muertes por año por estas formas clínicas (Petri, 2000). En México el 8.4% de la población ha estado expuesta a la amibiasis: Se estima que poco más de un millón de casos son tratados por año y se producen 1216 muertes anuales por esta enfermedad (Petri, 2000).

---

#### 1.2 El ciclo biológico de *E. histolytica*:

El ciclo vital de *E. histolytica* tiene dos fases: trofozoito (forma invasiva) y quiste (forma infectiva). Los trofozoitos son las formas vegetativas y los responsables de las lesiones en la pared intestinal. Las cuales producen los cuadros patológicos de colitis amibiana y disentería. Además, de ahí pueden diseminarse a otros órganos, con mayor frecuencia al hígado, y producir AHA. Bajo ciertas condiciones desfavorables para su crecimiento, los trofozoitos pueden formar quistes, mismos que salen del intestino en las heces fecales y pueden contaminar agua o alimentos, los cuales sirven como vehículos para infectar a un nuevo hospedero (Martínez-Palomo, 1982).

### 1.3 Taxonomía

Recientemente la Organización Mundial de la Salud reconoció que en el intestino humano existen dos especies de amibas morfológicamente indistinguibles, una patógena *E. histolytica* y otra no patógena *E. dispar* (WHO,1997).

### 1.4. Aspectos generales de las respuestas humoral y celular.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 son las células inmunes principalmente responsables del reconocimiento de los antígenos que inducen inmunidad protectora, mediante la activación de las respuestas humoral y celular (Janeway y Travers, 1997). Para que el reconocimiento del antígeno se lleve a cabo se requiere que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 reconozcan los antígenos en la superficie de las células. Estos antígenos se presentan unidos a glicoproteínas especializadas pertenecientes a una familia llamada genéricamente complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés, *Major Histocompatibility*

*Complex*). Las MHC se expresan en células de todos los vertebrados superiores. Estas moléculas se demostraron primero en ratones y se les denominó antígenos<sup>®</sup> H-2. En humanos se acostumbra llamar a los MHC como antígenos HLA, por sus siglas en Inglés (*human-leucocyte associated antigens*) (Alberts, 1994).

Existen dos clases de MHC, los de clase I y los de clase II. Estas moléculas tienen estructuras muy parecidas. Ambos son heterodímeros transmembranales, cuyas regiones (dominios) amino-terminales extracelulares se unen a un antígeno para presentarlo a los linfocitos T. Sin embargo existen ciertas diferencias que los distinguen: Los MHC clase I están constituidos por una cadena de alto peso molecular que tiene 3 dominios extracelulares  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , en su extremo amino

terminal, los cuales están codificados por exones separados. Esta región de la proteína está unido en forma no covalente con un pequeño péptido, llamado  $\beta_2$ -microglobulina, la cual no está codificada por las secuencia de DNA en el locus del MHC. En cambio, las moléculas MHC clase II están formadas por 2 cadenas polipeptídicas, la  $\alpha$  y la  $\beta$ . Cada una de las dos cadenas que las constituyen son polimórficas. La única cadena de alto peso molecular de las moléculas MHC clase I tienen un dominio transmembranal, en tanto que en las MHC clase II tanto la cadena  $\alpha$  como la  $\beta$  tienen un dominio transmembranal cada una. Tanto los MHC clase I como los clase II tienen un surco, donde alojan los epitopos para presentarlos a los linfocitos T. En los MHC clase I este surco está formado por los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y en los de clase II por los dominios  $\alpha_1$  de la cadena  $\alpha$  y  $\beta_1$  de la cadena  $\beta$ .

Los antígenos MHC clase I y los clase II tienen diferentes funciones: Los antígenos MHC de clase I se expresan virtualmente en todas las células nucleadas

de mamífero, presumiblemente porque estos antígenos son parte de un mecanismo que permite a los linfocitos T citotóxicos reconocer a cualquier célula que haya sido infectada por un microorganismo intracelular, como los virus. Estos antígenos se sintetizan en sistema retículo endoplásmico rugoso de las células infectadas, siendo su síntesis dirigida por el RNA viral. Estas proteínas se digieren en unas estructuras especializadas llamadas proteosomas. Los péptidos que resultan de esta digestión se transportan al lumen del sistema retículo endoplásmico rugoso, de ahí al aparato de Golgi, donde se ensambla la  $\beta_2$  microglobulina y el antígeno extraño (viral) con las proteínas MHC tipo I, se forman vesículas conteniendo los



complejos, las cuales son transportadas hasta la membrana plasmática de la célula infectada, para ser presentado. Una vez que el antígeno inserto en el surco de la molécula del MHC clase I, arriba descrita, este complejo antígeno-MHC es reconocido por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (*killer*), y como consecuencia de ello esta célula se activa y destruye a las células infectadas. De esta manera se restringe diseminación de los virus (Alberts, 1994).

Los antígenos del MHC clase II se encuentran predominantemente en células especializadas, conocidas como presentadoras de antígeno (linfocitos B, células dendríticas y macrófagos). Estas células presentan antígenos extracelulares (solos o provenientes de microorganismos enteros o fragmentos de éstos) a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (*helper*). Este proceso se lleva a cabo, en términos generales de la siguiente manera: El antígeno íntegro es endocitado por la célula presentadora de antígeno, y llega al interior de ésta en un endosoma temprano, el cual madura a medida que se internaliza en la célula. Entonces se torna en endosoma tardío. En la

---

membrana de este endosoma tardío se insertan moléculas preensambladas clase II, las cuales tienen unidas unas proteínas llamadas cadenas invariantes, las cuales<sup>®</sup> evitan que estos heterodímeros capturen péptidos en el lumen del sistema retículo

endoplásmico rugoso, y dirigen a las moléculas MHC clase II desde la red trans-Golgi al endosoma (donde se encuentra con el antígeno extracelular). En el fagosoma tardío, el antígeno extracelular puede someterse a una proteólisis limitada, y algunos de fragmentos unirse al heterodímero clase II, ya libre de la cadena invariante, dirigirse en una vesícula a la membrana plasmática y ensamblarse en ésta, o ser degradado completamente en un lisosoma. En el primer caso, al entrar en contacto el heterodímero clase II con el epitopo, el heterodímero

inmediatamente lo captura y lo fija en el canal que forman sus dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ . Mediante este mecanismo se reconocen epítopos de proteínas de partículas virales, bacterias, protozoarios o cualquier otro material protéico que haya sido endocitado y digerido por células fagocíticas especializadas. Como antes comentamos, estos complejos son reconocidos por los linfocitos T  $CD4^+$ . Para que estos linfocitos se activen se requieren dos tipos de señales: La señal uno es el complejo formado por el antígeno de histocompatibilidad clase II que tiene unido en al antígeno extracelular (arriba descrito), el cual activa un receptor constituido por una serie de proteínas invariantes llamado complejo CD3. Se piensa que este complejo activa una serie de tirosina-quinasas, entre ellas la proteína *Fyn* (que forma parte del complejo CD3, y otras proteínas, entre ellas una fosfolipasa C- $\gamma$ , que a su vez activa la ruta de señalización del inositol específico en la superficie del linfocito T  $CD4^+$ . La segunda señal puede ser una señal secretada, por ejemplo interleucina-1 (IL-1) o la proteína B7, unida a la superficie de la célula presentadora de antígeno.

B7 es reconocida por el co-receptor presente en el linfocito *helper* llamado CD28.

Si está presente la señal 1, pero no la 2, la célula *helper* puede quedar inactivada.

En cambio, si el linfocito T  $CD4^+$  recibe ambas señales, entonces éste se activa, se

inicia una proliferación clonal y se secretan una variedad de interleucinas. Una vez

que el linfocito T  $CD4^+$  ha sido estimulado por el antígeno, otra serie de proteínas

son reclutadas para incrementar la fuerza de unión entre la célula *helper* o los

linfocitos T  $CD8^+$  y la célula blanco. (Janeway y Travers, 1997). Por otro lado, los

macrófagos son activados por efecto de las interleucinas de los linfocitos T  $CD4^+$

activados. Entre las linfocinas que activan los macrófagos se encuentran las

interleucinas 4 y 10, el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Los macrófagos activados son capaces de reconocer y destruir otras células que presenten en su superficie los mismos epitopos que desencadenaron la respuesta inmune celular y excretar citocinas, como IL-1, además de intermediarios de oxígeno (p.e. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y nitrógeno reactivos [(p.e. óxido nítrico (NO)].

### **1.5 Aspectos inmunológicos relacionados con la relación huésped/parásito en la amibiasis.**

Es aceptado universalmente que las mejores armas de que se dispone actualmente para el control de la amibiasis, y en general de casi todas las enfermedades infecciosas y parasitarias son campañas de educación a la población, diagnóstico oportuno y confiable, medicamentos efectivos y sobre todos los métodos eficaces de prevención: La vacunación es uno de los métodos de control más poderosos (Bloom, 1989).

Uno de los temas más intensamente estudiados en el campo de la amibiasis es la identificación y caracterización de los factores involucrados en la patogenicidad y la respuesta inmune del huésped. Esto con el propósito de conocer mejor la biología del agente causal de esta enfermedad, lo cual es un requisito para desarrollar nuevos medicamentos y una vacuna contra la amibiasis (Said-Fernández, 1997; Carrero, 1996).

Existen reportes que indican que la inmunidad celular juega un importante papel en la inmunidad protectora contra el AHA (Petri, 2000, Sepúlveda, Martínez-Palomo, 1982). De León (1970) realizó un estudio epidemiológico que

sugiere que existe una protección contra la formación de AHA durante por lo menos 5 años en pacientes convalecientes de una primera infección. Este antecedente arriba expuesto adquiere una especial importancia cuando se pretende desarrollar una vacuna contra la amibiasis, o cualquier otra enfermedad infecciosa o parasitaria, dado que constituye un pre-requisito el hecho de que la inmunidad natural *per se* brinde a los pacientes una protección de largo plazo, como es el caso de la amibiasis y como ha sido satisfactoriamente probado con otras enfermedades susceptibles de ser prevenidas por vacunación; por ejemplo la varicela y el sarampión (Stanley Jr, 1997).

Existen indicios de que en la respuesta protectora inducida por AHA participan tanto la inmunidad humoral como la inmunidad celular. Por un lado, los pacientes convalecientes de AHA producen anticuerpos circulantes contra *E. histolytica* una semana después de iniciada la infección (Krupp, 1970). Sin embargo, el AHA se puede producir a pesar de la respuesta humoral (Correa-

Lemus, 1987, Petri, 1996, Krupp, 1970). Entonces, según algunos autores, la respuesta humoral no es suficiente para brindar protección completa a estos pacientes, pero sí juegan un papel importante en la respuesta inmunológica protectora global; por lo menos, en modelos animales; ya que el suero de pacientes convalecientes de AHA inhibe el desarrollo de AHA cuando se trata de inducir la formación de abscesos experimentalmente en ratones inmunodeficientes (estos ratones se denominan SCID por su nombre en inglés *severe combined immunodeficiency*), estos ratones carecen de linfocitos T o B funcionales, es por ello que se deduce que la actividad protectora en ese modelo animal depende de los anticuerpos antiamibianos que contienen los sueros de estos pacientes (Seydel,

1996). En especial, los anticuerpos IgA secretores parecen jugar un papel importante en la protección contra infecciones intestinales subsecuentes por *E. histolytica* (Stanley, Jr, 1997; Carrero , 1994).

Por el otro lado, cuando hablamos de inmunidad celular. La participación directa de este tipo de inmunidad esta bien demostrada en la protección del desarrollo de AHA, por lo menos en animales. Se ha demostrado en modelos animales que la depresión de la inmunidad celular resulta en una susceptibilidad incrementada al desarrollo de AHA

(Stern, 1984; Ghadirian; Meerovitch, 1981, Wijesundera, 1980). Los hámsteres cuando son timentomizados y tratados con anticuerpos anti-linfocitos desarrollan AHA de mayor tamaño que los controles (Ghadiran y Meerovitch, 1981). En estos mismos animales cuando se les eliminan sus macrófagos utilizando sílica gel se producen abscesos mayores y metástasis a diferentes órganos mientras que cuando se activan estas mismas células con BCG éstas lesiones son de menor tamaño

(Ghadiran y Meerovitch 1982). Lo mismo ocurre cuando se inocula a hámsteres con anticuerpos anti-macrófagos (Ghadiran y Meerovitch, 1983). Por el contrario se ha reportado que la vacunación con BCG, la infección con *Trichinella spiralis*,

la infección previa con *E. histolytica* y la vacunación con antígenos amibianos inducen una inmunidad protectora, la cual es independiente de la producción de anticuerpos (Ghadiran , 1983; Ghadirian y Meerovitch,1980; Ghadirian, 1980).

Las células de bazo de animales vacunados o protegidos contra AHA, transfieren inmunidad protectora a los hámsteres receptores (Ghadiran y Meerovitch, 1983).

Se ha demostrado inmunidad celular deprimida durante la fase aguda del AHA en modelos animales (Capin, 1980; Gold, 1978). Por otro lado en los seres humanos

y durante la fase aguda del AHA, la inmunidad celular también está deprimida en (Ortiz Ortiz, 1975; Salata, 1982). Otros indicios de respuesta celular en humanos son: Los individuos convalecientes de AHA y amibiasis intestinal desarrollan respuestas proliferativas de células T cuando se exponen a antígenos amibianos *in vitro* (Salata, 1987). Además, los macrófagos activados de individuos sanos o convalecientes de AHA pueden matar trofozoítos *in vitro* (Salata, 1986). Se ha demostrado que los macrófagos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son responsables de la respuesta protectora contra la formación de AHA en modelos animales (Haq, 1984; Denis y Chadee, 1989; Wang, 1992, Sher, 1980). Por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen capacidad citotóxica *in vitro* contra trofozoítos cuando éstos son estimulados con antígenos amibianos o lectinas. (Salata, 1987). Se han identificado antígenos de *E. histolytica* que estimulan la producción de TNF- $\alpha$ , aumentando la producción de NO en un modelo *in vitro* de macrófagos murinos (Seguin, 1995). Finalmente es ampliamente aceptado que el NO es la principal

molécula efectora producida por los macrófagos para matar a las amibas (Seguin, 1995;1997; Lin, 1995).

### **1.6 Importancia del Óxido Nítrico en la respuesta celular anti-*E. histolytica***

En este trabajo es de especial interés el NO, cuya síntesis es debida a la actividad de la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS) (Lanzavecchia, 1993). El interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) son las principales linfocinas responsables de la activación de los macrófagos para la producción de NO (Denis y Chadee,1989), el cual es muy tóxico para los trofozoítos de *E. histolytica* (Lin., 1995; Seguin, 1997). El NO es la principal

molécula efectora producida por los macrófagos y es citostático o citotóxico contra los agentes responsables de enfermedades infecciosas o parasitarias como SIDA, Lesmaniasis, Malaria, Esquistosomiasis, Toxoplasmosis y Tripanosomiasis (Bukrinsky,1995; Vouldokis,1995). Además, se ha postulado que el NO, producido por macrófagos de hámster, es el principal responsable de la muerte de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* (Seguin,1997; Lin , 1994). En otro trabajo se propone que el NO es la principal molécula efectora que sintetizan los macrófagos de hámster para matar a las amibas en cultivos de macrófagos murinos *in vitro* ( Lin, 1995). Se ha demostrado también que los macrófagos activados por las linfoquinas INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son capaces de producir NO *in vitro* (Denis 1989; Lin 1992 ; Lin 1994).

Quando un antígeno es fagocitado por las células presentadoras de antígeno profesionales, procesado en su interior y presentado en su superficie. Es posible aislarlo a partir de estas células activadas. Este mecanismo de procesamiento y

presentación de los antígenos, ha sido utilizado recientemente para seleccionar antígenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora (celular y/o humoral), para desarrollar vacunas contra *malaria*, *influenza* y *salmonelosis* (Lalvani, 1994, Momburg, 1992, Ortiz, 1989).

En el caso particular de la amibiasis, es bien conocido que durante la fase aguda de esta enfermedad los linfocitos T responden a la presencia del antígeno de *E. histolytica* con incrementando su número (Ganguly, 1981).

Los linfocitos de sangre periférica de pacientes convalecientes de AHA tienen la capacidad de proliferar y sintetizar DNA en presencia de antígenos de *E.*

*histolytica* (Sabanat, 1973; Segovia, 1980). Los linfocitos cuando se incuban con proteínas solubles aisladas de trofozoitos de *E. histolytica* inducen la activación de macrófagos y éstos son capaces de matar a trofozoitos de una cepa patógena de *E. histolytica* (Salata, 1986). La población de linfocitos responsable del reconocimiento de antígenos que inducen una respuesta celular protectora, son los linfocitos CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 (Rabinobitch, 1994).

### **1.7 Antígenos amibianos inductores de la respuesta inmune celular.**

Se han aislado varios antígenos de *E. histolytica* capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra la formación de AHA en animales de laboratorio infectados experimentalmente con trofozoitos. Existen por lo menos tres antígenos capaces de inducir esta respuesta. El primero que mencionaremos es la proteína rica en serina (SREHP, por sus siglas en Inglés: *Serine Rich Entamoeba histolytica Protein*). La cual se descubrió como un factor de virulencia. Este antígeno es un péptido de aproximadamente 25 kDa. Se denomina proteína rica en

serina porque contiene una gran cantidad de residuos de éste aminoácido [(52 de los 233 residuos de aminoácidos que contiene) (Stanley Jr., 1990)]. SREHP es una proteína de superficie que tiene 2 regiones hidrofóbicas, cada una situada en los extremos carboxilo y amino terminales, y una cadena de aminoácidos que contiene una serie de repeticiones en tándem de un dodecapéptido u octapéptido hidrofílico (Stanley Jr. 1990). Es altamente inmunogénica. Se sabe que en el 80% de los pacientes convalecientes de AHA tienen anticuerpos dirigidos contra este antígeno. (Stanley Jr. 1991). Cuando ratones SCID se inmunizaron con anticuerpos monoclonales de conejo dirigidos a este antígeno conjugado en forma recombinante (SEP-TrpE) estos ratones no desarrollaron AHA cuando fueron



retados con un inóculo intra-hepático de trofozoitos virulentos de *E. histolytica*. (Zhang, 1994). Del mismo modo cuando se vacunaron gerbos con la proteína recombinante SREHP-MBP por vía peritoneal o intradérmica se obtuvo una protección del 64 al 100% cuando se trató de inducir la formación de AHA inoculando por vía intrahepática trofozoitos de amibas virulentas. (Zhang, 1994). Otro de los antígenos amibianos mas estudiados es una lectina que tiene afinidad por Galactosa y que se denomina lectina Gal/GalNAc esta proteína es más grande pesa 260 kDa y tiene dos fracciones, una pesada de 170 kDa y una ligera de 31-35 kDa (Petri, 1989). A su vez la cadena pesada tiene varios componentes; una región pobre en cisteína, una región de pseudo repeticiones y una región rica en cisteína. (Zhang, 1992). Este antígeno es muy inmunogénico, cabe mencionar que el 90% de los pacientes convalecientes de AHA tienen anticuerpos dirigidos contra este antígeno y parece ser que la gran mayoría de estos van dirigidos a la subunidad de 170 kDa (Ravdin, 1990). Zhang y col. (1992) encontraron que todos los pacientes

---

convalecientes de AHA tenían anticuerpos contra la región rica en cisteína, mientras un 89% contra la región pobre en cisteína; y que solo un 9% tenía anticuerpos contra la región de pseudo repeticiones. En los gerbos vacunados con la

lectina se encontró un 67% de protección cuando los animales vacunados se inocularon con amibas virulentas, vía intrahepática (Petri, 1990); mientras que cuando se vacuna con un péptido recombinante conteniendo únicamente la fracción rica en cisteína de la unidad de 170 kDa se obtuvo una protección de un 81% (Zhang T., 1994 T). Un péptido membranal de 29 kDa se ha aislado de algunas clonas de *E. histolytica* (Reed, 1992, Flores , 1993). Esta proteína es muy inmunogénica y se ha reportado que el 80% de los pacientes convalecientes de

AHA tienen anticuerpos contra ésta, ya sea de origen natural o recombinante (Flores, 1993). De los gerbos vacunados con una proteína de fusión conteniendo este péptido solo el 30% desarrollaron AHA, mientras que el 59% de los controles, que solo recibieron adyuvante, desarrollaron abscesos (Soong, 1995).

### **1.8.- Importancia de la inmunidad celular en la protección contra el desarrollo de AHA en animales inoculados experimentalmente**

Existen antecedentes de la importancia de la inmunidad celular como una herramienta útil en la protección contra la formación de absceso hepático en animales de laboratorio. Las células mononucleares periféricas, células peritoneales y linfocitos de bazo de hámsteres vacunados o protegidos contra AHA son capaces de matar trofozoítos de *E. histolytica in vitro* (Ghadirian, 1982). Los linfocitos de células peritoneales o los linfocitos de bazo de hámsteres vacunados o protegidos contra la formación de AHA confieren inmunidad protectora cuando son transferidos a hámsteres no protegidos (Ghadirian, 1983). La

inducción de la activación de macrófagos con BCG induce protección parcial para la formación de AHA en hámsteres (Ghadirian, 1982).

En lo que se refiere a inducción de proliferación de linfocitos, se han realizado ensayos con extractos crudos de proteínas solubles amibianas, induciendo proliferación de linfocitos humanos de sangre venosa periférica de voluntarios sanos y pacientes convalecientes de AHA (Kettis, 1982; Salata, 1986; Savanat, 1973; Ganguly, 1981). Existe un trabajo también donde se induce proliferación de linfocitos humanos utilizando fracciones lisosomales de un antígeno amibiano (Segovia, 1980).

Hasta la fecha los estudios que se han realizado para inducir producción de NO utilizando antígenos amibianos se han realizado en modelos en animales principalmente ratones (Lin, 1994, Seguin, 1997). Los antígenos utilizados para inducir producción de NO en estos modelos han sido principalmente las proteínas solubles amibianas y la lectina que se une a galactosa. (Seguin, 1995; 1997). Se reconoce que los principales factores asociados a esta respuesta son las citocinas, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Wang, 1992; Denis y Chadee, 1989). Se ha determinado que la producción de NO capacita a los macrófagos activados para matar a las amibas cuando se cultivan juntos (Denis y Chadee, 1989; Seguin, 1997), y que esta actividad es dependiente de la adecuada estimulación de la enzima iNOS sintasa (Lin, 1992; Seydel, 2000).

### 1.9. El problema

Como se ha mencionado la vacunación es la forma más efectiva y económica para controlar las enfermedades infecciosas y parasitarias. Se han

hecho avances notables en el desarrollo de la vacuna contra la amibiasis, pero aún no se encuentra la adecuada. Cuando se habla del desarrollo de vacunas en contra de las enfermedades producidas por protozoarios nos encontramos con que esta actividad representa un alto grado de dificultad, principalmente por la capacidad que tienen estos microorganismos para evadir la respuesta inmune del hospedero. La mayor parte de los grupos que han trabajado y que actualmente trabajan en el desarrollo de una vacuna contra amibiasis, se han limitado a aislar antígenos localizados en la superficie celular, sin darle importancia al resto de los antígenos celulares. Además, se ha probado la capacidad inmunogénica de tales antígenos

por separado. Es decir, utilizando un solo antígeno a la vez, generalmente acompañado de algún adyuvante. Además, en la mayor parte de los estudios de inducción de la respuesta inmune se han utilizado células animales o animales de laboratorio. Esto conlleva los siguientes riesgos: primero; al utilizar antígenos superficiales se deja de lado la posibilidad de que alguno de los antígenos intracelulares sea un importante inmunógeno. Segundo; al utilizar un solo antígeno de superficie existe la posibilidad de que el protozoo cambie el determinante o determinantes antigénicos contra los que está dirigida la vacuna, dejándola sin efecto o disminuyendo su eficacia. Tercero, es posible que exista diversidad antigénica en poblaciones de *E. histolytica* distribuidas alrededor del mundo. En tal caso, una vacuna desarrollada en una región determinada de nuestro planeta tendría eficacia sólo en ciertas partes del globo, como ocurre con las vacunas contra la malaria (Richie, 2002). Cuarto, existe la posibilidad de que por la diversidad de complejos HLA este antígeno sea reconocido solo por un determinado grupo de población que posea ese HLA y no por otras personas que no posean este haplotipo HLA. Quinto, el utilizar animales de laboratorio para ensayar inmunidad protectora contra amibiasis podría producir resultados que no necesariamente son extrapolables a los seres humanos. Es decir, es posible que los antígenos reconocidos por estos animales no sean los mismos que los reconocidos por las células inmunológicas humanas.

### **1.10 Originalidad**

Nosotros nos propusimos analizar la capacidad de antígenos amibianos de inducir la producción de NO, el cual se conoce es la principal molécula producida por macrófagos y es capaz de matar a los trofozoitos de *E. histolytica*. La finalidad de

este estudio es aislar varios antígenos capaces de inducir esta respuesta en macrófagos humanos para en posteriores estudios utilizar todos estos antígenos (juntos o en combinación) en un vehículo molecular y determinar la capacidad inmunogénica de estos antígenos para considerarlos como candidatos a una vacuna contra amibiasis. Pensamos que la estrategia que utilizamos en el presente proyecto podría eliminar o al menos disminuir algunos de los riesgos señalados en el apartado inmediato anterior

### 1.11 Hipótesis

*E. histolytica* posee antígenos que son capaces de inducir la producción *in vitro* de NO por macrófagos humanos.

### 1.12 Objetivo general

El objetivo de nuestro trabajo es aislar algunos de los antígenos de *E. histolytica* que son reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos humanos e inducen la producción de NO.

### 1.13. Objetivos específicos

- 1.- Determinar la capacidad mitogénica del antígeno total amibiano (ATA) sobre cultivos de células mononucleares periféricas.
- 2.- Analizar la capacidad del ATA para inducir la producción *in vitro* de NO en cultivos de macrófagos humanos.
- 3.- Determinar las condiciones óptimas de producción de NO en cultivos de macrófagos humanos activados con ATA.
- 4.- Investigar si la activación de los macrófagos inducida por ATA puede ser coestimulada agregando LPS y/o INF- $\gamma$  a cultivos de macrófagos humanos.

5.- Investigar si la activación de los macrófagos con producción de NO es dependiente de la presentación del antígeno.

6.- Determinar la capacidad de las fracciones de antígenos amibianos digeridas con tripsina y fraccionados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para inducir producción de NO en cultivos de macrófagos humanos.

7.- Aislar las fracciones separadas por HPLC y que son capaces de inducir producción de ON en cultivos de macrófagos humanos.

8.- Determinar si la producción de ON inducida por fracciones de antígeno separadas por HPLC en cultivos de macrófagos humanos es dependiente de la concentración de proteína existente en cada una de ellas.

9.- Investigar si los macrófagos activados por las fracciones mencionadas son capaces de reconocer y matar trofozoítos de amibas virulentas recién recuperadas de AHA producidos en hámsteres.

10.- Descartar la capacidad activadora de macrófagos por cualquiera de los componentes de los medios, enzimas o solventes utilizados a lo largo de nuestros ensayos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 2

### MATERIAL Y METODOS

#### MATERIAL

##### 2.1 Origen de los reactivos:

Los reactivos utilizados durante el desarrollo de esta tesis fueron de grado analítico o grado HPLC, según si se hubieron utilizado para el desarrollo de ensayos o separación de antígenos utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se adquirió de Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) Dextrosa, L-cisteína, ácido ascórbico, tris-HCl, tripsina, lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8, albúmina bovina, glutaraldehído, glicina, Carbonato de sodio, hidróxido de Sodio, reactivo de Folin, naftil-etilendiamina, sulfanilamida, nitrito de sodio, HEPES, Trizma base, Tris HCl, carbonato de sodio, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, y medio RPMI-1640 para cultivo *in vitro* de células de mamífero,

Ficoll-Hypaque, Azul Tripano, Suero bovino fetal Bioxon, Becton Dickinson de México, S. A. de C. V. (Cuautitlán Itzcalli, Estado de México), Peptona de caseína, jeringas y agujas desechables.

De Spectrum Quality Products Inc. (Gardena, CA, New Brunswick, NJ, USA):

Fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico.

De Merk México S.A.- de C.V.: Cloroformo y etanol.

De Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V., Monterrey, NL: Hidróxido de sodio.

De Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, Massachussets, USA. , columna y guardacolumnas para cromatograma.

De Infra S.A. de C.V. Edo. de México. Nitrógeno, grado NF UN 1066.

## **2.2 Material biológico:**

### **2.2.1 Amibas:**

Se utilizaron amibas de la cepa HM-1 IMSS (Diamond, 1968) mantenidas en condiciones axénicas (Said Fernández y Cols., 1988) en nuestro laboratorio por 23 años. Estas amibas tenían tres pases por hígado de hámster, habiendo producido en cada pase AHA grado V (Cruz-Vega y Cols., 1997), y habiendo sido recuperadas a partir de las lesiones (Gupta, 1998), con la finalidad de que éstas estuvieran expresando su mayor virulencia en el momento de realizar los análisis descritos en este trabajo.

### **2.2.2 Células mononucleares de sangre periférica:**

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron de un voluntario sano, adulto, del sexo masculino, sin antecedentes de AHA, pero sí de colitis amibiana, tratada médicamente con buena respuesta y al momento del

estudio se encontraba asintomático. Su biometría hemática mostraba hemoglobina de 16.0 g/dl, con 5,450 leucocitos por dl diferencial de 56% de neutrófilos, 36% linfocitos, 6% monocitos 1% eosinófilos y 1% de basófilos. El suero de este paciente se probó por el método de ELISA para buscar anticuerpos contra Hepatitis B y C, SIDA, Brucelosis y Sífilis se reportaron negativos. El mencionado paciente recibió la vacuna BCG y su prueba de tuberculina resultó positiva. No tenía antecedentes de ninguna patología crónica o datos de cáncer. No padecía ninguna enfermedad que comprometiera su sistema inmune. Los análisis clínicos de este paciente fueron realizados en el Centro Regional para el Estudio,



Investigación y Tratamiento de los pacientes con leucemia, Hospital Universitario, Monterrey, Nuevo León, México.

## **2.3 Preparación de los Medios de Cultivo**

### **2.3.1. Extracto de Hígado y Páncreas (EHP)**

**Preparación y almacenamiento.** Para cada lote de EHP se utilizaron 350 g de páncreas bovino, 350 g de páncreas de cerdo y 1 kg de hígado de bovino. El hígado y páncreas, se limpiaron de tejido conectivo, se lavaron con NaCl al 0.85% y se cortaron en trozos pequeños (cubos de aproximadamente de 2 cm de lado); los cuales se molieron con un molino eléctrico (Tor-Rey, Monterrey, N.L. México). El producto se licuó y se mezcló con 1.354 Vols. de PBS, pH 8.0 precalentado a 56°C. Para ajustar el pH se agregaron 10 ml de NaOH 10 N por cada 2,800 ml del licuado y se incubaron 4 h a 37°C. La mezcla se colocó en un vaso de precipitado de 4 L de capacidad, de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) y se calentó en autoclave a 121°C por 15 min. Inmediatamente después se retiró el

sobrenadante con un colador y se filtró a través de ocho capas de gasa superpuestas. El producto se mezcló con tierra de diatomeas (250 ml de tierra blanca, Hiflo Estándar/litro de extracto) y se filtró, pasándolo a través de un colchón de 400 ml de tierra de diatomeas Estándar Super Cell (Almeria, Jhons Marville Corp. Jalisco, México) sobre un matraz Kitasato de 4 L.

El colchón de tierra de diatomeas se preparó suspendiendo 200 ml de tierra en agua desionizada, aforando a 1 L. La mezcla se hizo pasar a través de un filtro Whatman # 1 (Whatman, Laboratory Division; Springfield Mill, Maidstone Kent., Inglaterra), colocado sobre un embudo Buchner, dejando la tierra compacta pero

evitando que se formaran grietas. El producto final se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de usarlo (Said-Fernández y cols., 1988).

### 2.3.2 Preparación del PEHPS (Said-Fernández y col., 1988).

Composición del Medio:

EHP .....	250 ml
Peptona de caseína.....	10 g
Glucosa .....	6 g
L-cisteína .....	1 g
Ácido ascórbico.....	0.2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.6 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	1 g.
Agua desionizada c.b.p. ....	1000 ml

**Preparación del medio basal EHP:** Inmediatamente antes de usarse el EHP se descongeló en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se filtró haciéndolo pasar a través de un filtro Whatman # 1, con ayuda de vacío. El filtrado se mezcló con el resto de los componentes sólidos. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. El medio se distribuyó en alícuotas de 10 ml, en tubos para cultivo de  $16 \times 125$  mm, con tapón de rosca (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass

works, Corning, NY, USA), o de 450 ml, en frascos para cultivo en suspensión de 500 ml "Spinners", (Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Los tubos se esterilizaron en autoclave, a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Los tapones de los tubos se dejaron flojos para esterilizarlos y se apretaron inmediatamente después. El medio se almacenó a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

**Preparación de suero bovino.** El suero bovino se preparó en nuestro laboratorio, separándolo por decantación de la sangre de bovinos recién sacrificados en un rastro local. Inmediatamente después el suero se centrifugó a  $450 \times g$ , por 15 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ , en frascos de 1 L de capacidad de policarbonato (Nalgene Labware

Division, N.Y., USA), para eliminar los eritrocitos que aún quedaban en suspensión. Inmediatamente después el producto se distribuyó en alícuotas de 500 ml en frascos de vidrio y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de usarlo, el suero se descomplementó por calentamiento a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 min y se distribuyó en volúmenes de 40 ó 100 ml en botellas estériles de borosilicato (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass works, Corning, NY, USA) con tapón de rosca. Después, se inoculó 1 ml de suero de cada botella en un tubo conteniendo 10 ml de medio PEHP y se incubó por 3 días para comprobar su esterilidad. Luego se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de usarlo.

A cada tubo con 10 ml de medio se le añadió 1 ml de suero descomplementado, en condiciones asépticas. Cuando fue necesario obtener volúmenes mayores de trofozoítos se utilizaron frascos con dos bocas, tapones de rosca y agitación magnética, llamados "Spinners", con 500 de capacidad (Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA ) (conteniendo cada uno 450 ml de medio PEHPS y 45 ml de suero) (Said-Fernández S, 1988, Said Fernández y Mata Cárdenas, 1992).

### **2.3.3 Preparación del medio RPMI**

Para preparar el medio RPMI, se mezclaron 500 ml de medio RPMI y 50 ml de suero bovino fetal, en condiciones asépticas, en a un frasco estéril de 1 L de capacidad con tapón de rosca. El medio se distribuyó en alícuotas de 100 ml en frascos estériles de borosilicato (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass works, Corning, NY, USA) con tapón de rosca de 120 ml de capacidad. El medio así preparado se almacenó en refrigeración ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) hasta su uso.

## 2.4 Composición y Preparación de las Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada, con una resistividad de 4 megohms ( $M\Omega$ ). El agua se desionizó con un desionizador Barstead (Barstead Co. Sybron Div., Boston, MA. USA).

### 2.4.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

*Composición:*

NaCl.....	6.5 g
$K_2HPO_4$ .....	2.8 g
$KH_2PO_4$ .....	0.4 g
Agua desionizada c.b.p. ....	1000 ml

Los componentes se disolvieron, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N y la solución se aforó a 1 L, se distribuyó en alícuotas de 10 ml, se esterilizó en autoclave y se almacenó en refrigeración (2-8°C) hasta su uso.

### 2.4.2 Solución de Tris HCl, pH 8.0

Para preparar solución Tris HCl 0.08 M (pH 8.0), se pesaron 1.264g de Tris HCl y se disolvieron en agua desionizada. Se ajustó la solución a pH a 8.0 con NaOH 10 N, se aforó a 100 ml con agua desionizada. La solución se distribuyó en frascos de borosilicato de 120 ml de capacidad con tapón de rosca (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass works, Corning, NY, USA) y se esterilizó en autoclave ( a 121°C por 15 min), y se almacenó en refrigeración (2-8°C) hasta su uso.

### 2.4.3. LPS

Para preparar la solución de LPS se pesaron 10 mg de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo 0127:B8 Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada. La solución se almacenó en tubos

cónicos de polipropileno de 15 ml de capacidad, estériles (Corning Inc, Corning NY., USA) y se guardó en refrigeración hasta su uso.

#### **2.4.4 Solución de albúmina**

Esta solución se utilizó como testigo para los ensayos y para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y cols (1951). Se preparó como sigue: Se pesaron 10 mg de albúmina bovina, fracción V, y se disolvieron en 10 ml de agua desionizada. La solución se almacenó en tubos cónicos de polipropileno estériles con tapón de rosca, de 15 ml de capacidad (Corning Inc, Corning NY., USA) y se guardó en refrigeración hasta su uso.

#### **2.4.5 Solución de glutaraldehído**

Se diluyeron 100 µl de glutaraldehído grado II al 25% en solución acuosa Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) con 50 ml de agua desionizada estéril. La solución de glutaraldehído con la concentración final de 0.05% se almacenó en frascos color ámbar de borosilicato y de 120 ml de capacidad y con tapón de rosca (Pyrex, Beaker Griffin, Corning glass works, Corning, NY, USA) y se guardó en refrigeración hasta su uso.

#### **2.4.6 Solución de fitohemaglutinina:**

En un tubo estéril con tapón de rosca se mezcló 1 volumen de la presentación comercial de fitohemaglutinina (100 mg/ml) con 9 volúmenes de medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino para obtener una solución de trabajo de 10 mg/ml, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **2.4.7.- Solución de [<sup>3</sup>H-Timidina] ([<sup>3</sup>H]-TdR)**

Se mezclaron en un crio-vial (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) 900 µl de medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino fetal con 100 µl de la preparación comercial de [<sup>3</sup>H]-TdR (Sigma Chem Co (St Louis Missouri, USA) (5 µCi/ml), y se almacenó a - 20°C hasta su uso.

#### **2.4.8.- Soluciones para cuantificar nitritos.**

*Reactivo A.* Se disolvieron 100 mg de naftildietanolamino en 100 ml de agua bidestilada, y la solución se almacenó la solución en un frasco de borosilicato ámbar, con tapón de rosca a 0-4 °C.

*Reactivo B.* Se disolvió 1g de sulfanilamida en 100 ml de H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> al 5 %. La solución se almacenó en frasco ámbar, de borosilicato con tapón de rosca a 0-4 °C.

*Solución de referencia* (1 X): Se disolvieron 69 mg de nitrito de sodio en 100 ml de agua bidestilada. De esta manera se obtuvo una solución 1 mM.

#### **2.4.9. Azul de Tripano al 0.1%**

Se pesaron 10 mg de colorante Azul de Tripano y se diluyeron en 10 ml de agua bidestilada inmediatamente antes de usarse. La solución se almacenó a temperatura del laboratorio hasta su uso.

#### **2.4.10 Soluciones para cuantificación de proteínas por el método de Lowry et al., (1951)**

*Solución A:* Se disolvieron 2 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 100ml de NaOH 0.1N.

*Solución B1:* Se disolvieron 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100ml de agua

*Solución B2:* Se disolvió 1g de sulfato de cobre en 100 ml de agua desionizada.

*Reactivo de Folin:* Se diluyeron 5 ml de solución de Folin con 5ml de HCl 1N.

*Solución C:* Se mezclaron 49 ml de solución A, 0.5 ml de solución B1 y 0.5 ml de solución B2.

#### **2.4.11 Soluciones para cuantificar nitritos por el método de Griess (Green, 1982)**

*Solución A:* Se disolvió 0.1 g de Nafiteilendiamida (N 5889) en 100 ml de agua bidestilada. La solución se almacenó en frascos de borosilicato de 120 ml de capacidad color ámbar con tapón de rosca y protegidas de la luz a una temperatura de refrigeración de 0-4°C.

*Solución B:* Se disolvió 1 g de sulfanilamida (S 9251) en 100 ml de ácido ortofosfórico al 5% (v/v). La solución se almacenó en frascos de borosilicato de 120 ml de capacidad color ámbar con tapón de rosca y protegidas de la luz a una temperatura de refrigeración de 0-4°C.

La solución de trabajo o reactivo de Griess: Se prepara mezclando una parte del reactivo A con una parte del reactivo B. Se mezclan inmediatamente antes de

usarse.

*Solución estándar de nitritos:* Se prepara disolviendo 0.069 g de nitrito de sodio<sup>®</sup> en 100 ml de agua bidestilada. Así obtuvimos una concentración de 1mM. La solución se almacenó en frascos de borosilicato de 120 ml de capacidad color ámbar con tapón de rosca y protegidas de la luz a una temperatura de refrigeración de 0-4°C.

## 2.5 METODOS

### 2.5.1 Preparación de antígeno amibiano total.

Se inocularon 2 *spinners* de 500 ml de capacidad conteniendo cada uno 495 ml de medio PEHPS (Said-Fernández y Mata-Cárdenas, 1988) con  $5 \times 10^3$  trofozoitos / ml y se incubaron a 36 °C por 72 h. Las primeras 48 h sin agitación y las siguientes agitando con la ayuda de un agitador magnético a 50 rpm (Said Fernández y Mata Cárdenas, 1992). Para cosechar las amibas los *Spinners* se enfriaron en agua-hielo durante 10 min, el contenido de los frascos se vació en tubos cónicos de polietileno de 50 ml (Corning Inc, Corning NY., USA) y se centrifugaron a 600 × g. por 15 min, a 4°C. Los sobrenadantes se aspiraron y se descartaron utilizando una pipeta Pasteur (Corning Inc, Corning NY., USA) estéril. El sedimento conteniendo trofozoitos de amibas se resuspendió por 2 ocasiones en 15 ml de PBS estéril y se centrifugó en las mismas ocasiones a 600 × g. por 15 Min, a 4°C. Luego de descartar nuevamente los sobrenadantes, los sedimentos con trofozoitos se transfirieron a tubos cónicos de borosilicato, estériles, de 50 ml de capacidad, con tapón de rosca (Bellco Glass, Inc, New Jersey, USA ) que contenían 4 perlas de vidrio estériles. A cada tubo de borosilicato se agregaron 2.5 ml de la suspensión de amibas y se agregaron 20 volúmenes de cloroformo:metanol (1:1, v/v). La mezcla de disolventes se agregó a las amibas para preservar las proteínas (Said-Fernández S. y López Revilla R. 1979), eliminando la actividad de proteasas (Said-Fernández, 1996, Taméz-Treviño et al., 2000). Se expuso el contenido de los tubos dentro de una campana a un flujo continuo de nitrógeno estéril, utilizando un filtro para gases (Millipore,



Millipore Products Division, 80 Ashby Road, Bedford, MA, USA.) hasta evaporar completamente los solventes. Cada uno de los extractos amibianos se resuspendió con 1 ml Tris HCl, 0.08 M (pH 8), agitando con un Vortex durante 10 min, y luego se sonicaron con un sonicador para dentistas por 30 min, a temperatura de laboratorio. Se mezcló el contenido de todos los tubos en uno solo (Corning Inc, Corning NY., USA) estéril, de 15 ml, con tapón de rosca y posteriormente el extracto crudo del antígeno o antígeno total amibiano (ATA) se dividió en fracciones y se virtió en condiciones estériles en tubos para congelación (Nalgene, Labware Division, N.Y., USA) de 1.5 ml de capacidad. Estas fracciones se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en criocongelador REVCO (Ultralow, Revco Inc, West Columbia, USA) hasta su uso.

El ATA particulado se resuspendió con la ayuda de un mezclador mecánico (vórtex) y se usó directamente. Mientras que el ATA soluble se preparó en un tubo para congelación (ver antes) agregando 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 10 N a 1.5 ml de la

suspensión de ATA particulado, arriba descrita. El vial con el antígeno se agitó vigorosamente y luego se calentó a fuego directo durante 3 segundos por tres ocasiones intervalo de 10 seg entre cada evento. Finalmente se ajustó el pH a 7.4, agregando 50  $\mu\text{l}$  de HCl 1N y se agitó durante un minuto y luego se almacenó en los mismos tubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La concentraciones de proteína en ATA soluble y ATA particulado se determinaron mediante el método de Lowry y cols. (1951).

### 2.5.2 Cuantificación de proteínas:

Se utilizó el método de Lowry y cols. (1951).

Se preparó una curva estándar con concentraciones variables de una solución de 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, fracción V (SAB), en tubos de ensayo de acuerdo a lo especificado en la Tabla 1.

**Tabla 1. Curva estándar de seroalbúmina bovina**

SAB ( $\mu$ l)	Agua desionizada
0 $\mu$ l	200 $\mu$ l
5 $\mu$ l	195 $\mu$ l
10 $\mu$ l	190 $\mu$ l
20 $\mu$ l	180 $\mu$ l
40 $\mu$ l	160 $\mu$ l
60 $\mu$ l	140 $\mu$ l
80 $\mu$ l	120 $\mu$ l

Se prepararon también tubos de ensayo conteniendo volúmenes variables de las preparaciones de ATA soluble o particulado. A cada uno de los tubos se le agregó 1 ml de reactivo C. Inmediatamente después se mezcló el contenido de cada tubo en un vortex y se incubaron todos los tubos por 10 min a temperatura de laboratorio. Luego se agregaron 0.1 ml de reactivo de Folin recién preparado, se agitó nuevamente y se incubó por 30 min a temperatura de laboratorio. Se determinó la  $A_{750}$  del contenido de cada tubo con un espectrofotómetro (Zeiss, modelo PMQ-3. Alemania Oriental). En todos los casos las mediciones se hicieron por triplicado. Se graficó la  $A_{750}$  en función de la concentración de SAB (expresada como  $\mu$ g de proteína/ml). En esta curva se calculó por interpolación, mediante regresión lineal, la cantidad de proteínas contenidas en las preparaciones de ATA.

### 2.5.3 Separación de células mononucleares de sangre periférica.

Se colectó sangre venosa periférica del voluntario sano, utilizando tubos Vacutainer, (Becton Dickinson, Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NY, USA) estériles de 16 × 100 mm y 10 ml de capacidad, conteniendo heparina sódica como anticoagulante. Se utilizó una aguja de cal 22 g. En cada colecta se llenaron hasta la mitad de su capacidad 12 tubos. A cada tubo se le agregaron 6 ml de PBS estéril. El contenido de cada tubo se transvasó suavemente y en condiciones de esterilidad, a un tubo cónico de polipropileno (Corning Inc, Corning NY., USA) de 15 ml con tapón de rosca, conteniendo 3 ml de Ficoll-Hypaque estéril, procurando no mezclar las fases. Las preparaciones se centrifugaron en centrifuga SORVALL modelo RC-3B (Sorvall Instruments, NY, USA) a 400 × g por 10 min para separar las células mononucleares de sangre periférica (CMP) (Fig. 1). La capa de CMP se recuperó de cada uno de los tubos con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Todas las CMP se distribuyeron a volúmenes iguales en 2 tubos cónicos nuevos, los cuales se terminaron de llenar con PBS estéril y se centrifugaron a 400 × g por 10 min. Se aspiraron los sobrenadantes con una pipeta Pasteur estéril conectada a vacío y las pastillas de células se resuspendieron y se mezclaron en un solo tubo (Corning Inc, Corning NY., USA). Estas células se lavaron con PBS estéril y se sedimentaron nuevamente por centrifugación, como en el paso anterior. Las células se resuspendieron en 2 ml de medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero bovino fetal, se contaron con un hematocitómetro y se determinó el porcentaje de CMP viables con Azul de Tripano, como se describe enseguida.

### 2.5.3 Aislamiento de Monocitos de sangre humana por centrifugación en gradiente de densidad.

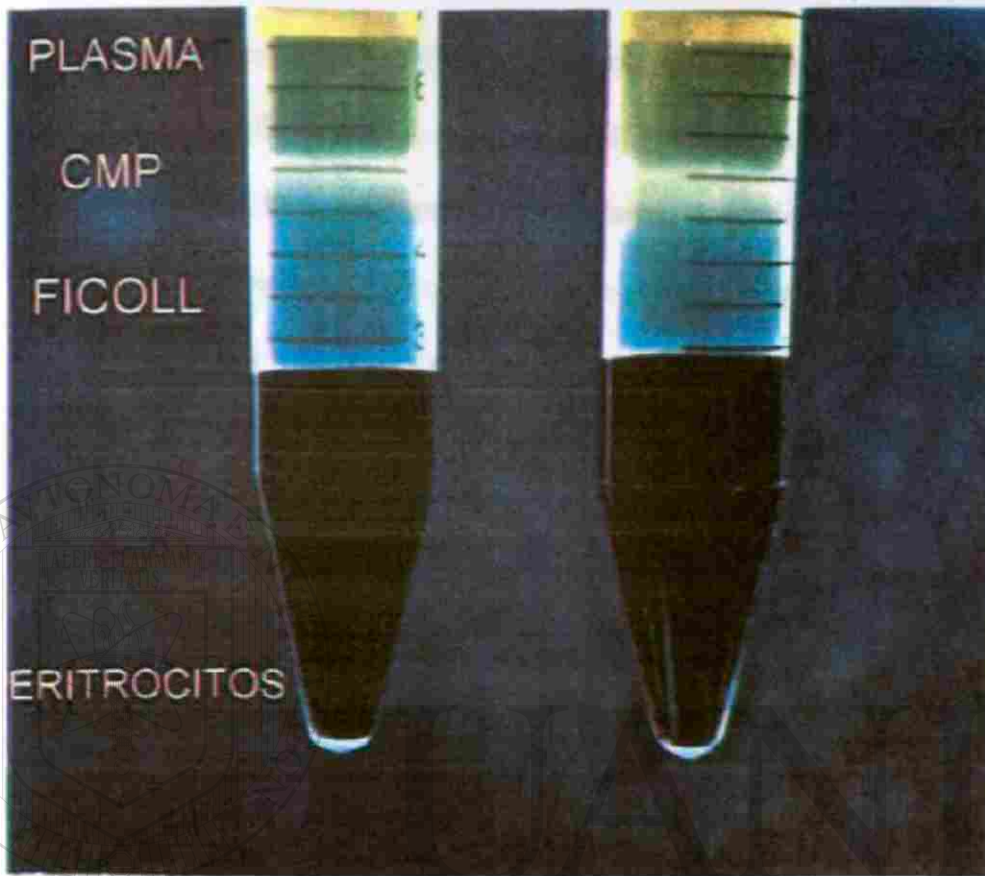


Figura 1.- Se muestran tubos cónicos de polipropileno estériles de 15 ml de capacidad y con tapón de rosca posterior a centrifugar durante 10 min a  $400 \times g$ . Se observa en la parte superior el plasma, luego una delgada capa conteniendo las células mononucleares periféricas, enseguida una capa traslúcida correspondiente al Ficoll-Hypaque estéril y finalmente en el fondo se depositan los eritrocitos y el resto del paquete celular.

#### 2.5.4 Determinación de la viabilidad de CMP

Se mezclaron en un portaobjetos una gota de la suspensión de CMP y una gota de Azul de Tripiano al 0.1%. Se incubó la preparación por 5 min a temperatura de laboratorio y se determinó el porcentaje de células vivas, contando al menos 100 células

### **2.5.5 Activación de linfocitos de sangre venosa periférica utilizando antígenos ambientales.**

Se resuspendieron las CMP en un volumen suficiente de medio RPMI adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF) para ajustar su concentración a  $1 \times 10^6$  células/ml. De esta preparación se inocularon, en condiciones de asepsia, 100  $\mu$ l en un número variable de pozos, de acuerdo con el diseño de cada experimento. Utilizamos en todos los casos microplacas estériles de 96 pozos (Corning Inc, Corning NY., USA). Los ensayos incluyeron 5 pozos para cada reactivo a probar y se realizaron por triplicado. Se incluyeron sistemáticamente una serie de estos pozos que correspondió a los testigos negativos y a los testigos positivos. Los testigos negativos fueron cultivos sin tratar, en los que las células solo se adicionaron con 100  $\mu$ l de medio RPMI con 10% de SFB. Los testigos positivos, recibieron 10  $\mu$ l de fitohemaglutinina (FHA, 10 mg/ml) en 90  $\mu$ l de medio RPMI con 10% de SFB. El resto de los grupos fueron experimentales y recibieron ATA

soluble o particulado (2,5, 5, 10 20 ó 40 mg/ml), según se explica en el pie de figura de cada experimento. Los cultivos de CMP se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 72 h. Se agregaron a cada pozo 10  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H-TdR] (1  $\mu$ Ci/ 10  $\mu$ l). Las preparaciones se incubaron por 0.5-24 h en las mismas condiciones, según se explica en el pie de figura de cada experimento. Los sobrenadantes de cada pozo se utilizaron para estos ensayos porque contenían exclusivamente linfocitos (tomando ventaja de que los macrófagos se adhieren a la pared de los pozos y los sobrenadantes contienen únicamente linfocitos) (Penhline KJ 1981). Las suspensiones de linfocitos se lavaron tres veces con PBS frío,

colocando éstas en tubos cónicos Eppendorf (Brinkman Instruments Inc. One Cantiage Road, Westbury, NY., USA) de 1.5 ml de capacidad y centrifugando a  $400 \times g$  por 10 min. La suspensión de linfocitos de cada tubo se vertió sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman, Whatman International Ltd, Maidstone, England), y éstos se colocaron sobre un colector de fracciones para filtración 1225 (Millipore, Millipore Products Division, 80 Ashby road, Bedford, MA, USA.) conectado a un sistema de vacío. Las preparaciones se fijaron agregando 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) al 5% y agregando sucesivamente 1 ml de soluciones de concentración seriada de etanol 60-100% y 1 ml de acetona. Los filtros se retiraron del colector utilizando pinzas y guantes estériles y se colocaron en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Finalmente cada uno de los filtros se colocó en viales para centelleo líquido de 20 ml de capacidad  $27 \times 61\text{mm}$  (Wheaton, Science Products, Millville, NJ, USA.). Se agregaron 5 ml de líquido para centelleo para muestras secas (Pierce, Rockford, Illinois, USA) y se determinó la radiactividad en cada uno de ellos en un contador Packard, Tri-Carb, (Acanverra Company, modelo TR-1600, USA), ajustada para muestras sin *quenching* y una eficiencia para  $^3\text{H}$  de 98% . Finalmente se graficaron los promedios y desviación estándar de cada determinación.

#### **2.5.6 Determinación de la producción de NO en cultivos de CMP.**

Se inoculó un número variable de pozos con 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión fresca de CMP como se hizo con los experimentos de incorporación de [ $^3\text{H}$ -TdR] y se dividieron en un número variable de grupos (de acuerdo con el diseño de cada experimento, ver pies de las figuras 5-9, 11 y 12) de 5 pozos cada grupo. El grupo

1 (testigo negativo) solo recibió 100  $\mu$ l de medio RPMI adicionado con 10% de SFB. El grupo 2 se adicionó con 100  $\mu$ l de LPS (10 mg/ml) ó 100  $\mu$ l de SAB (40 mg/ml), según se indica. El resto de los grupos correspondieron a las preparaciones experimentales, y contenían concentraciones variables de ATA soluble o particulado (1-40 mg de proteínas/ml), equivalente a 100  $\mu$ g- 4 mg de proteínas totales. Las microplacas se incubaron a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 12-72 h. Se desecharon los sobrenadantes y a cada pozo se le agregaron 200  $\mu$ l de medio RPMI mas 10% de SBF fresco, las microplacas se re-incubaron por 72 h y se aspiraron se determinó la concentración de nitritos en los sobrenadantes por el método de Griess. Se graficaron los promedios  $\pm$  error estándar (EE) de cada determinación.

### **2.5.7 Cuantificación de nitritos.**

La cuantificación de nitritos en las muestras se realizó por el método de Griess (Green, 1982; Thitherradge, 1998). Se preparó una curva estándar con una serie de concentraciones de la solución estándar de nitritos, en pasos de 2 en 2 de 62.5 a 3.9  $\mu$ M (concentraciones 5-1). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 $\mu$ l de agua bidestilada y 100  $\mu$ l (por duplicado) de las soluciones de nitritos 5 a 1 por duplicado. En la misma placa se colocaron, por triplicado 100  $\mu$ l de los sobrenadantes de cultivos de CMP. A cada pozo de la curva estándar o a los que contenían sobrenadantes se les agregaron 100  $\mu$ l del reactivo de Griess. Las microplacas se agitaron suavemente por 1 min. Y luego se incubaron a temperatura de laboratorio por 10 min. Se determinó la A<sub>545</sub> en un



espectrofotómetro con lector de microplacas (Sigma diagnostics, EIA multi-well reader, St Louis Missouri, USA). Se grafican los promedios  $\pm$  EE.

### **2.5.8 Determinación de la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano:**

Se inocularon 100  $\mu$ l por pozo de una suspensión de CMP en medio RPMI + 10% SBF ( $1 \times 10^6$  células/ml) en micropalacas de 96 pozos. Para los ensayos se formaron 22 grupos de 5 pozos cada uno. El grupo 1 se usó como testigo negativo, al cual se agregaron únicamente 100  $\mu$ l de medio RPMI mas 10% de SFB. A los grupos 2-6 y del 11 al 16 se les agregaron 80  $\mu$ l de la solución 9 mg de ATA soluble/ml. A los grupos 1, 7-10 y 17 al 22 no se les agregó antígeno. Además, a los grupos 5 y 9 se les agregaron 10 $\mu$ l de LPS (10 mg/ml); a los grupos 6 y 10 se les agregaron 10  $\mu$ l de LPS (10 mg/ml) mas 10  $\mu$ l de INF- $\gamma$  (10,000 unidades/ml) a los grupos 3 y 7 se adicionaron los mismos reactivos pero en orden invertido; a los grupos 13 y 19 se agregaron 10 $\mu$ l de LPS (10 mg/ml) mas 30  $\mu$ l de INF- $\gamma$ ; mientras a los grupos 11 y 17 se agregaron los mismos reactivos pero también en orden invertido; a los grupos 16 y 22 se les agregaron 10 $\mu$ l de LPS (10 mg/ml) mas 50  $\mu$ l de INF- $\gamma$ ; mientras a los grupos 14 y 20 se agregaron los mismos reactivos pero también en orden invertido. Luego a los grupos 4 y 8 se agregaron únicamente 10  $\mu$ l de INF- $\gamma$  (10,000 unidades/ml); a los grupos 12 y 18 se agregaron únicamente 30  $\mu$ l de INF- $\gamma$ ; a los grupos 15 y 21 se agregaron únicamente 30  $\mu$ l de INF- $\gamma$  (ver tabla 2). Todos los pozos se ajustaron a un volumen de 230 $\mu$ l por pozo utilizando medio RPMI + 10% SBF. Las cajas de cultivo se incubaron durante 12 horas a 37° C en atmósfera de CO<sup>2</sup> al 5%. Se cambió el medio usado por 200  $\mu$ l de medio RPMI fresco más 10% de SFB y se



incubó por otras 72 h en las mismas condiciones. Se determinó la producción de nitritos por el método de Griess en los sobrenadantes de los pozos. Se graficaron los promedios  $\pm$  EE de ensayos hechos por triplicado.

**Tabla 2.- Muestra los ingredientes de cada grupo de pozos durante el ensayo para determinar la capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.**

Grupo 1 Medio RPMI	Grupo 2 Medio RPMI ATA	Grupo 3 Medio RPMI ATA IFN 100 U LPS	Grupo 4 Medio RPMI ATA IFN 100 U	Grupo 5 Medio RPMI ATA LPS	Grupo 6 Medio RPMI ATA LPS IFN 100 U
Grupo 7 Medio RPMI IFN 100 U LPS	Grupo 8 Medio RPMI IFN- $\gamma$ 100 U	Grupo 9 Medio RPMI LPS	Grupo 10 Medio RPMI LPS IFN 100 U	Grupo 11 Medio RPMI ATA IFN- $\gamma$ 300 U LPS	Grupo 12 Medio RPMI ATA IFN- $\gamma$ 300 U
Grupo 13 Medio RPMI ATA LPS IFN- $\gamma$ 300 U	Grupo 14 Medio RPMI ATA IFN- $\gamma$ 500 U LPS	Grupo 15 Medio RPMI ATA IFN- $\gamma$ 500 U	Grupo 16 Medio RPMI ATA LPS IFN 500 U	Grupo 17 Medio RPMI IFN- $\gamma$ 300 U LPS	Grupo 18 Medio RPMI IFN- $\gamma$ 300 U
Grupo 19 Medio RPMI LPS IFN- $\gamma$ 300 U	Grupo 20 Medio RPMI IFN 500 U LPS	Grupo 21 Medio RPMI IFN- $\gamma$ 500 U	Grupo 22 Medio RPMI LPS IFN- $\gamma$ 500 U		

### 2.5.9 Inhibición de la presentación del antígeno utilizando glutaraldehído.

Cultivos de CMP en microplacas, preparados como antes se describió, se adicionaron con 80  $\mu$ l de ATA-soluble (a una concentración de 9 mg/ml). A 5 pozos con cultivos de CMP se les agregaron 20  $\mu$ l de glutaraldehído 0.05%, 1 y 4 h después de agregado el ATA. Las microplacas se re-incubaron durante 12 h a 37° C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se aspiraron los sobrenadantes, se agregaron 200  $\mu$ l de medio fresco y se re-incubaron por 72 h. Se determinó la concentración de nitritos como antes se describió y se calculó el promedio  $\pm$  EE de los resultados de tres experimentos independientes por quintuplicado.

### **2.5.10 Digestión del ATA con tripsina:**

Se ajustó la concentración de ATA soluble a 2 mg de proteínas/ml con Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) y se mezcló con 1 volumen de carbonato de amonio 40 mM y un volumen apropiado de la solución de tripsina para ajustar ésta a una concentración de 1:50 (p/p con respecto a la concentración de proteínas amibianas que deseábamos digerir). La preparación se incubó a temperatura de laboratorio por 24 h. El producto se ultrafiltró, utilizando cartuchos de ultrafiltración (Millipore, Millipore Products Division, 80 Ashby road, Bedford, MA, USA), con corte a 5,000 kDa y centrifugando a temperatura ambiente, a  $800 \times g$  por 30 min.

**2.5.11 Producción de NO por CMP estimuladas con ATA digerido con tripsina:** Resuspendimos una sus pensión de CMP recién obtenidas en medio RPMI adicionado con 10% de suero bovino fetal, ajustando su concentración a  $1 \times 10^6$  células/ml. Se inoculó esta suspensión en micorplacas de 96 pozos (100 µl por pozo). En cada experimento se utilizó un grupo de 5 cultivos de CMP como testigo

negativo (no tratado), y otro de 5 cultivos positivos, adicionados con 100 µl de LPS (10 mg/ml). Se incluyó además un grupo conteniendo únicamente tripsina autodigerida, solubilizada y ultrafiltrada con cartuchos de 5,000 kDa de corte, como se hizo con el ATA soluble digerido con tripsina. El resto de los cultivos se trató con diferentes concentraciones (1-36 mg/ml) del antígeno amibiano digerido con tripsina (AADT) en forma soluble. Las microplacas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 12 h. Se aspiraron los sobrenadantes y se cambió el medio de cultivo por 200 µl de medio fresco RPMI adicionado con 10% de SBF y se re-incubó por 72 h. Se transvasaron los sobrenadantes de cada pozo a

microplacas nuevas y se determinó en cada uno la cantidad de nitritos por el método de Griess. Estos experimentos se repitieron 3 veces, cada uno por quintuplicado. Se graficó el promedio  $\pm$  EE, producido por la CMP estimuladas con cada una de las concentraciones de AADT arriba mencionadas.

### 2.5.12 Separación de fracciones del antígeno amibiano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

El AADT se separó mediante HPLC, con cromatógrafo (Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, Massachussets, USA) equipado con un controlador modelo 600, un inyector 717 plus, un detector de fotodiodos 996, un degasificador de solventes Degassit (Metachem Technologies Inc., 3547 Voyager street, Torrance, CA, USA). Los registros se analizaron en un procesador Dell Optiplex GX1 equipado con el software para cromatogramas Waters Millenium 32. Se aplicó la técnica de fase reversa, utilizando una columna (Waters), modelo Symetry C18 de tamaño de poro de 5  $\mu$ m y 3.9  $\times$  150 mm además de una guarda

columna (Waters), modelo Sentry C18, con malla de 5  $\mu$ m, y dimensiones de 3.9  $\times$  20 mm. Como fase móvil se empleó un gradiente de concentración preparado a partir de ácido trifluoroacético grado HPLC (TFA, por sus siglas en Inglés: *trifluoroacetic acid*) al 1% en agua y acetonitrilo grado HPLC al 100%. El gradiente se generó colocando acetonitrilo en el reservorio A y TFA al 1% en el reservorio B, utilizando el siguiente programa (Tabla 3).

**Tabla 3. Programa de elución de las fracciones de AADT**

TIEMPO	FLUJO
0- 5 min	100% A
5-40 min	incremento lineal 0-60% de B
40-45 min	60% B
45-50 min	Disminución gradual del 60 al 0% de B

El volumen de cada inyección de fue variable de 10 a 100  $\mu$ l. El flujo se mantuvo constante a 1ml por mín. Se colectaron fracciones de 1.6 ml con un colector de fracciones Espectra-Crom CF-1 Spectrum (Spectrum Quality Products Inc., New Brunswick, NJ, USA).

#### **2.5.13 Preparación de las fracciones de antígeno amibiano obtenidas por HPLC para el bioensayo de producción de NO.**

Se colocó cada fracción del AADT separada por HPLC en viales Eppendorf de 1.8 ml de capacidad y éstas se secaron en un concentrador de fracciones [(Centrivap, Labconco ) (por 2 h)]. Las muestras se resuspendieron con 1 ml de Tris HCl 80 mM (pH 8). Se estimó la concentración de proteína en todas las fracciones aisladas (expresada como equivalente a mg de proteínas/ml), utilizando como estándar el coeficiente de extinción molar de albúmina 220 nm. La densidad óptica (DO) de las fracciones se determinó con un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-650i. Las muestras se filtraron con filtros de nitrocelulosa

para muestras acuosas de 13 mm de diámetro y 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore Products Division, 80 Ashby Road, Bedford, MA, USA.) para eliminar cualquier posible contaminación y la DO equivalente de proteínas se estandarizó en todas las fracciones. Se ensayó la capacidad de cada una de éstas para inducir la producción de NO de acuerdo con los métodos antes descritos.

#### **2.5.14 Determinación de la capacidad de las fracciones de antígeno amibiano separadas por HPLC para inducir la producción de NO.**

Cultivos de CMP en pozos de placas de cultivo, preparados como antes se describió, se adicionaron con 10-50  $\mu$ l de todas las fracciones obtenidas por

HPLC, agregando de 90-50  $\mu\text{l}$  de medio RPMI adicionado con SFB hasta completar 100  $\mu\text{l}$  entre el antígeno mas el medio. En un primer experimento se utilizaron las fracciones obtenidas por HPLC con la concentración de péptidos con la que se obtuvo cada una de ellas. Una vez identificadas las fracciones con mayor y menor capacidad inductora de producción NO se estandarizó la  $A_{220}$  de las fracciones con mayor eficacia estimuladora y el de una fracción irrelevante, escogida al azar. Para ello cada fracción se concentró a sequedad en el Centrivap, se resuspendió su contenido en agua bidestilada y se ajustó la concentración de péptidos en cada una de ellas a un equivalente de 8.5 mg/ml. De cada una de estas fracciones se agregó una cantidad de péptidos equivalente a 0.85 mg por pozo. Las microplacas se incubaron a 37 °C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, por 12 h. Luego se cambió el medio de cultivo por 200  $\mu\text{l}$  de medio RPMI fresco adicionado con 10% de SFB, y los cultivos de CMP se re-incubaron durante 72 h. Se determinó la concentración de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos, utilizando el método de Griess, y se graficaron los promedios de estas concentraciones  $\pm$  EE.

#### **2.5.15 Inducción de la activación de los macrófagos humanos por fracciones del antígeno amibiano para matar trofozoítos de *E. histolytica in vitro*.**

Los cultivos conteniendo 100  $\mu\text{l}$  de  $1 \times 10^6$  CMP se dividieron en 2 grupos de cinco pozos el primero y 10 pozos el segundo, en uno de los grupos al que denominamos de macrófagos activados se agregaron 80  $\mu\text{l}$  de una mezcla a partes iguales de las fracciones aisladas del ATA (fracciones del HPLC 4 y 9), conteniendo un equivalente de 8.5 mg de péptidos/ml y 10  $\mu\text{l}$  de LPS (10 mg/ml). Al otro grupo al que denominamos grupo de macrófagos sin activar; se agregaron

solamente 100 ml de medio RPMI con 10% de SBF. Se incubaron por 12 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se aspiraron los sobrenadantes de cada pozo y se sustituyeron con 200 µl de medio RPMI fresco con 10% de SFB. Se incubó nuevamente en las mismas condiciones por 72 h.

Por otro lado se cosecharon 2 tubos con amibas virulentas de la cepa HM1-IMSS, en su tercer día de crecimiento en medio PEHPS (Said-Fernández y cols., 1988). Se resuspendieron las amibas en PBS estéril. Se determinó la densidad celular con un hematocitómetro y se ajustó ésta a  $1 \times 10^6$  amibas/ml con PBS estéril.

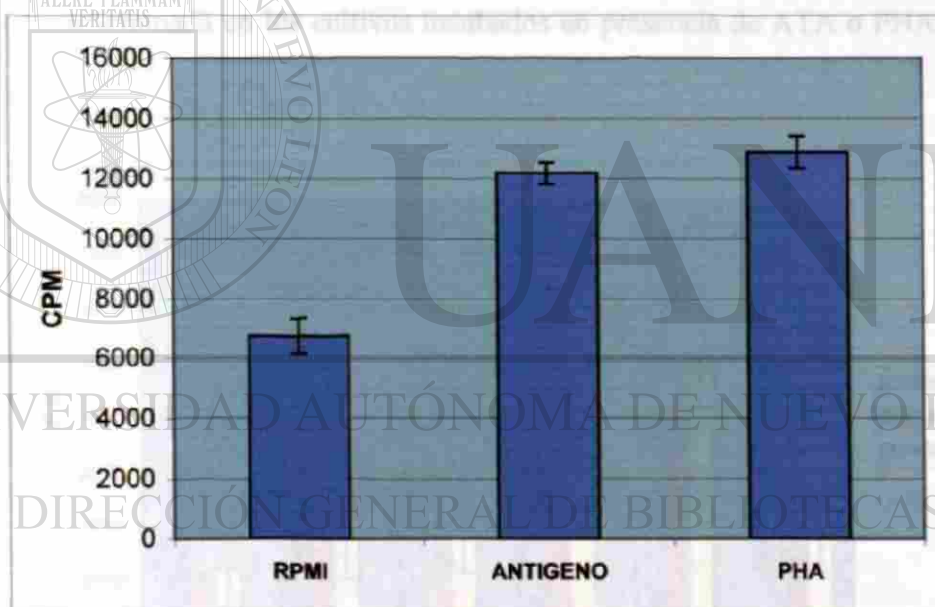
Luego se formaron 4 grupos; al primer grupo se agregaron 50 µl de amibas a cada pozo con macrófagos activados. Al segundo grupo se agregaron 50 µl de amibas a cada pozo con macrófagos sin activar. Para el tercer grupo se agregaron únicamente 50 µl de medio RPMI fresco a macrófagos sin activar. En el cuarto grupo se agregaron a pozos vacíos 200 µl de medio RPMI mas 10% de SBF y

luego amibas  $1 \times 10^6$  amibas/ml 50 µl a cada pozo. Se incubó a 37 °C por 30 min en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se determinó la viabilidad celular agregando una gota de azul tripano 0.1 % a cada uno de los pozos, y observando en un microscopio invertido (Zeiss, Iroscope, Modelo SI-PH No. 200061, Alemania). Se graficaron los promedios de tres experimentos por triplicado  $\pm$  EE.

### 3.1 Inducción de proliferación de linfocitos humanos por antígeno amibiano

#### 3.1.1 Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado en cultivos de células mononucleares periféricas.

La Fig. 2 muestra que una dosis de 40 mg/ml de ATA indujo una proliferación de linfocitos (observada como incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR) 1.9 veces superior a los testigos no tratados ( $p < 0.01$ ), y similar a la inducida por fitohemaglutinina de germen de trigo ( $p > 0.05$ ).



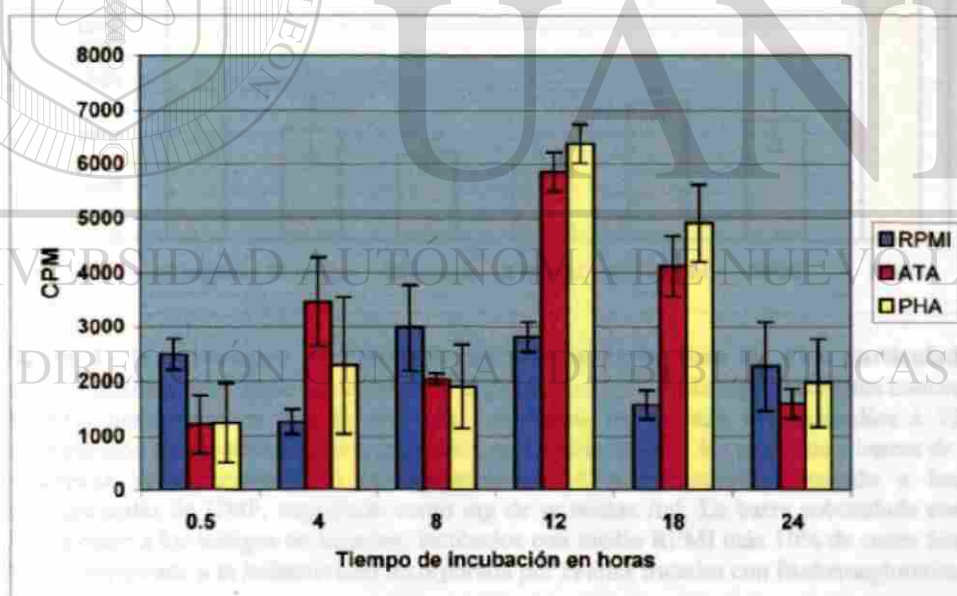
**Figura 2.-** Incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR por CMP en presencia de ATA particulado. En microplacas de 96 pozos se mezclaron 100  $\mu$ l de una suspensión de CMP con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/ml y 100  $\mu$ l (40 mg de proteínas/ml) de ATA particulado, 100  $\mu$ l de medio RPMI más 10% de SBF ó 100  $\mu$ l de fitohemaglutinina (PHA)(10 mg/ml). Las preparaciones se incubaron 72 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. A todos los pozos se les agregaron 10  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H]-TdR] (1 $\mu$ Ci) y luego se re-incubaron 18 h. Las CMP se lavaron tres veces con medio RPMI más 10% de suero fetal bovino, se fijaron sobre filtros de fibra de vidrio con 1 ml de TCA al 5%, frío, y se deshidrataron con varias concentraciones de etanol (60 al 100%) y acetona. Los filtros se secaron a 60 °C por 30 min y se determinó su radiactividad, expresada como CPM. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el error estándar (EE) de 3 experimentos independientes, por triplicado.



**3.1.2.- Relación temporal de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por antígeno amibiano particulado.** El ATA particulado 40 mg/ml indujo proliferación de CMP a las 12 y 18 h de incubación a 36 °C. El efecto mitogénico de ATA bajo estas condiciones fue cuantitativamente comparable al producido por PHA ( $p > 0.05$ ). Entre estos 2 tiempos, la incubación por 12 h produjo la mayor incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR (1.43 veces). A las 4, 8 y 24 h de incubación no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de [<sup>3</sup>H]-TdR incorporada por los cultivos no tratados y los tratados con ATA ( $p > 0.05$ ).

A los 30 min la radiactividad incorporada por los testigos no tratados fue superior a la determinada en los cultivos incubados en presencia de ATA o PHA ( $p < 0.05$ )

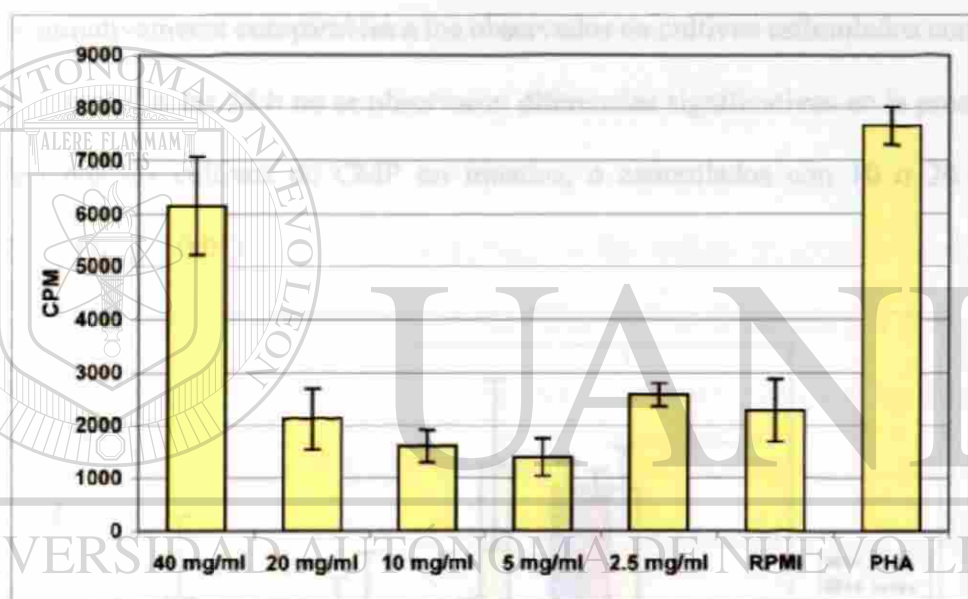
(Fig. 3).



**Figura 3.- Relación temporal de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR inducida por ATA particulado en cultivos de CMP.** Estos ensayos se realizaron como se describe en el pie de la Fig. 2, pero en vez de incubar las preparaciones en un solo tiempo después de agregar la [<sup>3</sup>H]-TdR se usaron varios tiempos de post-incubación. Las barras  $\pm$  EE corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Las barras marcadas como RPMI corresponden a cultivos celulares no tratados que recibieron medio RPMI más 10% de suero fetal bovino, las marcadas como ATA y PHA se incubaron en presencia de ATA particulado y fitohemaglutinina, respectivamente.



**3.1.3.- Proliferación de CMP inducida en función de la dosis de ATA.** La proliferación observada fue dependiente de la dosis de ATA. Se observó el mayor efecto mitogénico sobre cultivos de CMP a una dosis equivalente a 40 mg de proteínas totales/ml. Este efecto fue 3 veces mayor que el de los testigos no tratados y comparable al producido por PHA (10 mg/ml) ( $p < 0.05$ ). Mientras que incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-TdR inducida por 2.5, 5, 10, y 20 mg de ATA/ml fue similar a la de los testigos no tratados ( $p > 0.05$ ) (Fig 4).

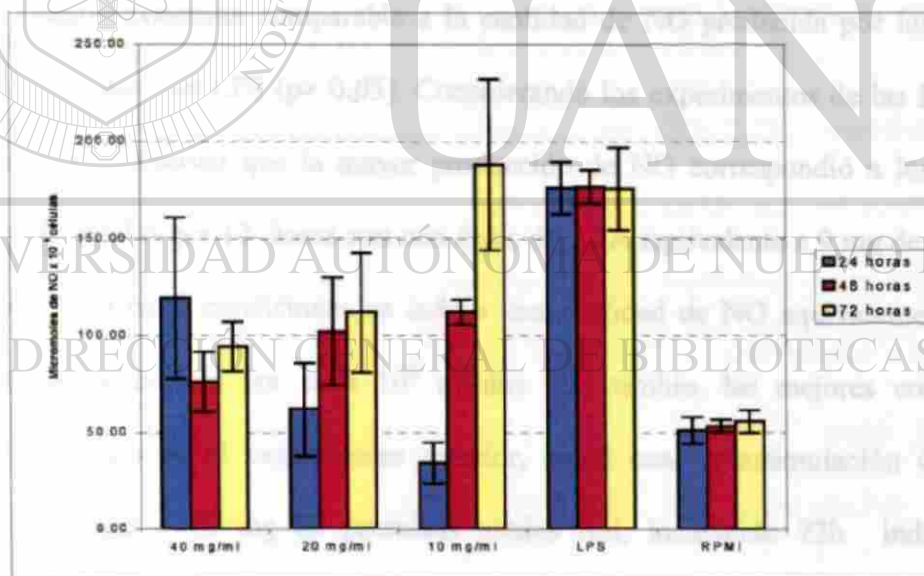


**Figura 4.- Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-TdR en función de la dosis de ATA particulado.** Estos ensayos se realizaron como se describe en el pie de la Fig. 2, utilizando diferentes concentraciones de ATA particulado en vez de una sola. Las barras representan los promedios  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por triplicado. Las cantidades bajo las primeras 5 barras de izquierda a derecha corresponden a la concentración de ATA particulado agregado a los cultivos experimentales de CMP, expresado como mg de proteínas /ml. La barra subtitulada como RPMI corresponde a los testigos no tratados, incubados con medio RPMI más 10% de suero fetal bovino. PHA corresponde a la radiactividad incorporada por células tratadas con fitohemaglutinina.

### 3.2 Estimulación de la producción de NO por ATA.

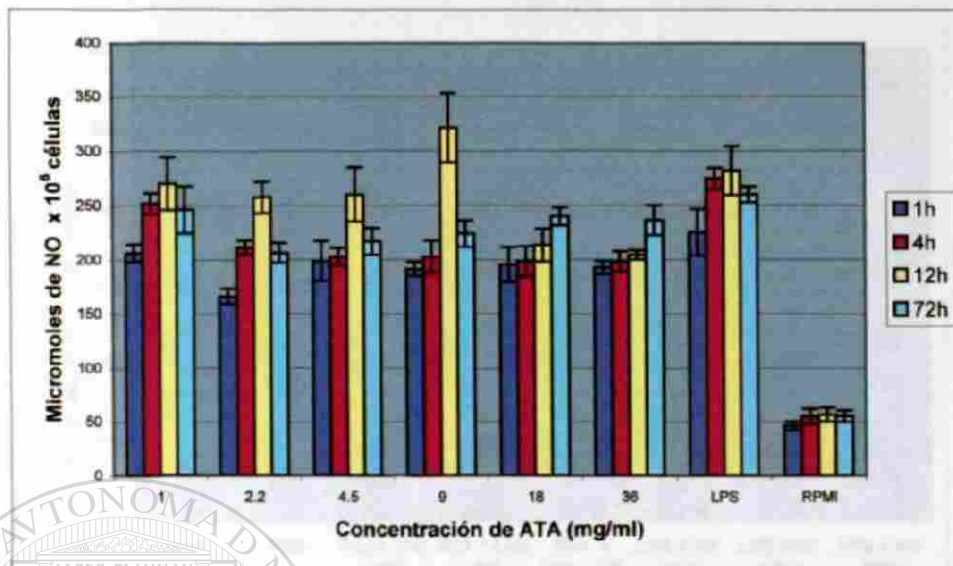
La Fig. 5 muestra que entre las 48 y las 72 h de incubación hubo una relación inversa en producción NO con respecto a la dosis: A las 48 h y 72 h la producción de NO fue 1.5 y 2 veces mayor con 10 mg/ml que con 40 mg/ml, ( $p <$

0.05 y 0.001) respectivamente. En cambio, a las 24 h esta relación fue directamente proporcional con respecto a la dosis de ATA: Una dosis de 40  $\mu\text{g/ml}$  indujo una respuesta 3.4 veces mayor que la inducida por 10  $\text{mg/ml}$  ( $p < 0.01$ ). La mayor la producción de NO se observó en cultivos tratados con 10  $\text{mg}$  de ATA soluble/ml, incubados por 72 h. Bajo estas condiciones, la producción de NO fue 2.8 veces mayor que los testigos no tratados, y 2.2 veces mayor que la observada con 40  $\text{mg/ml}$  de ATA. ( $p < 0.0001$  y 0.001). Estos valores fueron cuantitativamente comparables a los observados en cultivos estimulados con LPS ( $p > 0.05$ ). A las 24 h no se observaron diferencias significativas en la producción NO por los cultivos de CMP no tratados, o estimulados con 10 o 20  $\text{mg}$  de ATA/ml ( $p > 0.01$ ).



**Figura 5.- Efecto de la dosis y el tiempo de incubación sobre la producción de NO.** En pozos de 200  $\mu\text{l}$  se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión celular  $1 \times 10^6$  CMP y 100  $\mu\text{l}$  de medio RPMI con 10% de SBF o 100  $\mu\text{l}$  de lipopolizacárido [(LPS) (10  $\text{mg/ml}$ )] o 100  $\mu\text{l}$  de diferentes concentraciones del ATA particulado (expresadas bajo las primeras 3 barras como  $\text{mg}$  de proteínas totales/ml). Estas preparaciones se incubaron en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores por tiempos de incubación variables (ver Fig. 2). En cada uno de estas preparaciones se determinó la concentración de nitritos por el método de Griess. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por quintuplicado.

Los resultados mostrados en la Fig. 6 son una continuación de los mostrados en la Fig. 5. Corresponden a la producción de NO por cultivos de CMP tratados con dosis variables de 1 a 36 mg/ml de ATA y pre-incubados e incubados por tiempos variables de 1-72 h con el antígeno. Posteriormente se aspiran los sobrenadantes, se agregó medio fresco y luego se reincubaron las cajas de cultivo por 72 h como en el experimento anterior. La Fig. 6 muestra que dosis de 1.0 a 36 mg de ATA soluble /ml estimularon la producción de NO después de incubación. Esta producción fue proporcional con respecto a tiempo de incubación de 1 a 12 h con todas las dosis probadas. La mayor producción de NO se observó en cultivos tratados con 9 mg de ATA soluble /ml, incubados por 12 h. Bajo estas condiciones la producción de NO fue 6 veces mayor que la los testigos no tratados ( $p < 0.0001$ ), y cuantitativamente comparable a la cantidad de NO producida por los cultivos estimulados con LPS ( $p > 0.05$ ). Considerando los experimentos de las Fig. 5 y 6 podemos observar que la mayor producción de NO correspondió a los cultivos preincubados por 12 horas con una dosis de ATA equivalente a 9 mg de proteínas /ml. Bajo estas condiciones se indujo una cantidad de NO equivalente a 325  $\mu$  moles de nitritos por cada  $10^6$  células. En cambio, las mejores condiciones encontradas en el experimento anterior, en el cual la estimulación con ATA equivalente a 10 mg de proteínas totales /ml, incubando 72h indujeron la producción NO equivalente a solo 200  $\mu$  moles de nitritos o sea 1.39 veces menos ( $p > 0.05$ ).

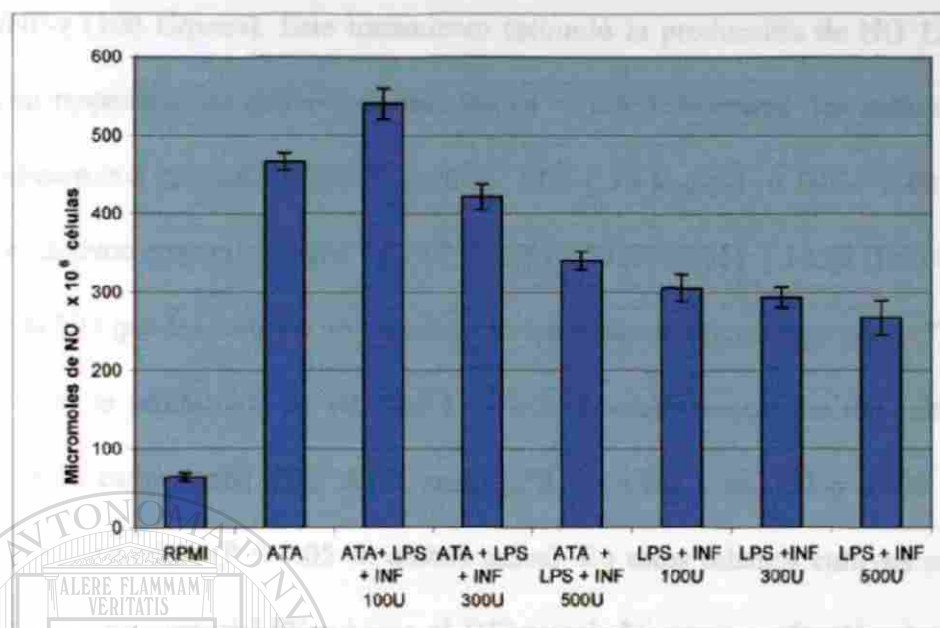


**Figura 6.- Relación temporal y efecto de diferentes concentraciones de ATA para inducir producción de NO.** Corresponden a la producción de NO por cultivos de CMP tratados con dosis variables de 1 a 36 mg/ml de ATA y pre-incubados por tiempos variables de 1-72 h con el antígeno. Se aspiraron los sobrenadantes, se agregó medio fresco luego se cultivaron las células por 72 h de la misma forma y con los mismos testigos que en el experimento anterior. A cada una de estas preparaciones se les determinó la concentración de nitritos. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por quintuplicado.

### 3.3 Co-estimulación de CMP humanas por ATA, LPS e Interferón- $\gamma$ .

La Fig 7 muestra que la producción de NO en los cultivos co-estimulados con ATA, LPS e INF- $\gamma$  fue inversamente proporcional a la dosis de INF- $\gamma$ . La mayor producción de NO correspondió a los cultivos estimulados con 9 mg de ATA soluble/ml, 10 mg de LPS/ml y 100 U de INF- $\gamma$  pozo. Bajo estas condiciones la producción de NO fue 1.28 y 1.58 veces mayor que con ATA, LPS y 300 y 500 U/pozo respectivamente ( $p < 0.05$ ) y 12.3 veces mayor el NO producido por los testigos no tratados ( $p < 0.01$ ).

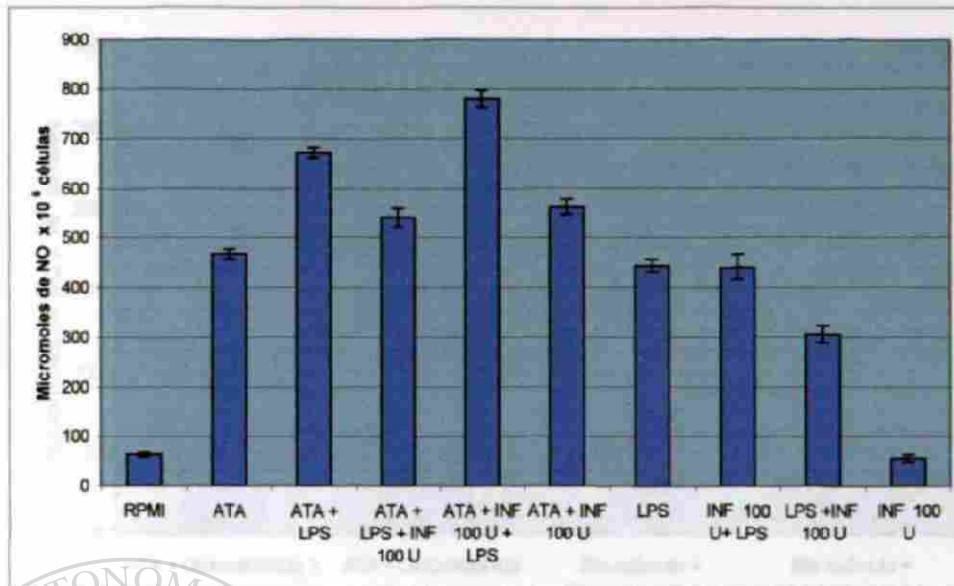




**Figura 7.- Co-estimulación de ATA con LPS e INF- $\gamma$ .** Estos experimentos se realizaron como en el ensayo anterior induciendo la producción de NO utilizando 100  $\mu$ l por pozo de la suspensión de CMP. La primera barra, de izquierda a derecha representa al testigo negativo al cual se incubó únicamente con medio RPMI + 10% de suero bovino fetal. La siguiente barra muestra la producción de NO inducida por ATA (9 mg/ml). Las siguientes tres barras muestran la producción de NO inducida por ATA + LPS (10 mg/ml) y diferentes dosis (100, 300 ó 500 U de INF- $\gamma$  por pozo (INF). Las últimas tres barras muestran la inducción de producción de NO por LPS e INF- $\gamma$  (100, 300 y 500 unidades respectivamente). Se muestran en la gráfica los promedios  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por quintuplicado.

La Fig. 8 muestra resultados que son continuación de los experimentos mostrados en la Fig. 7. En estos experimentos se usaron solo 100 U de INF- $\gamma$  solamente, pero se incluyeron como testigos cultivos de CMP tratados únicamente con 10 mg de LPS/ml y 100 U de INF- $\gamma$  solo. También se analizó el efecto adicionar los cultivos primero con INF- $\gamma$  y luego con LPS o viceversa. Los cultivos de CMP estimulados con ATA soluble, INF- $\gamma$  100 U por pozo y LPS produjeron una mayor cantidad de NO que los estimulados únicamente con ATA soluble (  $p < 0.01$ ). Además se muestra que la mayor producción de NO se

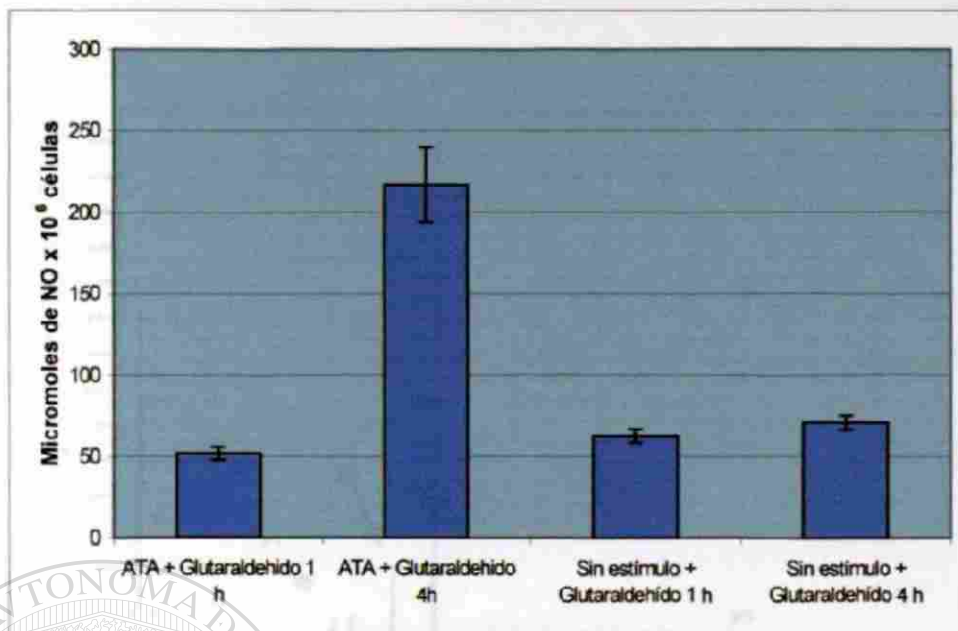
produjo en los cultivos estimulados con ATA soluble (9 mg/ml), LPS (10 mg/ml) e INF- $\gamma$  (100 U/pozo). Este tratamiento estimuló la producción de NO 12.3 veces con respecto a los cultivos no tratados ( $p < 0.01$ ). Mientras los cultivos que se adicionaron con solo ATA (9 mg/ml), LPS (10 mg/ml) o INF- $\gamma$  (100 U/pozo) produjeron respectivamente 1.67 ( $P < 0.05$ ), 1.76 ( $P < 0.05$ ) y 14.18 ( $P < 0.01$ ) veces más NO que los testigos no tratados. En los cultivos adicionados con ATA, INF- $\gamma$  y LPS la producción de NO fue 1.16 y 1.38 veces mayor que los cultivos que fueron estimulados con ATA mas LPS o ATA mas INF- $\gamma$  (100 U/pozo) respectivamente ( $P < 0.05$  en ambos casos). En estos mismos cultivos cuando se agregó primero el LPS y luego el INF- $\gamma$  se indujo una producción de NO 1.44 veces menor y valor de  $p < 0.05$ . Todos los cultivos sin ATA y con diferentes combinaciones de LPS e INF- $\gamma$  mostraron inducción de producción de NO de 1.38 hasta 14.18 veces menor que el grupo con antígeno INF- $\gamma$  y LPS y un valor de  $p < 0.05$ .



**Figura 8. Capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano.** Para estos ensayos se indujo la producción de NO como en los ensayos de la figura 7. La primera barra de izquierda a derecha representa al testigo negativo al cual se agregó únicamente RPMI + 10% de suero bovino fetal, enseguida la inducción por ATA (9mg/ml). La tercera barra muestra la producción de NO inducida por ATA + LPS (10mg/ml) la siguiente ATA + LPS + 100 U de INF- $\gamma$ . Las condiciones que indujeron la mayor producción de NO fueron ATA + 100 U de INF- $\gamma$  + LPS. Las últimas 5 barras muestran la producción inducida por ATA + 100 U de INF- $\gamma$ , LPS solo, 100 unidades de INF- $\gamma$  + LPS, LPS + 100 U de INF- $\gamma$ , y 100 U de INF- $\gamma$  solo. Cada barra representa el promedios  $\pm$  EE de tres experimentos independientes por quintuplicado.

### 3.4 Inhibición de la producción de NO por inhibición en la presentación del antígeno.

La producción de NO fue 4.2 veces mayor en CMP tratadas con glutaraldehído 0.05% 4 h después de haberse expuesto a 9 mg/ml de ATA con respecto a las células tratadas con glutaraldehído solo 1 h después del estímulo ( $p < 0.01$ ). En ausencia de ATA la producción de NO en células fijadas 1h o 4 h después de iniciado el experimento fue cuantitativamente comparable a las CMP fijadas 1 h después de haberlas puesto en contacto con el ATA ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9).



**Figura 9.- Efecto del bloqueo en la presentación del antígeno sobre la producción de NO.**

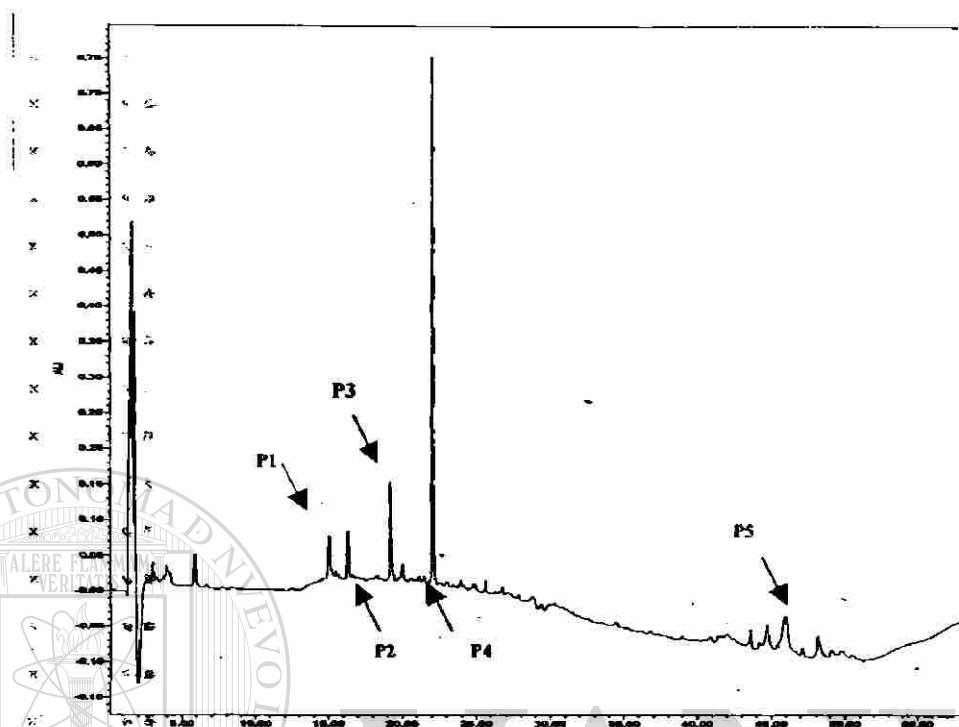
Se estimuló la producción de NO como en los ensayos anteriores, sólo que en esta ocasión se separaron los pozos cultivados en dos grupos, a la mitad se les agregaron 80  $\mu$ l por pozo de ATA (9 mg/ml) y a la otra sólo se agregó medio RPMI. Estos grupos se dividieron a su vez en dos grupos de 5 pozos. A cada uno de los pozos se les agregaron 20  $\mu$ l de glutaraldehído 0.05%, a la mitad se les agregó 1 h después de haber iniciado el ensayo y a la otra mitad a las 4 h. Luego se siguió el mismo proceso de inducción y cuantificación de producción de NO que en los ensayos anteriores. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes por triplicado.

### 3.5 Separación de fracciones del antígeno amibiano por HPLC

#### 3.5.1 Fraccionamiento del ATA por HPLC.

Los péptidos que resultaron de la digestión del ATA con tripsina se separaron mediante HPLC. Se colectaron 53 fracciones de 1.6 ml cada una. Además se detectaron 5 picos mayores, con absorbancia a 220 nm  $>$  0.05 y 20 picos menores, con  $A_{220} <$  0.05. Los picos mayores correspondieron a las siguientes fracciones: P1, fracción 4, P2, fracción 5, P3, fracción 7, P4 fracción 9 y P5 fracción 29. Los tiempos de retención y  $A_{220}$  de los picos mayores fueron los siguientes: P1, 15.23 min,  $A_{220}$ = 0.055 UDO, P2, 16.38 min,  $A_{220}$ =0.057 UDO, P3, 19.54 min,  $A_{220}$ =0.163 UDO, P4, 22.19 min  $A_{220}$ =0.752 UDO, P5, 45.81 min  $A_{220}$ =0.052. UDO (Fig 10).



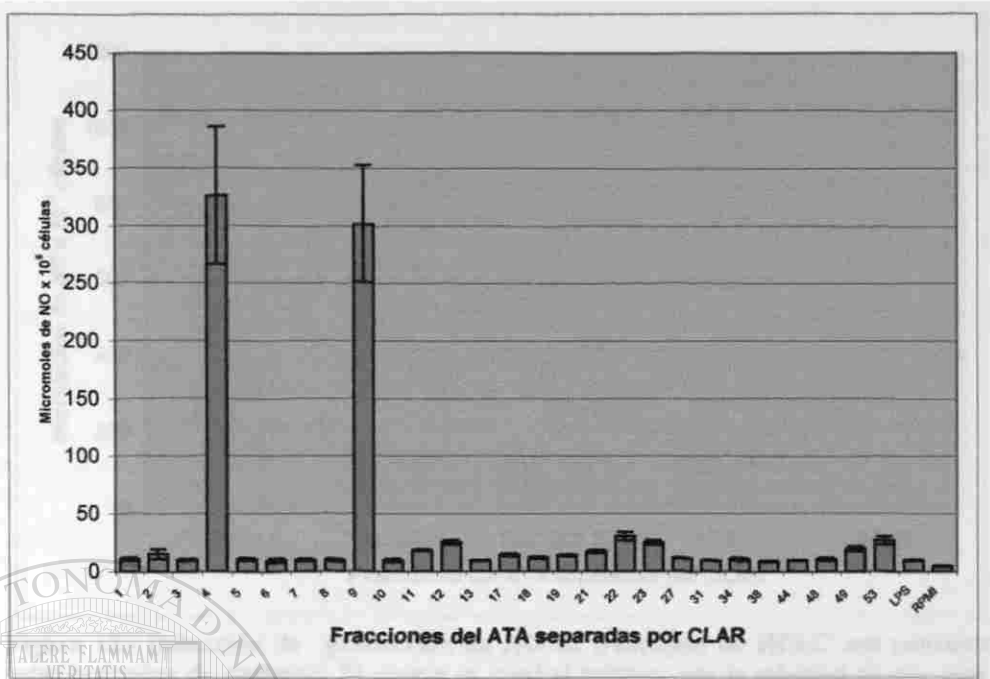


**Figura 10.- Separación de fracciones del ATA por HPLC.** El ATA soluble se digirió con tripsina y los péptidos se separaron mediante HPLC. Se colectaron fracciones de 1.6 ml. Los tiempos de retención y  $A_{220}$  de los 5 picos (P1 a P5) mayores fueron los siguientes: **P1**, 15.23 min,  $A_{220}=0.055$  UDO, **P2**, 16.38 min,  $A_{220}=0.057$  UDO, **P3**, 19.54 min,  $A_{220}=0.163$  UDO, **P4**, 22.19 min  $A_{220}=0.752$  UDO, **P5**, 45.81 min  $A_{220}=0.052$  UDO.

### 3.6 Inducción de producción de NO por fracciones separadas por HPLC

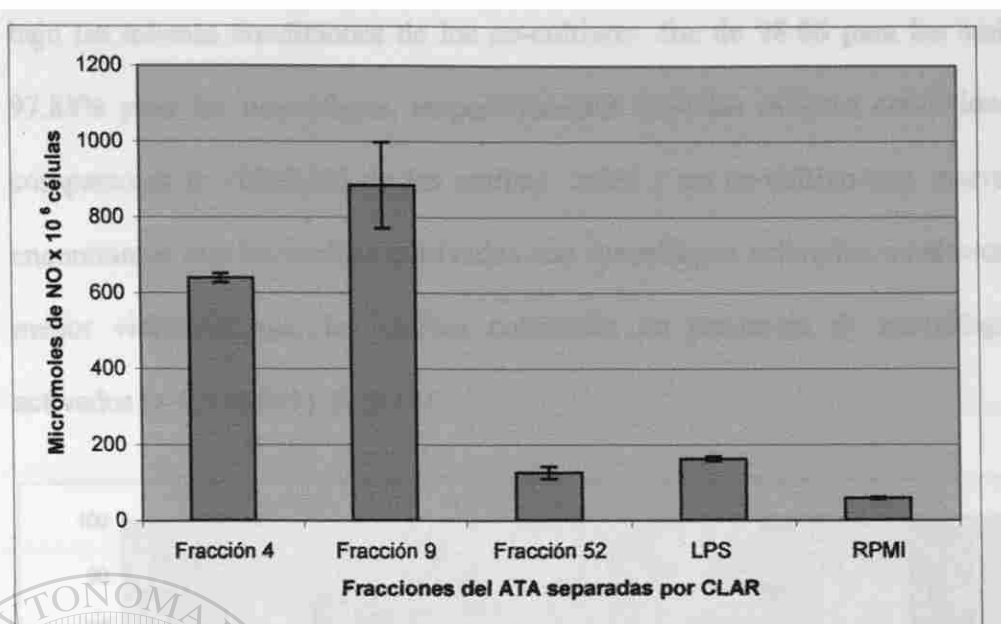
#### 3.6.1 Inducción de producción de NO por las fracciones de ATA.

Se le probó la capacidad de cada una de las 53 fracciones colectadas para estimular la producción de NO en cultivos de CMP. Encontramos que en todas las fracciones fueron capaces de estimular de la producción de NO; sin embargo, la mayor producción se indujo con las fracciones 4 y 9 las cuales fueron 73 y 68 veces superiores al testigo negativo con un valor de  $p < 0.001$  (Figura 11).



**Figura 11.- Inducción de la producción de NO por las fracciones del ATA separadas por CLAR.** Se indujo la producción de NO igual que en los ensayos anteriores, a cada grupo de tres pozos con excepción de los testigos se les agregaron 90 µl por pozo de cada fracción separada por HPLC más 10µl de LPS (10 mg/ml). La columna marcada con las siglas LPS representa los resultados de un testigo adicionado solamente con LPS. La columna identificada como RPMI se adicionó únicamente con este medio + 10% de suero fetal bovino. Cada barra representa el promedios + EE de la producción de NO estimulada por cada fracción, numerada según el orden recolecta, de 3 experimentos independientes por triplicado.

La Fig. 12 muestra que cuando se estandarizó la concentración de péptidos equivalente a 8.5 mg de proteínas/ml de las fracciones que mostraron mayor capacidad para inducir producción de NO y una fracción previamente identificada como irrelevante para este actividad se ratificó la observación del experimento anterior. Es decir, las fracciones 4 y 9 tienen la habilidad de inducir específicamente la producción de NO en macrófagos humanos. La producción de NO inducida por las fracciones 9 y 4 fué 15 y 11 veces mayor, respectivamente que la producción de NO que en los testigos no estimulados o tratados con una fracción irrelevante ( $p < 0.00001$ ).



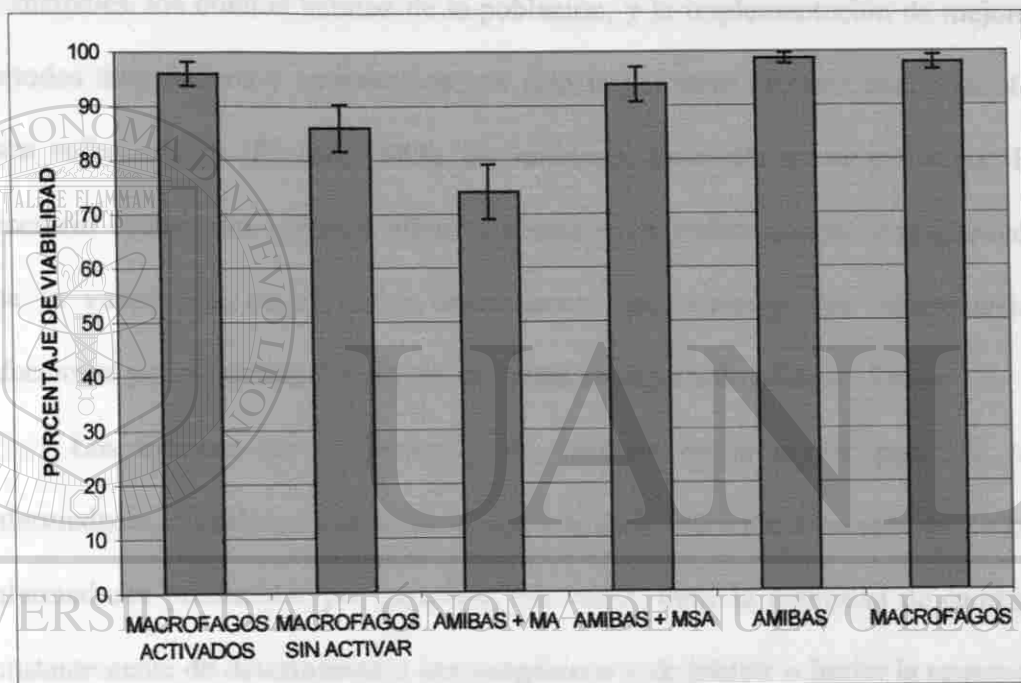
**Figura 12.- Inducción de producción de NO en fracciones de HPLC con concentraciones estandarizadas de antígeno.** El ensayo es igual al anterior, con la salvedad de que para realizar estos ensayos estandarizó a 8.5 mg/ml el contenido de péptidos en las fracciones (4 y 9) separados por HPLC que mostraron con mayor capacidad para inducir producción de NO. Las barras identificadas como fracción 52, LPS y RPMI corresponden a testigos negativos. La fracción 52 había sido identificada previamente como irrelevante en cuanto a su capacidad para inducir producción de NO, los cultivos correspondientes a las otras dos barras se adicionaron con LPS o con nada, expeetoel medio de cultivo más suero fetal bovino. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE de 3 experimentos por triplicado.

### 3.7 Citotoxicidad sobre amibas de CMP activadas con los péptidos

#### purificados por HPLC.

Cuando se co-incubaron amibas con macrófagos humanos activados con una mezcla a partes iguales (v/v) de las fracciones 4 y 9, los macrófagos destruyeron el 26% de trofozoítos virulentos (74% de viabilidad en las amibas). En cambio, las amibas incubadas en presencia de macrófagos no activados mostraron una viabilidad del 94% ( $p < 0.00001$ ). Por otro, la viabilidad en los macrófagos no activados incubados en presencia de trofozoítos fue 86%, en tanto que en los activados ésta fue del 96%. Es decir, las amibas destruyeron 11% más macrófagos no activados en comparación que los activados ( $p < 0.0001$ ). La viabilidad de las amibas y de los macrófagos activados y no activados, incubados por separado,

bajo las mismas condiciones de los co-cultivos fue de 98.66 para las amibas y 97.88% para los macrófagos, respectivamente bajo las mismas condiciones. Si comparamos la viabilidad de las amibas solas y en co-cultivo con macrófagos encontramos que las amibas cultivadas con macrófagos activados mostraron 1.27 menor viabilidad que las amibas cultivadas en presencia de macrófagos no activados ( $p < 0.00001$ ) (Fig 13).



**Figura13.- Actividad citotóxica de macrófagos activados con los péptidos bioactivos sobre trofozoítos.** Los cultivos de conteniendo CMP se dividieron en 2 grupos, a uno de los grupos denominado macrófagos activados (MA) se agregaron 80  $\mu$ l de una mezcla a partes iguales (V/V) de las fracciones-HPLC 4 y 9 (8.5 mg/ml) y 10  $\mu$ l de LPS (10 mg/ml). Al otro grupo llamado macrófagos sin activar (MSA) se agregaron 100  $\mu$ l de medio RPMI con 10% de SBF. Se incubaron igual que en el ensayo anterior y durante los mismos tiempos, posteriormente se formaron 4 grupos. En el primero se agregaron amibas virulentas, en crecimiento logarítmico en PBS estéril y densidad celular a  $1 \times 10^6$  amibas/ml 50  $\mu$ l a cada pozo con MA y en el segundo grupo a los pozos con MSA. A un tercer grupo llamado macrófagos; se agregaron 50  $\mu$ l de medio RPMI fresco a MSA y para integrar el cuarto grupo denominado amibas; se agregaron a pozos vacíos 200  $\mu$ l de medio RPMI mas 10% de SBF y luego  $1 \times 10^6$  amibas/ml 50  $\mu$ l a cada pozo. Se incubó a 37 °C por 30 min en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se determinó la viabilidad celular con azul de tripano. Las barras representan la viabilidad de amibas y macrófagos en co-cultivo y los testigos amibas o macrófagos solos según se indica. Cada una de ellas representa el promedio  $\pm$  EE de tres experimentos por triplicado.

## CAPITULO 4

### DISCUSION

#### 4.1 Discusion

Las enfermedades infecciosas y parasitarias son un importante problema de salud pública en todo el mundo, y predominantemente en los países en desarrollo (Walsh, 1988). El mejoramiento de las condiciones sanitarias municipales, los buenos hábitos de la población, y la implementación de mejores métodos diagnósticos y terapéuticos han sido importantes factores para controlar estas enfermedades (Bloom, 1989). Sin embargo, todo ello no es suficiente. Es necesario contar con vacunas eficaces contra estas enfermedades, considerando que la vacunación es el mejor instrumento para controlar las enfermedades infecciosas y parasitarias, sobre todo en países en desarrollo (Bloom, 1989).

Los avances en el desarrollo de vacunas en la mayor parte de las enfermedades infecciosas son escasos, aún más en lo referente a las vacunas contra enfermedades producidas por parásitos, los cuales tiene la habilidad de cambiar constantemente de determinantes inmunogénicos y de inhibir o burlar la respuesta inmune (Petri, 2000). La mayor parte de los parásitos tienen un ciclo de vida muy complejo, durante el cual éstos pasan por varios estadios y uno o más hospedadores (Stanley Jr., 1997), lo que dificulta aún más la identificación de antígenos que induzcan una respuesta inmune protectora eficaz. *E. histolytica* no es la excepción. Sin embargo, esta especie tiene uno de los ciclos de vida más simples, el cual consiste sólo de dos estadios, el de quiste (la forma infectiva) y el trofozoito (la forma trófica, responsable de la producción de lesiones en la amibiasis) y un solo hospedero, el hombre (Martínez-Palomo, 1982).

Es conocido que las personas que han desarrollado AHA, una vez curadas no vuelven a presentar estas lesiones (De León,1970; Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1982). En el desarrollo de la inmunidad protectora contra la amibiasis participan tanto la inmunidad celular como la humoral. Las personas con amibiasis invasora presentan anticuerpos específicos contra *E. histolytica* una semana después de haber presentado los síntomas patognomónicos de esta enfermedad (Krupp, 1970). Los anticuerpos anti-*E. histolytica* son capaces de inhibir el desarrollo de AHA en hámsteres o ratones inmunodeficientes inoculados experimentalmente con trofozoítos de *E. histolytica* (Sepúlveda,1974; Seydel, 1996). Los anticuerpos *IgA* contra *E. histolytica* secretados en la mucosa intestinal protegen contra la colonización de *E. histolytica* a niños, cuya producción se induce como consecuencia de una infección por esta especie de parásitos (Haque, 2001). Por otro lado, la inmunidad celular también juega un papel importante en la protección contra la amibiasis invasora. Algunos antígenos de *E. histolytica* son

---

capaces de inducir proliferación de linfocitos T de sangre periférica humana.

Además pueden activar a macrófagos humanos los cuales, a su vez son capaces de lisar trofozoítos *in vitro* (Salata, 1982;1986;1987). En hamsters la actividad amebicida de los macrófagos activados es dependiente de TNF- $\alpha$  y de INF- $\gamma$ . La principal molécula efectora es el NO y ésta, a su vez, es producida por la sintasa inducible de NO (iNOS), la cual puede ser bloqueada por análogos del sustrato (Lin, 1992; 1994; Seguin, 1997).

El objetivo principal de nuestro estudio fue aislar algunos antígenos capaces de inducir la producción de NO *in vitro* en un modelo donde utilizamos

macrófagos y linfocitos humanos en co-cultivo. Hasta donde nosotros sabemos, no se ha logrado estimular la producción de NO en macrófagos humanos por efecto de antígenos amibianos. En tanto que está bien documentada la producción de NO por macrófagos humanos inducida por otros antígenos (Bogdan, 2000; Weinberg, 1998; Kroncke 1998; Murray, 1992; Nozaki, 1997; Osborn, 2002).

La mayor parte de los trabajos que se han realizado con el objetivo de desarrollar una vacuna contra la amibiasis se han basado en la identificación y estudio de antígenos amibianos de superficie (Zhang, 1994; Stanley Jr, 1990; Petri, 1996; Tachibana, 1990), preferentemente lectinas, por ser éstas las directamente involucradas en la unión de las amibas con las células blanco (Li, 1988; Stanley Jr, 1990). Con estos antígenos se a buscado preferentemente la inducción de inmunidad humoral, que proteja a animales de laboratorio (preferentemente ratones no inmunocompetentes, hámsters y cobayos) contra la formación de AHA. Sin embargo, el trabajar con una sola molécula podría ser una empresa riesgosa,

considerando que las amibas, como casi todos los agentes infecciosos y parasitarios tienen una gran capacidad para cambiar sus determinantes antigénicos, y una vacuna basada en una sola molécula podría producir resultados inconsistentes, o, en el mejor de los casos variar su eficacia de una región geográfica a otra, como sucedió con la vacuna contra la malaria (Mora, 1993). Por otro lado, en el caso específico de la amibiasis, la respuesta celular parece tener una importancia especial en el desarrollo de la inmunidad protectora. Especialmente la producción de NO por macrófagos activados por lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS). En apoyo de esta aseveración, González-Garza y Cols. (2000) encontraron que cuando se inyecta un inhibidor de

la activación de macrófagos (MAIF, por sus siglas en Inglés, *Macrophage-Activation Inhibition Factor*) producido por células de la línea de linfoma murino LS178Y a ratones Balb/c los cuales son naturalmente resistentes a la infección por *E. histolytica* (Ghadirian,1984), y luego se inocula a estos ratones vía intrahepática, el 100% de los animales desarrolla AHA, en tanto que no lo hacen los ratones que no reciben el MAIF. La inhibición de la activación de macrófagos se determina precisamente por la inhibición de la producción de NO (González-Garza, 2000). Por otro lado, no necesariamente los epitopos reconocidos por los macrófagos de animales de laboratorio son los mismos que los reconocidos por los macrófagos humanos (Janeway y Travers, 1997). Por todo lo anterior, nosotros decidimos para este estudio no pre-seleccionar ninguna molécula amibiana, sino identificar todos aquellos amibianos, sin tomar en cuenta su función biológica o su ubicación en la superficie celular de las amibas, sino identificar a aquellos antígenos de trofozoítos de *E. histolytica* que fueron capaces de inducir *in vitro* la producción de NO en cultivos de células mononucleares periféricas humanas, las cuales contienen un porcentaje de macrófagos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> (Janeway y Travers, 1997). Este sistema de células es capaz de ser activado por antígenos amibianos e inducir la producción de NO por los macrófagos activados presentes en los co-cultivos celulares.

Considerando que las proteasas endógenas son capaces de degradar los antígenos amibianos, tratamos a los trofozoítos con una mezcla de cloroformo/metanol para inactivar a éstas enzimas (Said-Fernández y López-Revilla, 1979, Said-Fernández et al., 1996; Taméz-Treviño E. Y cols., 2000).



Como esperábamos, las preparaciones tratadas con cloroformo-metanol formaron grumos al evaporar los disolventes orgánicos y resuspenderlos con ayuda de sonicación. (ATA particulado). Utilizamos ATA particulado porque se ha reportado que los antígenos particulados inducen una mejor respuesta celular (Janeway y Travers, 1997), pero también decidimos disolver completamente la preparación y realizar los ensayos correspondientes.

En este trabajo observamos que el ATA particulado es capaz de inducir la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica con dosis de ATA soluble equivalente 40 mg de proteínas totales/ml (Figs. 2-4). Otros autores habían reportado sus resultados con 100 mg de antígeno amibiano/ml. Nosotros no probamos concentraciones superiores pues obtuvimos buena respuesta con esta concentración además de que sólo queríamos utilizar la inducción de proliferación como una prueba de tamiz.

La incorporación de [ $^3$ H]-TdR fue 1.5 veces mayor en los cultivos de CMP incubadas en presencia de antígeno ATA particulado que en presencia de ATA soluble (datos no mostrados), y casi el doble de la respuesta obtenida en las células sin ningún estímulo.

Otros grupo de investigadores también encontró que una preparación de antígeno amibiano soluble denominado SPP también indujo mitosis en linfocitos humanos obtenidos de pacientes convalecientes de AHA (Salata, 1986). En el curso de un año, la mitosis inducida por el SPP disminuyó paulatinamente, pero siempre fue superior a la de los testigos sanos. En dicho estudio la incorporación de [ $^3$ H]-TdR no fue tan eficiente como en el caso de nuestras preparaciones de ATA ni la inducida por fitohemaglutinina. Ganguly y cols. (1981) observaron que

la respuesta mitogénica de linfocitos de sangre periférica de pacientes con amibiasis estaba disminuida durante la primera semana de convalecencia luego aumentaba y finalmente tendía a disminuir, tres semanas después de iniciada la enfermedad.

En otro estudio realizado con pacientes convalecientes de AHA y controles sanos se analizó la respuesta mitogénica de linfocitos humanos a antígeno amibiano sometido a varios ciclos de congelación/descongelación y sonicación: No se observaron diferencias entre la mitosis inducida en linfocitos de individuos sanos en presencia o ausencia de antígeno amibiano (Sabanat, 1973). Además, la respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina fue superior a la inducida por el antígeno amibiano.

Es importante comentar con respecto al presente estudio, que la persona de la que se obtuvieron las células mononucleares periféricas para realizar los ensayos de mitosis nunca había padecido de AHA, pero sí colitis amibiana. En este

---

caso sus linfocitos presentaron una respuesta mitótica a nuestra preparación de antígeno similar a la producida por la fitohemaglutinina, cosa que no sucedió en los estudios arriba comentados; lo cual sugiere fuertemente que la respuesta mitogénica *in vitro* de las CMP depende en gran medida de la calidad del antígeno, además del posible efecto inhibitorio producido por *E. histolytica* en los pacientes con AHA, arriba mencionado. Nosotros pensamos que obtuvimos una mejor respuesta mitogénica al ATA particulado porque protegimos a éste de la auto-degradación, pre-tratándolo con cloroformo-metanol (Said-Fernández, 1996, Tamez-Treviño y cols., 2000). Este procedimiento es mucho más efectivo y seguro

que la utilización de inhibidores de proteasas, y no había propuesto previamente para realizar este tipo de ensayos.

Como parte de nuestra estrategia, utilizamos antígeno total de trofozoítos, a diferencia de otros grupos, que utilizan membranas plasmáticas aisladas (Sabanat, 1973 y Ganguly, 1981). Como antes comentamos, la ventaja de utilizar la totalidad de los antígenos amibianos es la de no descartar *a priori* antígenos capaces de inducir una respuesta protectora eficaz. Aunque era posible que en la mezcla de antígenos presentes en el ATA podría haber algunos que estimularan la respuesta inmune y que otros la inhibieran. Decidimos iniciar nuestro proyecto de investigación con antígeno total amibiano pensando que si no descubríamos una respuesta mitogénica HPLC podríamos fraccionar este antígeno y probar las fracciones por separado, pero esto no fue necesario.

Nos llamó particularmente la atención que el mejor tiempo de incubación, después de haber puesto en contacto a las CMP con el ATA y de agregar a las

---

mezclas de ensayo la [<sup>3</sup>H]-TdR (1 μCi/10 μl) fue de 12 h (Fig. 3), mientras que otros autores han encontrado que 18 h es el tiempo óptimo. Esto puede explicarse porque después de los 3 y medio días de cultivo y las células ya pasado por una expansión clonal y han entrado en apoptosis (Janeway y Travers, 1997).

Al igual otro estudio (Ganguly, 1981) donde se buscó proliferación de linfocitos de sangre periférica de pacientes convalecientes de AHA utilizando antígenos amibianos, nosotros encontramos una respuesta similar a la observada en los controles sanos, esta respuesta estaba inhibida durante la primera semana de la convalecencia luego aumentaba y finalmente tendía a disminuir a las tres

semanas después de la enfermedad. Como esperábamos la máxima respuesta mitogénica fue inducida por el ATA particulado ( Datos no mostrados). Sin embargo en estudios previos se ha utilizado antígeno soluble con buena respuesta (Salata, 1982).

El ATA soluble fue capaz de estimular la producción de NO en un cultivo de CMP humanas (Fig. 5-6). Probamos también el ATA particulado, pero los resultados preliminares fueron demasiado dispersos (datos no mostrados). Esto porque los ensayos realizados con ATA particulado eran demasiado turbios y el método de Greiss es colorimétrico. Entonces decidimos continuar el presente trabajo con ATA soluble.

Cuando iniciamos el presente proyecto algunos autores afirmaban que las CMP no eran capaces de producir *in vitro* este compuesto. Nuestros resultados muestran que si; y otros autores también lo han hecho, utilizando diversos estímulos (Bogdan, 2000, Weinberg, 1998 y Kroneske, 1998, Murray, 1992,

Nosaki, 1997). Entonces, ahora está muy HPLC o que los macrófagos humanos son capaces de producir NO *in vitro* cuando son estimuladas por un antígeno adecuado y en una forma adecuada. Por otro lado, en los trabajos referentes a la producción de NO que se han realizado previamente para identificar antígenos de amibas capaces de inducir una respuesta protectora se habían utilizando cultivos de macrófagos murinos (Denis y Chadee, 1989, Seguin, 1995 y 1997). Así por ejemplo, se había demostrado que la lectina de trofozoítos de *E. histolytica* que se une a galactosa (*gal-lectin*) es capaz de estimularla producción de NO en cultivos macrófagos derivados de médula ósea de ratón (Seguin, 1995; 1997).

La producción de NO es dependiente de citocinas, principalmente INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Seguín, 1997; Janeway y Travers, 1997). La producción de NO depende de la actividad de la enzima iNOS sintasa y que puede ser bloqueada por falta de sustrato (L-arginina) (Lin, 1992.) o por bloqueo de la actividad enzimática con inhibidores y/o análogos del sustrato (Lin, 1994). Nuestros resultados son acordes con estas afirmaciones, pero utilizando CMP humanas (Fig. 5-6), y también indican que la producción de NO por CMP humanas es dependiente del procesamiento y presentación del antígeno amibiano, pues la producción de NO pudo ser inhibida significativamente al detener el proceso de presentación del antígeno, incubando las células con ATA y después fijándolas con glutaraldehído 0.05% por diferentes tiempos: a mayor tiempo disponible para la presentación del antígeno (antes de ser fijadas con glutaraldehído), mayor producción de NO (Fig 9).

Estudios previos se han demostrado que la producción de NO por macrófagos murinos esta correlacionada con la actividad amebicida de los mismos (Denis y Chadee, 1989; Lin, 1994; Seguín, 1995; 1997). Por ello se considera que el NO es la principal molécula efectora que utilizan los macrófagos para matar a las amibas (Lin, 1992). Como antes comentamos, resultados previos de nuestro grupo apoyan este postulado, porque el MAIF, producido por células de linfoma murino de la línea L517810 es capaz de inhibir la producción *in vitro* de NO (González-Garza y cols., 2000), y de permitir el desarrollo de AHA en ratones Balb/c inoculados experimentalmente, a pesar de que estos animales son naturalmente resistentes a la infección por *E. histolytica* (Salata, 1982). En el

presente trabajo nosotros demostramos que los macrófagos humanos estimulados por las fracciones 4 y 9 del ATA soluble, digeridos con tripsina y separadas por HPLC, son capaces de producir NO (Figs. 11-12) . La fracción que indujo la mayor producción de NO en CMP humanas fue la fracción 9, y la concentración que indujo la mayor respuesta fue la equivalente a 8.5 mg de proteínas/ ml (Fig. 12), mientras que estudios previos han reportado inducción de la producción de NO utilizando concentraciones de antígenos diversos 1-50 mg/ ml.

En este trabajo observamos que el ATA tiene la propiedad de co-estimular la producción de NO en CMP inducidas por LPS y/o interferón- $\gamma$  (Fig. 7-8) . Lo que nos indica una respuesta dependiente de la activación de linfocitos T. Además, demostramos que estos macrófagos activados con las fracciones 4 y 9 del antígeno amibiano soluble separadas por HPLC son capaces de matar al 37% de las amibas cuando se co-cultivan con trofozoítos de *E. histolytica* (Fig 13). Para obtener fracciones del antígeno amibiano total que fueron capaces de inducir la producción

de NO, digerimos el ATA soluble con tripsina, y ultrafiltramos la preparación con un corte de 5,000 kDa. Así, eliminamos las proteínas y otras moléculas de alto peso molecular y conservamos únicamente los péptidos más pequeños. Estos péptidos los separamos por HPLC, y obtuvimos cinco picos principales y otros 20 picos más pequeños (Fig 10). El método utilizado en la cromatografía fue de fase reversa, utilizando un gradiente de acetonitrilo y ácido trifluoroacético en una columna C18 (de 5  $\mu$ m de tamaño de poro y 3.7 mm de diámetro interno y 200 mm de largo). Estas columnas separan moléculas según su peso molecular y su carga eléctrica total. Esta estrategia es la que se utiliza regularmente para separar

péptidos pequeños por HPLC. Cuando analizamos la capacidad de inducir producción de NO de cada una de las fracciones separadas por HPLC encontramos la mayor actividad inductora en dos de las fracciones separadas la fracción 4 y la 9 y que corresponden a 2 de los picos que se observan en la separación por HPLC P1 y P3. Sin embargo en ese momento no podíamos saber si el resultado de esta producción mayor era por efecto de concentración, debido a que casualmente estas fracciones no sólo mostraron el mayor efecto, sino también la mayor concentración de péptidos en los picos de separación correspondientes en el HPLC [(mayor A<sub>220</sub>) (Fig. 10)]. Por ello estandarizamos las concentraciones de proteína en todas las fracciones separadas por HPLC y los resultados fueron similares a los iniciales. Es decir, las mismas dos fracciones la 4 y la 9 indujeron la mayor producción de NO (Fig 12). Rosanne Seguin y colaboradores, en 1997, así como Denis y Chadee en 1987, describieron la capacidad de los macrófagos activados con antígenos amibianos de matar a trofozoítos patógenos de *E. histolytica*.

Nosotros encontramos que las células mononucleares periféricas obtenidas de sangre fresca total de un voluntario sano son capaces de disminuir la viabilidad de trofozoítos patógenos de amibas cepa HM1-IMSS, cuando son previamente activadas. Es decir, que de el ATA es capaz de activar a las CMP para matar a las amibas, como se demuestra en la figura 13. Esta actividad citotóxica de las CMP es dependiente casi totalmente de la actividad de los macrófagos, pues en este ensayo trabajamos únicamente con las células adheridas a las paredes de los pozos, mientras de que los sobrenadantes se desecharon. Como los macrófagos son las únicas células adherentes de las CMP, deducimos que la capacidad citotóxica es dependiente de la actividad de estos.

## CAPITULO 5

### CONCLUSION

#### 5.1 CONCLUSIONES

- 1) El antígeno amibiano total ATA, presentado a las CMP en forma soluble o particulada, al cual se le eliminó la actividad de las proteasas endógenas mediante un tratamiento con cloroformo-metanol es capaz de inducir una respuesta inmune celular *in vitro*.
- 2) El ATA es capaz de inducir la proliferación de linfocitos en cultivos de CMP con una eficacia similar a la observada con la fitohemaglutinina y mayor que la lograda hasta ahora por otros grupos.
- 3) El ATA induce la producción de NO en cultivos de macrófagos obtenidos de sangre periférica humana.
- 4) La inducción de la activación de macrófagos en cultivos de CMP, con producción de NO se incrementa por co-estimulación con interferón gama o LPS, lo cual indica que es una actividad dependiente de la activación de linfocitos T.
- 4) La inducción de la activación de macrófagos con producción de NO es dependiente de la presentación del antígeno.
- 5) Demostramos que es posible separar fracciones del antígeno total mediante HPLC.
- 6) Las fracciones del ATA digeridas con tripsina y separadas por HPLC son capaces de inducir la producción de NO, en presencia de LPS en los cultivos de macrófagos ya mencionados, con una eficacia 2.4 Veces mayor que el ATA total.



7) La tripsina incubada sola y autodigerida exactamente igual que el ATA con tripsina no es capaz por si misma de inducir producción de NO en los cultivos de macrófagos humanos, bajo condiciones experimentales exactamente iguales a las que sometimos al ATA o sus fracciones, por lo que concluimos que el efecto inductor de activación de macrófagos humanos con producción de NO es un efecto específico de antígenos amibianos y no de fracciones producto de la autodigestión de la tripsina.

8) Los macrófagos humanos de cultivos de CMP, activados con las fracciones 4 y 9 separadas por HPLC. No sólo indujeron la producción de NO in vitro, sino que fueron capaces de estimular a los macrófagos activados para destruir trofozoítos, invirtiendo la secuencia normal de hechos en co-cultivos de amibas y macrófagos, en los que las amibas destruyen preferentemente a los macrófagos no activados.

9) Tomando en cuenta todo lo anterior concluimos sobre nuestro trabajo completo que nuestros resultados sostienen la hipótesis que planteamos en el proyecto que originó el presente trabajo.

## 5.2 PERSPECTIVAS

Haber encontrado dos fracciones peptídicas capaces de inducir la producción de NO en macrófagos humanos abre amplias perspectivas para identificar al menos 2 antígenos amibianos que fueron aislados e identificados mediante una cuidadosa preservación de la integridad física del ATA. Estos antígenos no fueron preseleccionados considerando las funciones biológicas ni la

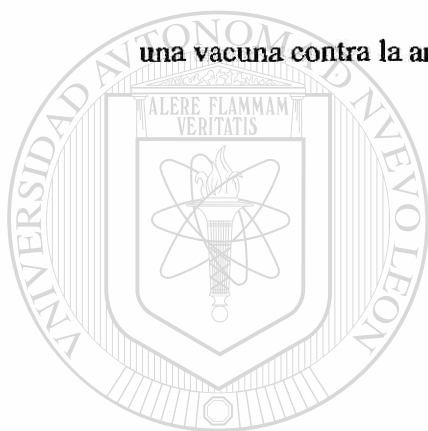
ubicación en el cuerpo celular de los trofozoitos de *E. histolytica*, sino que dejamos a la naturaleza que nos respondiera una pregunta que consideramos fundamental para el desarrollo de la vacuna contra la amibiasis, y que otros grupos no se habían planteado: ¿Que antígenos amibianos son capaces de inducir la activación de macrófagos humanos con producción de NO, y por lo tanto con verdaderas posibilidades de inducir una respuesta protectora contra la amibiasis en seres humanos?. Como respuesta a ello, nosotros localizamos 2 fracciones conteniendo péptidos de 10 kDa o menores capaces de inducir *in vitro* la activación de macrófagos en presencia de linfocitos de sangre periférica T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, pero aún no sabemos si su secuencia es homogénea. Es decir, si existen en estas fracciones varios péptidos con diferente secuencia, ni tampoco a que proteínas pertenecen éstos. Por lo tanto tampoco sabemos donde están ubicadas estas proteínas, ni cual es su función biológica. Sabemos, por otro lado, que estos péptidos deben ser presentados para activar la respuesta inmune celular, pero no

conocemos la secuencia de los epitopos presentados por los macrófagos, ni si la respuesta inductora de producción de NO es dependiente de la actividad de iNOS<sup>®</sup> sintasa y de la presencia de citocinas como interferón  $\gamma$  o TNF  $\alpha$ . Es necesario investigar si los péptidos obtenidos en este trabajo u otros, separados mediante la estrategia seguida aquí son capaces de inducir una respuesta humoral adecuada, dado que sabemos ahora que ambas respuestas, la celular y la humoral, son importantes para inducir una respuesta protectora adecuada. Entonces deberá investigarse si los péptidos inductores de una respuesta celular *in vitro* contra *E. histolytica* y los inductores de una respuesta celular adecuada (por ejemplo

3.- Aislamos e identificamos dos fracciones de antígenos de *Entamoeba histolytica* que son capaces de inducir la producción de NO en cultivos de macrófagos humanos.

4.- Confirmamos la capacidad de los macrófagos humanos de producir NO *in vitro*.

5.- A nuestro juicio, abrimos un nuevo camino, con enfoque y estrategias muy novedosos, y que parece ser muy promisorio, considerando los fundamentos teóricos de nuestra estrategia y los resultados aquí mostrados, para el desarrollo de una vacuna contra la amibiasis.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 6

### 6.1 BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray, D, Lewis J, Raff M, Roberts K, y Watson JD. Chaper 23. The immune system. En *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland Publishing Inc. New York. 1994. pp. 1195-1254.

Bloom BR. Vaccines of the third world. *Nature* 1989; 342:115.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A . Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000 Feb;12(1):64-76.

Bukrinsky MI, HSLM Nottet, Schmidtmayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE. Regulation of nitric oxide sintase activity in human immuno deficienty virus tipe 1 (HIV-1)- infected monocytes: Implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med*. 1995; 181: 735-745.

Capin R, González-Mendoza A, Ortiz-Ortiz L. Disminución de la actividad del sistema fagocítico mononuclear en hámsters infectados con *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest. Med*. 1980; 11 (Suppl 1): 235-240.

Carrero JC, Laclette JP. Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: A review. *Arch. Med. Res*. 1996; 27 (3): 403-412.

Cell biology. The cyst. En: *The biology of Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, New York (1982). Cap 2, pp. 56-59. Salata RA, Ravdin JI. Human cell-mediated immune mecanismos directed against *Entamoeba histolytica*.

Correa-Lemus I, Velásquez-Meza S, Ortiz-Ortiz L. *In situ* interaction of *Entamoeba histolytica* and antibodies. Arch. Invest. Méd. 1987; 18: 283-287.

Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff Jr CL. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. Science. 1994; 264: 716-719.

Cruz-Vega DE, Campos Góngora E, Said-Fernández S, González-Garza MT. Determination of the antiamebic effect of a metronidazole-gossypol blend. Arch Med Res 28:S300-S301,1997.

DeLeón A. Pronóstico tardío en el AHA. Arch. Invest. Med. 1970; (Suppl 1) 205-209.

Demotz S, Grey HM, Apella E, Sette A. Characterization of a naturally processed MHC class II- restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. Nature. 1989; 342: 682-864.

Denis M and Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for *in vitro* killing of *Entamoeba histolytica* trofozoites. Infec. Immun. 1989; 57: 1750-1756.

Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *E. histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica-like amebae*. J. Parasitol. 1968; 54: 1074-1079.

Falk K, Röttschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature. 1991; 351: 290-296.

Flores BM, Batzer MA, Stein MA, Petersen C, Diedrich DL, Torian BE. Structural analysis and demonstration of the 29 kDa antigen of pathogenic

*Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol-containing surface protein. *Mol Microbiol.* 1993 Mar;7(5):755-63.

Flores BM, Reed SL, Ravdin JI, Torian BE. Serologic reactivity to purified recombinant and native 29-kilodalton peripheral membrane protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 1993 Jun;31(6):1403-7.

Ganguly NK , Mjan RC, Gill NJ, Koshy A. Kinetics of lymphocyte subpopulations and their functions in cases of amoebic liver abscess. *Trans. of the Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1981; 75 (6): 807-810.

Ghadirian E, Kongshavn PA. Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite Immunol.* 1984 Jul;6(4):349-60.

Ghadirian E. and Meerovitch E. Effect of trichinella spiralis infection on the experimental liver abscess in hamsters. *Arch. Invest. Med.* 1980; (suppl 1): 185-189.

Ghadirian E. and Meerovitch E., Macrophage requirement for host defence against experimental hepatic amoebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 1982 Jul;4(4):219-25.

Ghadirian E. and Meerovitch. Effect of immunosuppression on the size and metastasis of amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasite Immunol.* 1981; 3: 329-338.

Ghadirian E. and Meerovitch. Effect of splenectomy on the size of amoebic liver abscesses and metastatic foci in hamsters. *Infect. Immun.* 1981; 31: 571-573.

Ghadirian E. and Meerovitch. In vitro amoebicidal activity of immune cells. *Infect Immun.* 1982 Apr;36(1):243-6.

Ghadirian E. and Meerovitch. Passive transfer of immunity against hepatic amoebiasis in the hamster by cells. *Parasite Immunol.* 1983 Jul;5(4):369-76.

Ghadirian E., Meerovitch E. and Kongshavn PAL. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect. Immun.* 1983; 42: 1017-1019.

Ghadirian E., Meerovitch E., Hartmann DP. Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some of its fractions. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 1980; 29:779-787.

Gold D., Norman L.G., Maddison S.E., Kagan I.G. Immunologic studies on hamsters infected with *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 1978; 64(5): 866-873.

Gonzalez-Garza MT, Palacios-Corona R, Ortiz-Navarrete V, Castro-Garza J, Said-Fernandez S. The macrophage-activation inhibitory factor (MAIF) from L5178Y murine lymphoma favors experimental amebic hepatic abscess development in Balb/c mice. *Arch Med Res.* 2000 Jul-Aug;31(4 Suppl):S104-5.

Gutiérrez G. Investigaciones Mexicanas sobre vacunas. Amibiasis. *Boletín mensual de Epidemiología.* 1987; 2 (11): 135-137.

Haq A, Sharma A, Ahmad S. Increased migration factor production in hamsters sensitized by amebic antigen and glucan. *Parasite Immun.* 1984; 6: 391-396.

Haque R., 2001, Ali IM., Sack RB., Farr BM., Ramakrishnan G and Petri WA Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis.* 2001 Jun 15; 183(12): 1787-1793.

Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport M. The induction, Measurement and Manipulation of the immune response. En Immunobiology: The immune system in health and disease. 3ª edición, Current Biology Limited, London, San Francisco and New York (1997).

Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. 1991; 353: 326-329.

Kettis AA, Sundqvist K-G. Activation of lymphocytes from healthy donors and patients with amebiasis by extracts of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Mex)*. 1982;13 Suppl 3:245-8.

Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*. 1998 Aug;113(2):147-56.

Krupp IM. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am J Trop. Med. Hyg*. 1970; 19: 57-61.

Lalvani A, Aidoo M, Allsopp CE, Plebanski M, Whittle HC, Hill AV. An

---

HLA-Based approach to the design of a CTL-inducing vaccine against *Plasmodium falciparum*. *Res Immunol*. 1994; 145: 461-468.

Lanzavecchia A. Identifying strategies for immune intervention. *Science* 1993; 260: 937-944.

Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. 1992 Jun 15;148(12):3999-4005.

Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. Transforming growth factor- $\beta_1$  primes macrophages for enhanced expression of the nitric oxide synthase gene for



nitric oxide-dependent cytotoxicity against *Entamoeba histolytica*.  
*Immunology* 1995; 85: 400-407.

Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect. and Immun.* 1994; 62 (5): 1534-1541.

Lushbaug WB, Kairalla AB, Hofbauer AF, Pittman FE. Sequential histopathology of cavitory liver abscess formation induced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* 1980; 11 ( Suppl 1): 163-

168.  
Marinets A, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Ute Vollman, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL, Jr. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1997; 186 (9):

1557-1565.

Martínez-Palomo, A. Cell biology. The cyst. En: *The biology of Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, New York (1982). Cap 2, pp. 56-59.

Momburg F, Ortiz-Navarrete V, Neefges J, Goulmy E, Van de Wal Y, Spits H, et al. Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are no essential for antigen presentation. *Nature.* 1992; 360: 174-177.

Mora AL, Patarroyo AG, Rojas CL, Rojas M. et al. Vaccination with Spf66, a chemically synthesized vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet* 1993; 341: 705.

Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis.* 1992 Mar;165(3):513-7.

Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun.* 1997 Sep;65(9):3644-7.

Ortiz Ortiz L., Zamacona G., Sepúlveda B., and Capin NR. Cell-mediated immunity in patients with amebic liver abscess of the liver. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1975; 4: 127-133.

Ortiz V, Isibasi A, García-Ortigoza E, Kumate J. Immunoblot detection of class specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with Typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 1640-1645.

Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril.* 2002 Jan;77(1):46-51.

Pennline KJ : Adherence to plastic or glass surfaces. In: Manual of macrophage methodology: Collection, characterization and function. Bellanti JA Ghaffar A (eds). New York, Marcel Dekker, pp63-69,1981.

Petri Jr WA and Ravidin JL., Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica* *Infect Immun.* 1991; 59: 97-101.

Petri Jr WA., Haque R, Lyerly D, Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today.* 2000 Aug;16(8):320-1.

Petri WA Jr., Chapman MD., Snodgrass T., Mann BJ., Broman J. and Ravdin JI., Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 1989 Feb 15;264(5):3007-12.

Petri WA, Jr. Recent advances in Amebiasis. Crit. Rev. in Clin. Lab. Sci. 1996; 33 (1): 1-37.

Rabinobitch NR, McInnes P, Klein DL, Hall BF. Vaccine technologies view to the future. Science; 1994; 265: 1401-1404.

Ravdin JI, Shain DC, Kelsall BL. Antigenicity, immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose specific adherence protein of *Entamoeba histolytica*. Vaccine 1993; 11; 241.

Reed SL., Flores BM., Batzer MA., Stein MA., Stroehel VL., Carlton JE., Diedrich DL. And Torian BE. Molecular and cellular characterization of the 29- kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*:

differentiation between pathogenic and not pathogenic isolates. Infect Immun. 1992; 57: 2179-2186.

Sabanat T, Viriyanond P, Nimitmongkol N. Blast transformation of lymphocytes in amebiasis. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 1973; 22 (6): 705-710.

Said-Fernandez S and Lopez-Revilla R. Characteristic Protein electrophoretic patterns of four *Entamoeba* strains. Parasitenkunde 1979; 56: 219-225.

Sifuentes-Rincon AM, Revol-de Mendoza A, Arguello-Garcia G, Ortega-Pierres MG, Flores-Castaneda MS. Molecular diagnosis of infectious and parasitic Said-Fernandez S, Leal-Garza CH, Cortes-Gutierrez EI, Barrera-Saldana HA, diseases. Gac Med Mex. 1996 May-Jun;132(3):295-318.

Said-Fernández S, Martínez-Rodríguez H, Sánchez Gillén Ma. Del Carmen. El desarrollo de la biotecnología biomédica en parasitología. Diagnóstico molecular, vacunas de nueva generación y perspectivas. Gac. Méd. Mex. 1997; 131 (4): 423-433.

Said-Fernandez S, Mata-Cardenas BD. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in suspension. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 Mar-Apr;86(2):173-4.

Said-Fernandez S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cardenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988; 82: 249-255.

Salata RA, Martínez-Palomo A, Murray HW, Conales L, Treviño N, Segovia E, Murphy CF, Ravdin JI. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective in vitro against *Entamoeba histolytica*. J. of Immunol. 1986; 136 (7): 2633-2639.

Segovia E, Capin R, Landa L. Transformación blastoide de linfocitos estimulados con antígeno lisosomal en pacientes con amibiasis intestinal.

Arch. Invest. Med. 1980; 11 (supl 1): 225-228.

Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee C. The Galactose adherence lectin of *Entamoeba histolytica* activates primed macrophages for amebicidal activity mediated by Nitric oxide. Arch. Med. Res. 1997; 28 (Suppl.): pp S228-S229.

Seguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor

necrosis factor- $\alpha$  production by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 12175-12179.

Sepúlveda B y Martínez-Palomo A., Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica* (1982) p: 170-191 In S. Cohen and KS Warren (ed.), Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

Sepulveda B, Tanimoto-Weki M, Calderon P, de la Torre M. Neutralization of the virulence of *E. histolytica* cultures with immune serums. Arch Invest Med (Mex). 1974;5 Suppl 2:447-50.

Sher A, Ahmad S, Muller-Berat CN. Cell mediated immune responses in experimental amebiasis. Arch. Invest. Méd. 1980; 11: 201-213.

Shibayama M, Campos-Rodríguez R, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. Morphological analysis of amebic liver abscess produced by intraperitoneal inoculation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in Hamsters.

Arch. Med. Res. 1997; 28 (Suppl): S207-S210.

Soong CJ, Torian BE, Abd-Alla MD, Jackson TF, Gatharim V, Ravdin JL.®

Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. Infect Immun. 1995 Feb;63(2):472-7.

Stanley Jr. SL., Jackson TFHG., Reed SI., Calderon J., Kunz-Jenkins C., Gathiram V., Li E., Serodiagnostics of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein JAMA 1991; 266: 1984-1986.

Stanley Jr. SL., Becker A., Kunz-Jenkins C., Foster L., Li E. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 4976-4980.

Stern JJ, Graybill JR, Drutz DJ. Murine amebiasis: the role of the macrophage in host defense. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33 (3): 372-380.

Talamás-Rohana P, Schlie-Guzmán MA, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL. T-cell suppression and selective *in vivo* activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. Infect. Immun. 1995; 63: 3953-3958.

Tamez-Trevino E, Sepulveda-Saavedra J, Tijerina-Menchaca R, Flores-Castaneda MS. Systemic antiamebic antibodies induced orally in mice: detection by an ELISA test using preserved *Entamoeba histolytica*-antigens without enzymatic inhibitors. Arch Med Res. 2000 Jul-Aug;31(4 Suppl):S28-9.

Vouldokis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P,

Moncada S, Mossalayi D. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcγRIII/CD23 surface antigen. Proc. Nat. Acad. Sci. 1995; 92: 7804-7808.

Walsh, J. A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection in Amebiasis. Ravdin JI (ed) New York: John Wiley & Sons. 93-105.

Wang W, Keller K, Chadee K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. Infect. Immun. 1992; 60: 3169-3174.

Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med.* 1998 Sep;4(9):557-91.

WHO News and activities. *Bulletin of the World Health Organization.* 1997; 75 (3): 291-292.

Wijesundera MdeS. Hepatic amoebiasis in immunodepressed mice. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 1980; 74 (2): 216-220.

Young-Myeong K, Son K. A nitric oxide production bioassay for interferon  $\gamma$ . *J. Immunol Meth.* 1996; 198: 203-209.

Zhang T. and Stanley Jr. SL . Progress in an oral vaccine for Amebiasis. Expresión of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2  $\chi$ 4297 ( $\sigma$  *cya*,  $\sigma$  *crp*,  $\sigma$  *asd*): safety and immunogenicity in mice. *Arch. Med. Res.* 1997; 28 (Suppl) pp. S269-271.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## V. Diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas

Salvador Saíd-Fernández,\* Francisco González-Salazar\* Herminia G. Martínez-Rodríguez\*\*

### Resumen

Las vacunas son la forma más efectiva y económica de prevenir y controlar enfermedades infecciosas y parasitarias. A pesar del gran desarrollo que este tipo de biológicos ha experimentado en los últimos años, todavía hay enfermedades producidas por virus, como el SIDA y por protozoarios, como la amibiasis y la tripanosomiasis, que no han podido ser controladas mediante vacunas eficaces y seguras. La vacuna contra la malaria es una de las que mayor éxito ha tenido. Pero todas éstas aún están en pleno desarrollo. Existen numerosos factores que se oponen al éxito de las vacunas antes mencionadas. Algunos de ellos son el riesgo que se corre al utilizar virus vivos o DNA, en el caso del SIDA o de la capacidad que tienen los protozoarios para evadir, deprimir o inactivar la respuesta inmune protectora del huésped. Una vacuna efectiva debe inducir tanto la respuesta humoral como la respuesta celular del sistema inmune y considerar el ciclo biológico del agente causal. Se discuten aquí diversas y novedosas estrategias para desarrollar vacunas tanto contra SIDA como contra la amibiasis.

### Summary

Vaccines are the most effective and reliable way to prevent and control infectious and parasitic diseases. In spite of the great development that this kind of biological products has reached over the past years, certain viral diseases, like AIDS and most of those produced by parasitic protozoa, like amebiasis and trypanosomiasis, still have not been controlled by means of safe and effective vaccines. Vaccine against malaria is one that has shown greater success. Accordingly, all are still being developed. Numerous factors oppose success. For example, one is the risk that includes the use of live viruses or their DNA, in the case of HIV or the ability that some protozoa have to depress, evade, or inactivate the protective immune response. An effective vaccine must induce both the humoral and the cellular branches of the immune system, and in addition to considering the entire biological cycle of the causative agent. In this contribution, several novel strategies to develop vaccines against amebiasis and AIDS are discussed.

**Palabras clave:** Vacunas, infecciones, protozoarios.

**Key words:** Vaccines, parasitic diseases.

### Introducción

Una vacuna puede salvar más vidas y más dinero que cualquier otra intervención médica.<sup>1</sup>

Hasta hace relativamente poco tiempo el concepto de vacuna se aplicaba exclusivamente a la prevención de enfermedades infecciosas y fue hasta hace poco más de 30 años que empezaron a aparecer resultados prometedores sobre el desarrollo de vacunas dirigidas contra enfermedades

causadas por parásitos, las cuales están aún en pleno desarrollo.

De acuerdo con Adrian J. Ivinson<sup>1</sup> existen tres conceptos sobre las vacunas modernas que deben considerarse con especial atención para lograr los efectos benéficos deseados: (a) aspectos biológicos, (b) su costo/beneficio y (c) la cooperación internacional para aplicarlas en la mayor cantidad posible de personas en las áreas del mundo donde se les requiere.

\* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano de Seguro Social, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Col. Independencia, Monterrey, NL, C.P. 64720, México

\*\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Eduardo Aguirre Pequeño y Ave. Madero Colonia Miras Cerro, Monterrey, Nuevo León.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Saíd-Fernández, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Ave. 2 de Abril y San Luis Potosí, Col. Independencia, Apdo. Postal 020E 64720, Tel y Fax (0181) 90-40 35 E-mail: salvadorsaid@netscape.com



Nosotros dedicaremos esta contribución a un tema relacionado con las características biológicas de las vacunas: su diseño, desarrollo y resultados, sin pretender que ésta sea una revisión exhaustiva. Nuestro objetivo es sólo presentar algunos ejemplos sobre las estrategias más sobresalientes que se están abordando para desarrollar vacunas contra dos enfermedades importantes por su incidencia y mortalidad y que por las características biológicas de sus agentes causales ha sido extraordinariamente difícil desarrollar productos que protejan en forma segura, efectiva y duradera. Estas dos enfermedades son el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), uno de los retrovirus más complejos conocidos hasta ahora; y la Amibiasis, cuyo agente causal es el protozooario *Entamoeba histolytica*. El desarrollo de las vacunas contra el SIDA y enfermedades causadas por protozoarios está planteando a los investigadores difíciles y variados problemas, que como veremos aquí, han requerido de la mayor creatividad e ingenio y dedicación por parte de los investigadores, quienes han puesto a prueba los enfoques y tecnología más modernos y variados.

### Vacunas contra el SIDA

#### Importancia epidemiológica del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

El SIDA es una enfermedad extendida en todo el mundo y sus tasas de incidencia y mortalidad van en aumento. Durante 1997 se infectaron en el mundo 5.8 millones de personas con el virus del SIDA (VIH). Se estima que a principios de 1998 había en el mundo 30.6 millones de personas VIH-positivas. Más de 40% de estas personas eran mujeres y la mitad de ellas tenía una edad de 15 a 24 años.<sup>2</sup>

#### Características generales del VIH

El VIH es un retrovirus. Su genoma está constituido por RNA, el cual se replica por medio de un DNA intermediano de doble cadena, dentro de la célula blanco. El virus está envuelto por una cubierta por la membrana plasmática de la célula blanco

que contiene glicoproteínas de cubierta (Gp 160 y Gp41), codificadas por el propio virus y que le sirven como medios de reconocimiento y anclaje a receptores específicos, en primera instancia a los macrófagos circulantes y después a los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Gp 41 es responsable de la fusión de la membrana del virus con la de la célula blanco.<sup>3</sup> Dentro de la cubierta se encuentra el genoma con un tamaño de 9.2-kbp y la transcriptasa reversa, encargada de sintetizar la doble cadena de DNA, usando como template el genoma original del virus, inmediatamente después de la infección.<sup>3</sup> Desde el punto de vista inmunológico, el producto génico más importante es el de *env*, que codifica para las proteínas de cubierta Gp 120 y Gp 41.

#### Ciclo biológico de VIH-1

El virión VIH-1 rodeado de la glicoproteína de cubierta Gp 120 se une a dos co-receptores de superficie de los macrófagos circulantes: CD4 y CCR5.<sup>4</sup> Las membranas celulares se fusionan, y el virus entra a la célula. Entonces se liberan el genoma y la transcriptasa reversa virales. La transcriptasa reversa sintetiza una copia de DNA de doble cadena, la cual entra al núcleo y se integra al DNA celular. En este estado el VIH se llama provirus. Después se sintetizan y ensamblan las proteínas de VIH dentro de las células infectadas y el virus adquiere una cubierta lipídica, la cual contiene numerosas copias de Gp120 y Gp41 y abandona la célula mediante un proceso de gemación.<sup>5</sup>

#### Vacunas contra el VIH<sup>6</sup>

El diseño de una vacuna capaz de proteger contra el SIDA sigue siendo un reto tan grande como cuando el virus estaba recién descubierto. Algunas de las razones más sobresalientes son las siguientes:

- (a) La respuesta inmune natural no destruye al VIH y se forman reservorios de éste, principalmente en el cerebro, en células de la microglia.
- (b) Ha sido necesario evitar el uso de virus completos vivos, atenuados o muertos, porque éstos representan un peligro potencial para las personas.

La proteína de cubierta Gp 120 puede mutar con el tiempo y unirse tanto a los co-receptores CD4 y CCR5 como a los linfocitos portadores de CD4<sup>+</sup> (T CD4), y de un cofactor llamado CXCR4 como a los cofactores CD4 y CCR5 de los macrófagos, como ocurre en la fase inicial de la enfermedad. En la fase tardía del SIDA la mayor parte de los virus pueden cambiar su afinidad exclusivamente por los correceptores de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y convertirse en "T-trópicos". En este estado los virus destruyen a las células T infectadas, contribuyendo fuertemente al colapso del sistema inmune y al surgimiento de la fase clínica de la enfermedad<sup>4</sup>. Actualmente se conocen seis co-receptores más, además de CCR5 y CXCR4. En todos los casos el virus VIH se une a CD4 y a uno de los otros factores.<sup>2</sup>

#### *Vacunas para estimular la respuesta humoral*

Este tipo de vacunas ha probado su eficacia para combatir enfermedades como la poliomielitis, el sarampión y la influenza. En el caso del SIDA los diseños de vacunas más sobresalientes son los siguientes:

**Proteínas de cubierta (Env).** La mayor parte de este tipo de vacunas contienen proteínas de la cubierta viral o parte de éstas, porque siendo estas proteínas necesarias para la unión del virus con la célula blanco, al unirsele anticuerpos específicos neutralizan su función y el virus es incapaz de infectar. Estas vacunas, dirigidas contra Gp 160, o contra Gp 120 y Gp 41 (que se derivan de la primera) ya han sido probadas en voluntarios humanos y se ha observado que se generan anticuerpos capaces de neutralizar virus vivos, eliminando su habilidad para infectar macrófagos humanos *in vitro*. Sin embargo, estos anticuerpos sólo reconocen a las cepas de VIH que se usaron en las vacunas. Cuando se usaron cepas aisladas de pacientes estas vacunas fueron ineficaces. Entonces, las proteínas de cubierta puras parecen no ser los mejores candidatos para la vacuna.

#### *Virus completos*

Los virus completos inactivados, podrían presentar al sistema inmune una forma más natural de las proteínas de la cubierta, y por lo tanto estimular la

producción de anticuerpos más eficaces para neutralizar la capacidad de infectar del VIH. Sin embargo, este enfoque implica el peligro de inocular eventualmente virus activos o el material genético residual, que es potencialmente peligroso. Por lo tanto deberá tenerse un especial cuidado para inactivar a los virus; y por otro lado, un tratamiento demasiado estricto para inactivar a los virus podría hacer a la vacuna menos efectiva, porque podría desprender y eliminar a las proteínas de la cubierta. Este es un buen enfoque, aunque deberá resolverse el problema de la estabilidad de las proteínas de cubierta.

**Pseudoviriones.** Estas son estructuras artificiales parecidas a los virus. Son esteras lipídicas vacías que sólo portan a la Gp 160. Estas estructuras son muy seguras porque no tiene la capacidad de infectar ni de hacerse reproducir por las células blanco. Sin embargo no es fácil fabricar pseudoviriones estables, aunque hay muchas esperanzas para lograrlo en un corto plazo.

#### *Vacunas para estimular la respuesta celular*

Las células citotóxicas reconocen epitopos. Los cuales son fragmentos de los antígenos presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la superficie de las células infectadas. Estos epitopos, en el momento de ser presentados, están ensamblados en los antígenos HLA, clase I. En este caso, no sólo los antígenos de superficie, sino también las proteínas internas pueden ser procesadas y presentadas a los linfocitos citotóxicos. En el caso de la vacuna contra el SIDA se deben seleccionar células específicas que sinteticen y expongan uno o más de los epitopos provenientes de las proteínas cuya síntesis es dirigida por el virus. De esta forma se podría inducir al sistema inmune a montar una respuesta contra todas las células infectadas que presenten en su superficie dichos epitopos.

**Vacunas con vectores vivos.** Esta modalidad de vacunas aprovecha la capacidad de ciertos virus (no VIH) para invadir células. La estrategia consiste en insertar genes del virus del VIH en estos virus, que no son patógenos para el hombre, permitiendo que estos agentes liberen dentro de las células los genes que codifican para los antígenos inductores de la respuesta inmune

protectora. La célula entonces produce las proteínas virales, las reduce a epitopos y estos son presentados en su superficie para activar a los linfocitos T, los cuales se activarán y formarán células de memoria, los que estarán listos para combatir una infección por VIH. Uno de los virus más usados para esta estrategia es el virus de la viruela de los canarios, un virus relacionado con el virus de la viruela humana, el cual ha sido transformado con los genes del VIH que codifican para las proteínas de la cubierta y para proteínas internas, como Gag (la proteína del núcleo viral y la proteasa). Estas vacunas son seguras y despiertan una débil respuesta celular. La respuesta se ha mejorado haciendo producir a los virus vectores un mayor número de copias o una mayor variedad de proteínas del HIV dentro de las células infectadas por el virus vacunal.

**Péptidos.** Se ha intentado despertar la respuesta inmune celular inyectando péptidos, pero éstos pueden degradarse antes de llegar a su destino. La inducción de la respuesta inmune por este tipo de moléculas podría incrementarse usando mejores adyuvantes.

**DNA desnudo.** En primates y ratones la vacuna ha estimulado la respuesta de linfocitos T y en algunos experimentos ha protegido a los animales de la infección.

**Estrategias combinadas.** Las estrategias más efectivas son aquellas que estimulan tanto a la respuesta celular como a la humoral. Por ejemplo, un programa de vacunación de éstos podría iniciarse con un virus de la viruela de los canarios portando el gen que codifica para las proteínas de cubierta, para estimular la respuesta celular, y meses después el mismo paciente podría recibir la Gp120 pura, para estimular la respuesta humoral. Con la primera vacuna se prepara a las células para una infección y con la segunda se refuerza.

Ya se ha hecho las primeras pruebas en seres humanos con este enfoque, pero se usaron antígenos de virus preparados en el laboratorio y se obtuvo una respuesta débil.

#### VIH y VIS modificados mediante ingeniería génica

Muchos investigadores siguen pensando que el uso de virus del VIH vivo es la mejor forma de inducir una respuesta protectora. Para ello han estado

deletando sistemáticamente varios de los genes que este virus usa para replicarse. Un protocolo con médicos voluntarios se está llevando a cabo para probar esta vacuna.

Por otro lado se ha observado que el virus de la inmunodeficiencia de los primates, mal llamados simios (VIS) atenuados ha resultado seguro y demostrado su capacidad para inducir una respuesta protectora notablemente efectiva en estos animales. Sin embargo, en algunos casos estas vacunas han inducido síntomas de inmunodeficiencia, aún en animales no retados con el virus silvestre.

#### Vacunas contra amibiasis

La amibiasis es causada por *Entamoeba histolytica*. Se estima que afecta a 10% de la población mundial,<sup>7</sup> pero es muy probable que estas cifras tengan que reconsiderarse en un futuro cercano debido a que *E. Dispar* (una especie no patógena) también parasita al intestino humano, y hasta hace poco tiempo no se le distinguía de la primera.<sup>8</sup> Se estima que la amibiasis es causa 110 mil muertes al año.<sup>9</sup>

Las dos observaciones más generales acerca de que *E. histolytica* es capaz de despertar una respuesta inmune son: (a) que la frecuencia de reinfecciones por *E. histolytica* en pacientes recuperados de absceso hepático amibiano (AHA) es muy baja<sup>11</sup> y b) que los animales de laboratorio vacunados contra *E. histolytica* desarrollan una respuesta protectora contra abscesos hepáticos amibianos (AHA) o lesiones intestinales cuando se les inocula experimentalmente con amibas virulentas o disentería amibiana, lo cual discutiremos más adelante. Sin embargo el diseño de una vacuna confiable contra la amibiasis plantea una serie de dificultades, que deberán superarse para lograr el objetivo deseado.

Deben además tomarse en cuenta dos aspectos muy importantes de la biología de *E. histolytica*: su ciclo biológico y la capacidad que estos parásitos tienen para evadir la respuesta inmune.<sup>2</sup>

Es muy importante considerar el ciclo biológico completo del agente causal, como está sucediendo con el desarrollo de la vacuna contra la malaria<sup>11</sup> porque de esta manera se incrementa la posibilidad de identificar un mayor número de antígenos capa-



cas de despertar un respuesta inmune protectora y el número de oportunidades para interrumpir dicho ciclo. Los agentes causales de la malaria son varias especies de *Plasmodium*, cuyos ciclos biológicos<sup>12</sup> son mucho más complejos que el de *E. histolytica*. El ciclo biológico de *E. histolytica* consta solo de dos fases, una trófica, invasora y causante de la destrucción de tejidos (el trofozoito) y otra infectiva, el quiste. El trofozoito ha sido intensamente estudiado, pero la Biología Celular y Molecular de los quistes es prácticamente desconocida, fundamentalmente por la falta de un medio de enquistamiento masivo en condiciones axénicas para *E. histolytica*. Sin embargo se han hecho algunos avances en este sentido. En 1980 desarrollamos un medio eficiente, confiable y que además permite que las amibas inicien espontáneamente el enquistamiento en condiciones axénicas, pero con una pared débil.<sup>12</sup> Actualmente hemos desarrollado un nuevo medio donde las amibas forman una pared muy resistente, que contiene quitina y cuyas características morfológicas son prácticamente iguales a las de los quistes naturales. Pero en tanto no se obtenga un pleno éxito en los esfuerzos para producir quistes de *E. histolytica* *in vitro* todos los esfuerzos para desarrollar vacunas contra *E. histolytica* tendrán que seguirse concentrando en los antígenos de los trofozoitos.

Los trofozoitos de *E. histolytica* tienen un notable habilidad para evadir la respuesta inmune, inmovilizando,<sup>14</sup> degradando anticuerpos anti-antígenos de superficie de las amibas<sup>15</sup> y ejerciendo un efecto inmunosupresor. Esto último en los primeros estadios de la infección.<sup>9</sup> Por lo tanto, las vacunas que se desarrollen tendrán que considerar todas estas características de las amibas para lograr una respuesta inmune eficiente.

Las vacunas contra la amibiasis están en pleno desarrollo y todavía lejos de estar en condiciones de usarse masivamente en beneficio de la humanidad.

Considerando que tanto la respuesta humoral como la celular del sistema inmune son importantes, es posible que la vacuna más efectiva contra la amibiasis tenga también que estimular a ambas ramas del sistema inmune.

Algunos de los trabajos que en seguida citamos presentan sólo los resultados iniciales, que refuerzan la idea de que es posible obtener una respuesta humoral, tanto en la luz intestinal, como en el torrente circulatorio y también una respuesta celular protectora. Algunos otros presentan ya los re-

sultados alentadores con vacunas experimentales en animales. A continuación presentamos algunos ejemplos de todos estos enfoques.

### Inducción de la respuesta humoral utilizando trofozoitos completos usados como inmunógeno

#### *Trofozoitos completos*

Jain et al. Obtuvieron un cierto grado de protección en cobayos preinoculados con un número relativamente bajo de amibas vía intracecal y luego retados con un inóculo 80 a 100 veces mayor, también por vía intracecal o intramuscular.<sup>16</sup> Otros autores observaron incrementos significativos en los títulos circulantes<sup>17</sup> y coproanticuerpos<sup>18</sup> anti-*E. histolytica* después de inocular animales de laboratorio con trofozoitos fijados con glutaldehído. La respuesta inmune humoral se incrementa notablemente cuando se utiliza la toxina del cólera como adyuvante<sup>18</sup>

#### *Transferencia de pasiva de inmunidad mediada por células*

Las células peritoneales de hámsteres inoculados vía intradérmica con amibas vivas son capaces de proteger contra la infección experimental a hámsteres no inmunizados.<sup>19</sup>

#### *Protección con anticuerpos monoclonales*

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra un liposfingolipido de *E. histolytica* llamado EH5 fue capaz de proteger contra AHA a ratones inmunodeficientes.<sup>20</sup>

#### Antígenos recombinantes

##### *Uso de antígenos pro diseñados*

MBP/SRHEP-C1A2 (SRHEP-H) es un antígeno que contiene fragmentos de las siguientes 3 proteínas: SRHEP (*Serum rich Entamoeba histolytica protein*), MBP (*maltose binding protein*) y la

subunidad de la toxina del cólera  $CTA_2$ , conocida por su capacidad de incrementar la respuesta inmune hacia otros inmunógenos. Esta vacuna molecular indujo un incremento en la producción de IgA en mucosas y de IgG en suero cuando se administró por vía oral a ratones.

Vacunas anti *E. histolytica* construidas en vehículos moleculares vivos.

Antígenos recombinantes expresados en *Salmonella typhi* atenuada.

Se transformó con un plásmido portador de una secuencia de DNA que codifica para un segmento de GalNac a la cepa SL5928 de *Salmonella Dublin*. GalNac es una lectina localizada en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* que se inhibe en presencia de galactosa/N-acetylglucosamina. Esta lectina juega un papel fundamental en la lisis por contacto que producen las amibas sobre sus células blanco. Cuando se inoculó por vía oral a un grupo de gerbos con estas bacterias se consiguió una disminución hasta de 90% en el tamaño de los abscesos hepáticos en comparación con los testigos no inmunizados.<sup>22</sup>

Zhang T y Stanley Jr. inmunizaron ratones con salmonelas vacunales typhi ( $\Delta cya$ ,  $\Delta crp$ ,  $\Delta asd$ ), las cuales tenían inactivos los genes que codifican para la adenil ciclasa (*cya*) y el receptor del AMP cíclico (*crp*). Esta cepa fue modificada mediante ingeniería genética para que sintetice SREHP/MBP. Los anticuerpos IgG anti-SREHP se incrementaron 10 veces en suero con respecto a los testigos no inmunizados.<sup>23</sup>

#### Algunas contribuciones de nuestro grupo

Nosotros hemos dedicado nuestro principal esfuerzo a la identificación y purificación de factores de virulencia de *E. histolytica* y al enquistamiento de este protozooario en condiciones axénicas. Ya antes comentamos la importancia de un método para enquistar masivamente *E. histolytica in vitro*. Enseguida comentaremos algunos de los avances que hemos tenido para identificar, purificar y clonar estos factores, los cuales podrían servir para investigar si estas proteínas amibianas completas o algunos de sus epitopos son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en animales de laboratorio.

#### Hemolisinas

Se ha sugerido que la actividad citolítica de *E. histolytica* juega un papel determinante en la habilidad que estos parásitos tienen para destruir a las células blanco. Nosotros encontramos que la actividad hemolítica en extractos libres de células esta relacionada con la virulencia de las cepas<sup>24</sup> Se han identificado varios factores citolíticos de *E. histolytica*, entre ellos una actividad dependiente del potencial de óxido-reducción<sup>25</sup> y fosfolipasas  $A_2$ .<sup>26</sup> También encontramos fosfolipasas  $A_1$  y lisofosfolipasas en la misma fracción subcelular membranar de las amibas.<sup>27</sup> Las fosfolipasas  $A_1$  son también citolíticas en algunas especies de protozoarios parásitos y las lisofosfolipasas inhiben la autodestrucción de las células destruyendo a los liso-derivados que las fosfolipasas  $A_1$  y  $A_2$  producen continuamente. Por estas características pensamos que estas tres enzimas son buenos candidatos para producir vacunas, induciendo la producción de anticuerpos contra estos factores de virulencia para inactivarlos y eventualmente despertar una respuesta celular contra las amibas portadoras de estos antígenos. Con esta idea en mente hemos purificado la principal fosfolipasa  $A_2$  de *E. histolytica*, la cual es máxima a pH 8.4, y  $Ca^{2+}$  1 mM<sup>28</sup> y clonamos una secuencia de cDNA que codifica para una citolisina dependiente de actividad de fosfolipasa  $A_2$  (manuscrito en preparación). El siguiente paso será investigar si estas proteínas son capaces de inducir protección en animales de experimentación.

Por otro lado, investigaremos si los quistes que se forman espontáneamente en nuestro medio de cultivo (PEHPS) son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano en animales de experimentación.

#### Referencias

1. Ivison AJ. Wet vaccines? Nature Med 1998; 4(Suppl. 5): 474-476.
2. Special report -IV Dynamics. Sci Med 1998; 5(2): 36-45.
3. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Chapter 25. Marshaling Recombinant DNA to Fight AIDS. En: Recombinant DNA. Second edition. New York: Scientific American Books; 1998: 485-509.

4. O'Brien SJ, Dean M. In Search of AIDS-Resistance Genes. *Scientific Am* 1997;277(3):28-35.
5. Bartlett JG, Moore RD. Improving HIV Therapy. *Scientific Am* 1998;279(1):64-73.
6. Baltimore D, Heilman C. HIV vaccines: Prospects and Challenges. *Scientific Am* 1998;279(1):78-83.
7. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228-238.
8. Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of nonpathogenic amebae to the pathogenic form. *Exp Parasitol* 1993;77(4):456-460.
9. Ortiz-Ortiz L. 5. Amebiasis. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp145-162.
10. De León A. Pronóstico tardío para el absceso hepático amibiano. *Arch. De Invest. Med* 1970;1(Supl.):205-206.
11. Riley EM, Hviid L, Theander G. 4. Malaria. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp 119-143.
12. Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Navarro-Marmolejo L, Rodríguez-Pérez E. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol. Res.* 1993;79:200-203.
13. Campos-Góngora E, Viader-Salvado JM, Martínez-Rodríguez HG, Zúñiga-Charles MA, Mora-Galindo J, González-Salazar Fy Said-Fernández, S. Mg, Mn and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cysts-like structures resistant to sodium-dodecyl sulfate. *Arch. Med. Res.* 2000 En prensa
14. Calderón J, Muñoz M, Acosta HM. Surface redistribution and release of antibody induced caps in entamebae. *J Exptl Med* 1980;111:s241-s244.
15. Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL. The natural Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and presents its binding. *J Infect Dis* 1988;508-511.
16. Jain P, Sawhney S, Vinayak VK. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1980;74:347-349.
17. Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC, Enriquez-Rincón F. The use of ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered *Entamoeba histolytica* antigen in mice. *Arch. Med. Res.* 1994;25:183-187.
18. Navarro-García F, Pedroso M y López-Revilla R. Cholera Toxin increases Rat Serum and Mucosal antibody responses Against *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 1997;28: S225-S227.
19. Ghadirian E, Meerovitch E. Passive transfer of immunity against hepatic amebiasis in the hamsters by cells. *Parasite Immunol* 1983;5:369-376.
20. Marinets, A., Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B., Vollman U, Otto Scheiner, Wiedermann G., Stanley Jr. Land Duchene M. Protection against invasive amebiasis by single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exptl Med* 1997;186:1557-1565.
21. Sultan F, Jin L-L, Jobling MG, Holmes RK and Stanley Jr. SL. Mucosal Immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A<sub>2</sub> domain of cholera toxin. *Infect Immun* 1998;66:462-468.
22. Mann BJ, Burkholder BV, Lockhart AL. Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 1997;15:659-663.
23. Zhang T., Stanley Jr. SL. Progress in an oral vaccine for amebiasis. Expression of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 4297 (cya crp ansd): safety and immunogenicity in mice. *Arch Med Res* 1997;28:s269-s271.
24. López-Revilla R, Said-Fernández S. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: Hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:209-212.
25. Castro-Garza JE, Said-Fernández S. Immediate cell membrane damage produced by *Entamoeba histolytica* subcellular extracts. *Arch Med Res* 1992;23:191-192.
26. Said-Fernández S, López-Revilla R. Free Fatty Acid Released from Phospholipids are the major heat-Stable Hemolytic Factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immu.* 1988;56:874-879.
27. Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and Lysophospholipase L1 activities. *Parasitol Res* 1995;81:320-323.
28. Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodríguez A, Mata-Cárdenas BD, Martínez-Rodríguez HG, Said-Fernández S, Alagón-Cano A. Isolation of an *Entamoeba histolytica* Intracellular Alkaline Phospholipase A. *Parasitol. Res.* 1998;84:310-314



## *Entamoeba histolytica* Is Unable to Use Free Cholesterol, Phospholipids, and Fatty Acids Under Axenic Cultivation Conditions

Benito David Mata-Cárdenas,<sup>\*\*\*</sup> Javier Vargas-Villarreal,<sup>\*</sup> Francisco González-Salazar,<sup>\*\*\*</sup> Herminia Martínez-Rodríguez,<sup>\*\*\*</sup> Mario Morales-Vallarta<sup>\*\*\*\*</sup> and Salvador Said-Fernández<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

<sup>\*\*</sup>Unidad de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas.

<sup>\*\*\*</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

<sup>\*\*\*\*</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, Mexico

**Key Words:** *Entamoeba histolytica*, Lipid auxotrophy, Lipid metabolism, Serum replacement.

### Introduction

Diamond described, in 1978, a medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, called TYI-S-33 (1). Later, we developed another medium called PEHPS (2). The major constituents of these media are yeast extract, and liver and pancreas extract, respectively. Serum is an essential component of both. Preliminary data suggested that *E. histolytica* requires lipids to grow that are mainly supplied by serum. We recently described a protozoa axenic cultivation serum replacement (PACSR) (3) that contains Diamond's vitamin-Tween 80 mixture (1), amino acids, and a lipid-rich cholesterol preparation (LCR). This preparation contains lipoproteins, free cholesterol, phospholipids, and fatty acids (5). *E. histolytica* grew vigorously in PEHP or TYI basal media supplemented with PACSR for up to 3 years, but not in the presence of LCR, although these parasites survived for up to 72 h (3). This strongly suggests that *E. histolytica* requires an external source of lipids and/or lipoproteins, in addition to vitamins and amino acids. The objective of the present work was to determine whether *E. histolytica* is able to use free cholesterol, phospholipids, or fatty acids.

### Materials and Methods

*E. histolytica* strain HK9 strain was used in this study.

**Amebic cultures.** Glass screwcap tubes (13 × 100 mm) containing 5 mL TYI-S-33 (1), PEHPS (2), PEHP, or TYI

were supplemented with PACSR instead of bovine serum (4). Immediately afterward,  $10^4$  trophozoites/mL were inoculated and incubated for 72 h at 36°C. Subsequently, amebas were harvested and counted with an hemocytometer (2).

**Experimental media.** Tubes containing 5 mL PEHP were supplemented with Diamond's vitamin-Tween 80 mixture and Earle's amino acid solution (5) and 5  $\mu$ L of the following lipids (dissolved in absolute ethanol): cholesterol (100 mg/mL); oleic (17 mg/mL), linoleic (58 mg/mL), linolenic (17 mg/mL), arachidonic (17 mg/mL), or docosahexanoic (17 mg/mL) acids; phosphatidylcholine (67 mg/mL); lysophosphatidylcholine (10 mg/mL), and sphingomyelin (26 mg/mL). Groups of three tubes were formed, and each was mixed with one of the lipid blends described in Table 1 or was added separately. All tubes were inoculated with  $10^4$  trophozoites/mL, incubated, and counted. All analyses were performed three times, in triplicate.

### Results and Discussion

Trophozoites incubated in control media (containing 0.1% ethanol) grew well, reaching densities of  $24.3 \pm 3.7$  in PEHPS and of  $14.0 \pm 2.68$  in PEHP supplemented with PACSR. In the presence of any combination of free lipids, amebas died within 12 h of incubation. On the other hand, cultures maintained in media supplemented with 360  $\mu$ g lipoproteins (5) reached densities quantitatively comparable to controls grown in PEHPS plus 0.1% ethanol (data not shown).

In conclusion, *E. histolytica* HK9 strain is unable to use free cholesterol, phospholipids, or fatty acids under axenic conditions. Nevertheless, as amebas were able to grow in the presence of lipoproteins under similar experimental conditions, these parasitic protozoa possibly need an external source of

Address reprint requests to Benito David Mata-Cárdenas, Centro de Investigación Biomédica del Noreste (IMSS), División de Biología Celular y Molecular, Administración de Correos No. 4, 2-50, Postal 2, 2001 Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, México; Tel.: +52 (81) 190-4035; FAX: +52 (81) 190-4035; E-mail: bdmat@ciabimn01.ciabimn.mx

Presenting author: Benito David Mata-Cárdenas

resulting leaf cell suspension was filtered through gauzes of double thickness to remove residues. The cell suspension was washed three times with RPMI by centrifugation at  $440 \times g$  for 10 min. The pellet of leaf cells was suspended in a 20-fold volume of RPMI. Subsequently, the cells were disrupted by an ultrasonic processor (GE 50, Sonics and Materials, Inc.) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The extract was centrifuged at  $15,000 \times g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant fraction was sterilized by filtration (Millipore membrane filter; pore size, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Ferredoxin content was assayed by the method of Buchanan and Aron (5). Usually the sterilized fraction was added to YIGADHA-S at 0.3% (v/v) for cultivation of *E. dispar*. Further purification of ferredoxin was attempted by DEAE cellulose chromatography (5).

## Results and Discussion

As previously mentioned, one strain (CYNO 16:TPC) began to grow in YIGADHA-S without any culture associates (protozoan, mammalian, plant, or other micro-organism cells) after a 3-month culture with 10% formalin-fixed *C. fasciculata* and a subsequent 3-month culture with 6-phosphogluconate, which is an intermediate metabolite of the pentose phosphate cycle and Entner-Doudroff pathway. However, four other strains (SAW1734R clone AR, CYNO 09:TPC, AS21R, and AS161R) needed a culture supplement, such as metabolically inactive sterilized *C. fasciculata*, for *in vitro* growth.

Based on these data, we attempted to examine the growth-promoting effect of plant ferredoxin, as iron-sulfur redox proteins are present in mitochondria, chloroplasts, hydrogenosomes, and bacteria, although with differences in the chemical structure of the iron-sulfur centers. We found that the supernatant fraction isolated from the extract of spiderwort leaf cells allowed successful cultivation of all five *E. dispar* strains at a similar growth rate (Figure 1).

Determination of the ferredoxin content of the extract of spiderwort cells resulted in about  $0.27 \mu\text{mol/mL}$ , which is equivalent to  $3.2 \text{ ng/mL}$  if the molecular weight (MW) of spiderwort ferredoxin is assumed to be 12,000, similar to spinach ferredoxin. Though measurement of ferredoxin content of the supernatant fraction of the spiderwort extract was not possible by the method employed, it could be purified from this fraction by DEAE cellulose chromatography, which was confirmed by spectrophotometric analysis. Thus, there is little doubt that the supernatant fraction contained ferredoxin. Preliminary studies on ferredoxin further purified by column chromatography demonstrated that it significantly promoted growth of *E. dispar* (SAW1734R clone AR, and AS21R). To date (May, 2000), these five strains of *E. dispar* have been successfully subcultured for 9 months with the supernatant fraction of the spiderwort extract. Among these subcultures, one strain (CYNO 09:TPC) started to grow well in YIGADHA-S without supplement-

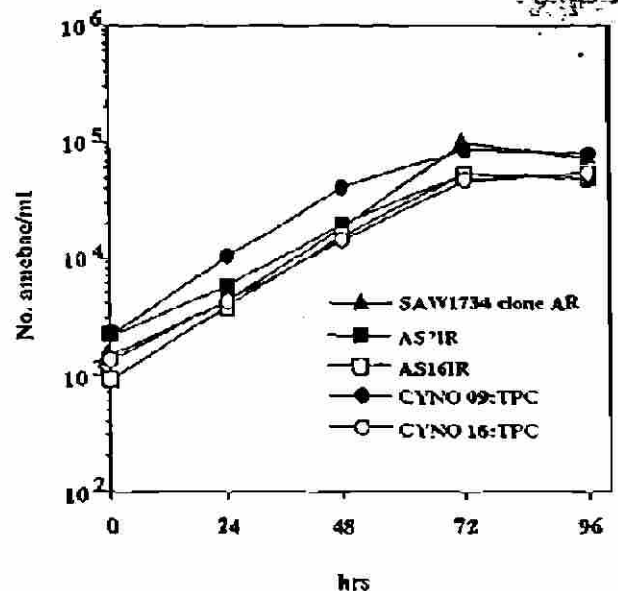


Figure 1. Growth kinetics of five strains of *E. dispar* supplemented with the supernatant fraction of leaf cell extract of spiderwort (*Commelina communis* L.) in YIGADHA-S.

ing the supernatant fraction, very similar to the axenic CYNO16:TPC strain.

Furthermore, the AS21R and AS161R strains are also being adapted to YIGADHA-S without adding the supernatant fraction. These results led us to envision that ferredoxin regulates one of the abilities of *E. dispar* for adaptation to the axenic culture conditions. Biochemical, molecular, and ultrastructural studies of these *E. dispar* strains are also being conducted.

## Acknowledgments

This work was supported by a Health Sciences Research grant-in-aid for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, and by a grant for promotion of AIDS Research from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

## References

1. Kobayashi S, Imai E, Fujiwara T, Takeuchi T. Axenic culture of *Entamoeba dispar* by using 6-phosphogluconate. IXth International Congress of Parasitology 1998;47:Proceedings of a Congress, Abstract 333.
2. Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. Y1-S, a casein-free medium, for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Gammatrypanium intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. J Eukaryot Microbiol 1993;42:277.
3. Clark CG. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925 (*Entamoeba histolytica* German and Wickerham 1937 and *E. tanimotoensis* Grassi 1879). J Eukaryot Microbiol 1995;42:590.
4. Kobayashi S, Imai E, Tachibana H, Fujiwara T, Takeuchi T. *Entamoeba dispar* cultivation with sterilized *Carthamus fasciculata*. J Parasitol Microbiol 1998;45(2):35.
5. Buchanan BB, Aron DI. Ferredoxins from photosynthetic bacteria, algae, and higher plants. Methods in enzymology; 1971; p. 413.



Table 1. Composition of media containing different combinations of free lipids<sup>a</sup>

Lipid blend	Lipids added to lipid test medium <sup>b</sup>								
	CHOL	PC	LPC	SM	LO	ARA	LNO	OL	DOCO
I	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II	+	+	+	+	+	+	+	+	+
III	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IV	+	+	+	+	+	-	+	+	+
V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
VI	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VII	+	+	-	+	+	+	+	+	+
VIII	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IX	-	+	+	+	+	+	+	+	+
X	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Culture tubes containing 5 mL PEHP or TYI basal media supplemented with amino acids and vitamins were added with 5 µL of each lipid solution, as this table indicates. (+) = added; (-) = nonadded. The free lipids tested in these experiments are components of a lipid cholesterol-rich commercial preparation (LCR) and of a protozoa axenic cultivation serum replacement (PACSR). Their final concentrations were the same in experimental and in control media (PEHP/PACSR or TYI/PACSR). <sup>b</sup> The lipid test medium was PEHP basal medium supplemented with Diamond's vitamin-Tween 80 mixture and Earle's amino acid solution.

Abbreviations correspond to the following lipids: CHOL = cholesterol; PC = phosphatidylcholine; LPC = lysophosphatidylcholine; SM = sphingomyelin; LO = linoleic acid; ARA = arachidonic acid; LNO = linolenic acid; OL = oleic acid, and DOCO = docosahexanoic acid.

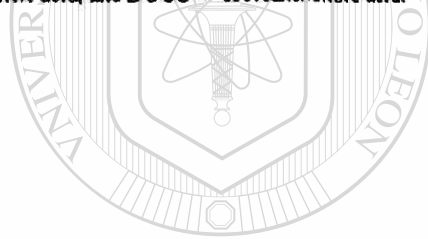
lipids structured as lipoproteins or integrated to cell membranes. These possibilities need to be further analyzed.

#### Acknowledgments

We thank Dr. A. Luna de la Rosa for the artwork and L. Navarro-Marmolejo, QFB, for her technical assistance. This study was partially supported by grant no. I-29997 N from Conacyt (Mexico).

#### References

1. Diamond LS, Harlow D, Cunick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:431.
2. Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez HG. PEHP5 medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:249.
3. Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta M, Vargas-Villarreal J, Said-Fernández S. PACSR: a serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:586.
4. Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta M, Vargas-Villarreal J, Said-Fernández S. Long-term subcultivation in axenic cultivation conditions of *Entamoeba histolytica* in a serum-free media. *Arch Med Res* 1997;28:S106.
5. Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez HG, Castro-Garza JE, González-Garza MT, Said-Fernández S. Auxotrophy to lipoproteins of *Entamoeba histolytica* cultivated under axenic conditions. *Parasitol Res* 2000 (In press).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## Pathogenesis of *Entamoeba histolytica* Depends on the Concerted Action of Numerous Virulence Factors

David Mirelman, Serge Ankri, Uriel Katz, Felipe Padilla-Vaca and Rivka Bracha

Department of Biological Chemistry, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

**Key Words:** *Entamoeba histolytica*, Virulence, Gal-lectin, Lipophosphoglycan, Antisense RNA, Transfection.

### Introduction

Human infection with *Entamoeba histolytica* can take two paths: it can either develop an invasive form of the disease, or the infected individual may remain asymptomatic. In the last two decades, a number of virulence factors were identified and characterized in *E. histolytica*. The interaction between the amebic trophozoite and the mammalian target cells can be separated into two main stages: (a) the specific recognition and attachment of the parasite to the mammalian cell, which is mediated by a number of surface adhesins, the main adhesin being the well-studied Gal/GalNAc-specific lectin, and (b) a number of effector molecules, such as the amebapore and the cysteine proteinases, which can cause damage to host cells. Despite the remarkable progress of recent years, it is still not clear whether all the virulence factors that participate in causing the disease in humans have been identified. Furthermore, we still do not understand, in molecular terms, the variations that exist between *E. histolytica* strains of low and high virulence and the modulation of the expression of certain virulence factors in the same strain by external factors such as nutrients, bacteria, and/or other host factors.

Our recent results obtained from investigating (a) the avirulent *E. histolytica* strain Rahman, (b) the avirulent trophozoites of strain HK-9 monoxenically grown with *Escherichia coli* O55, and (c) the three avirulent transfectants of strain HM-1:IMSS in which the expression of a virulence factor was selectively inhibited by antisense RNA clearly indicate that pathogenesis in *E. histolytica* is the result of the concerted participation of numerous components.

### Materials and Methods

**Avirulent *E. histolytica* strain Rahman.** The three main virulence factors, i.e., the cysteine proteinases, the 170-kDa heavy subunit of the Gal/GalNAc-specific lectin, and the amebapore of the avirulent, axenically grown *E. histolytica* strain Rahman are all expressed at similar levels as in virulent strain HM-1:IMSS. On the other hand, a number of other components were found to be present in lower amounts in strain Rahman. One of the well-established characteristics of many pathogenic microbes is the presence of complex carbohydrate layers on their cell surfaces. Analysis of the ameba surface lipophosphoglycan (LPG) of strain Rahman have shown that it significantly differs from strain HM-1:IMSS in that it contains only 10% of the LPG content and is devoid of the long, branched ( $\alpha$ 1–6) glucose oligosaccharide chains (1,2). The lack of LPG in strain Rahman suggests that these complex macromolecules may play a role in amebic pathogenesis. The absence of branched oligosaccharide chains also suggests a mutational defect in the biosynthesis of LPG, and to identify putative inactive gene(s), we have compared by representation differential analysis (RDA) the identity and levels of RNA transcripts produced between strain Rahman and the well-established virulent strain HM-1:IMSS (3). Three genes were found to be underrepresented in strain Rahman. No clue is yet available for the downregulation of the first gene coding for an S-adenosylhomocysteine hydrolase. The second gene, which codes for the aldose 1-epimerase, has not yet been studied, and could perhaps be involved in the defect of the LPG molecules in trophozoites of the avirulent strain Rahman (see previous mention of this). The third underrepresented gene was the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNAc-specific lectin molecule that is linked, via an S-S bond, to the heavy (170 kDa) subunit, and has a GPI anchor to the membrane. Surprisingly, the levels of the heavy subunit (170 kDa) of the Gal/GalNAc-lectin and the adherence properties to mammalian cells of strain Rahman were similar to those found in strain HM-1:IMSS. These findings suggested that the low expression of the light subunit could

Address reprint requests to Dr. D. Mirelman, Department of Biological Chemistry, Weizmann Institute of Science, Rehovot, 76100, Israel. Tel. 0-9721-081-934-4811, FAX 0-9721-081-936-256, E-mail: David.mirelman@weizmann.ac.il

Presenting author: David Mirelman

## Identification of Seven Chemical Factors That Favor High-Quality *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structure Formation Under Axenic Conditions

Francisco González-Salazar,<sup>\*\*\*</sup> José M. Viader-Salvadó,<sup>\*\*\*</sup> Herminia G. Martínez-Rodríguez,<sup>\*\*\*\*</sup> Eduardo Campos-Góngora,<sup>\*</sup> Benito D. Mata-Cárdenas<sup>\*</sup> and Salvador Said-Fernández<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

<sup>\*\*</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Postgrado.

<sup>\*\*\*</sup>Departamento de Microbiología,

<sup>\*\*\*\*</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, Mexico

**Key Words:** *Entamoeba histolytica*, Encystation, Cysts, Simplex method.

### Introduction

The biological cycle of *Entamoeba histolytica* consists of two stages: cyst (infective form), and trophozoite (invasive form). While the molecular and cell biology of trophozoites has been intensively studied, encystation is still poorly understood. This fact is mainly due to the absence of a culture medium that permits massive encystation under axenic conditions. We previously pointed out that *E. histolytica* spontaneously forms cyst-like structures (CLS) in PEHPS culture medium. The wall of most CLS did not resist the lytic effect of 0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS) (1). Notwithstanding, when PEHPS was supplemented with an  $Mg^{2+}$  (1.22 mM),  $Mn^{2+}$  (14.44 mM), and  $Co^{2+}$  (19.44 mM) ion blend, the CLS wall resisted 1% SDS for 10 min, although these cells showed an irregular shape and a wrinkled surface (2). In this study, with the aid of the Simplex method (3), we analyzed the effect of 10 factors on high-quality CLS formation (HQ-CLS), under axenic conditions.

### Materials and Methods

**Amoebus and cultivation methods.** The *E. histolytica* HM-1; IMSS strain was used in all experiments. Twenty-five media were designed and tested with the aid of the Simplex method modified for multiple variables and multiple responses (3).

The study was performed in four steps. In the first, a matrix of 11 media containing all 10 chemical factors under

study was tested, and the concentration of the factors producing the worst and best results was determined. During the study, the concentration of each factor in the previously mentioned media varied between a lowest and highest limit, chosen arbitrarily. The factors studied and their initial concentration limits were the following: bovine serum (0-1%); glucose (0-6%); sodium tetraborate (0-4 mM);  $MgCl_2$  (1-4 mM);  $MnCl_2$  (1-10 mM);  $CoCl_2$  (1-10 mM); liver and pancreas extract (0-2.5%) (4); Diamond's vitamin mixture 107 (0-0.05%); phosphate (0-0.66 mM), and  $CaCl_2$  (0-4 mM). To conform the second set of media, the 10 factors producing the worst results in step 1 were discarded, while the one that produced the best results was kept. By taking into account the concentration of each particular factor in media producing the worst and the best results, a second set of 10 new media were calculated. Results obtained with each media from the second set were compared with results obtained with the best media from the first set (3). By following this procedure, four additional media were discarded and substituted by four new media, which conformed the third set. The corresponding results were compared with the results of the former media, discarding only one medium. The substituting medium conformed the fourth set. The study was finished when the latter media produced worse results than those produced by any of the former.

All media were freshly prepared, using a basal medium (Casein peptone 2% in double-distilled water). This medium was distributed in 6-mL aliquots, in glass 16 × 125-mm screwcap tubes, and appropriate volumes of each of the previously described components were added, reaching a final volume of 12 mL. All tubes were gently stirred, immediately inoculated with  $2 \times 10^6$  trophozoites, and incubated for 7 days at 37°C. All determinations were made in triplicate.

**HQ-CLS evaluation.** The biological quality of HQ-CLS produced in each of the previously described media was es-

Address reprint requests to: Salvador Said-Fernández, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Av. 2 de Abril y San Carlos Perón, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, Mexico. Telephone: (52) (81) 350-1035; E-mail: salvadorsaid@norscape.net

Corresponding author: Francisco González-Salazar.

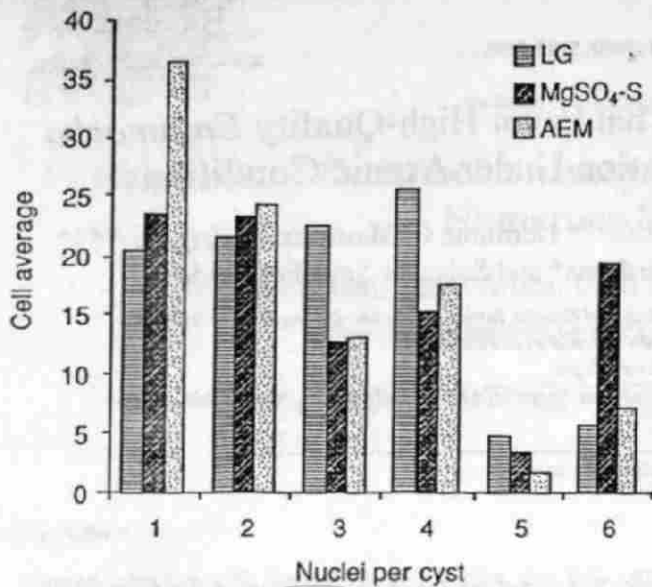


Figure 1. Quantification of the number of nuclei per cyst obtained with the different encystation media.

medium—69% in relation to inoculated trophozoites after 48-h incubation. With MgSO<sub>4</sub>-serum, low cyst yields were attained (33%), and similar percentages were obtained with AEM (35%). However, with the latter significantly reduced trophozoite and total cell (trophozoites plus cysts) yields were observed. Low yields in AEM medium could reflect the destruction of trophozoites after transference to such a medium as a consequence of osmotic shock (70 mOsm). Thus, a decreased

number of trophozoites remain viable and able to encyst. MgSO<sub>4</sub>-serum medium appears to lack some crucial components, and the effect of temperature cannot be discarded.

The number of nuclei in cysts were counted to assess cyst maturity in different media. Higher percentages of tetranucleated cysts (25%) were attained with LG medium (Figure 1), immature cysts becoming gradually lower in these medium. On the other hand, uni- and binucleated cysts predominated in MgSO<sub>4</sub>-serum medium, tetranucleated cysts being 15% of the entire population (Figure 1). Only 17% of cysts were tetranucleated in AEM (Figure 1), uninucleated cysts predominating in this medium. Cysts possessing five or more nuclei were observed in all media tested; they averaged 5% in LG medium, and were lower in the other two media. In some cysts, nuclei counting was impossible, especially in MgSO<sub>4</sub>-serum medium (Figure 1). Differentiation of *E. invadens* in different media can afford us a better knowledge of events related with the amebic life cycle, including excystation.

#### References

1. Rengpien S, Bailey GB. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol* 1975;61:24.
2. Vázquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol* 1984;70:629.
3. García-Zapién AG, Hernández-Gutiérrez R, Mora-Galindo J. Simultaneous growth and mass encystation of *Entamoeba invadens* under axenic conditions. *Arch Med Res* 1995;26:257.
4. Avron B, Stolarsky T, Chayen A, Mirelman D. Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J Protozool* 1986;33:522.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



timated as a global quality index, which was defined as the geometric percentage average of the following five HQ-CLS characteristics: resistance to 0.1% sarkosyl lysis; rounded shape and a cell diameter of 8–20  $\mu\text{m}$ ; one or more well conserved nuclei; showing a smooth surface, and birefringence.

## Results and Discussion

The Simplex is a very strong inductive method that allows procuring the best results by determining the relevant factors and their optimal concentrations in a particular biological system (4). Accordingly, in the present study we included several chemical factors that influence wall synthesis of diverse microorganisms and the main components of PEHPS to identify those that favored the HQ-CLS formation and their best concentration range in the culture medium. The factors that positively influenced HQ-CLS formation were the following; glucose (2–4%); boron (1–2 mM);

$\text{Mg}^{2+}$  (1–2 mM);  $\text{Mn}^{2+}$  (4–6 mM);  $\text{Co}^{2+}$  (6–10 mM);  $\text{Ca}^{2+}$  (2–4 mM), and bovine serum (0.5–1%). On the other hand, phosphates, vitamins, and liver and pancreas extract were irrelevant to HQ-CLS formation. Under these culture conditions, 55–60% of HQ-CLS were formed with respect to the inocula ( $2.1 \times 10^6$  trophozoites/mL). The microscopic appearance of HQ-CLS was remarkably similar to natural *E. histolytica* cysts. Figure 1 shows a spherical-shaped HQ-CLS having a birefringent and smooth surface and a well-conserved nucleus, demonstrating a central centrosome and peripheral chromatin, and having a granular cytoplasm. HQ-CLS had a better appearance than CLS formed in PEHPS supplemented with Mg, Mn, and Co ions only (1) and, unlike CLS, formed spontaneously in aged cultures maintained in PEHPS (5) and resisted double-distilled water and 0.1% sarkosyl lysis. Nevertheless, the ultrastructure of these cells needs to be analyzed by electron microscopy and whether HQ-CLS are viable and capable to excyst needs to be investigated. In addition, the effect of physico-chemical factors such as pH, oxide-reduction potential, temperature, and osmolarity on *E. histolytica* encystation also needs to be analyzed.

## Acknowledgments

This project was partially supported by Conacyt (Mexico) Grant No. 28729M. A fellowship was awarded to FGS by Conacyt (Mexico).

## References

1. Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zúñiga-Charles MA, Mora-Galindo J, González-Salazar F, Said-Fernández S. Mg, Mn, and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures resistant to sodium dodecyl sulfate. Arch Med Res 2000 (In press).
2. Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Mora-Galindo J, Said-Fernández S. Stimulation of *Entamoeba histolytica* cyst wall polysaccharide synthesis by three divalent cations. Arch Med Res 1997;38 (Suppl):S141.
3. Shavers CL, Parsons ML, Deming SN. Simplex optimization of chemical systems. J Chem Educat 1979;56:307.
4. Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988;82:249.
5. Said-Fernández S, Mata-Cárdenas B, González-Garza MT, Navarro-Marmolejo L, Rodríguez-Pérez E. *Entamoeba histolytica* cyst with a defective wall formed under axenic conditions. Parasitol Res 1993;79:200.

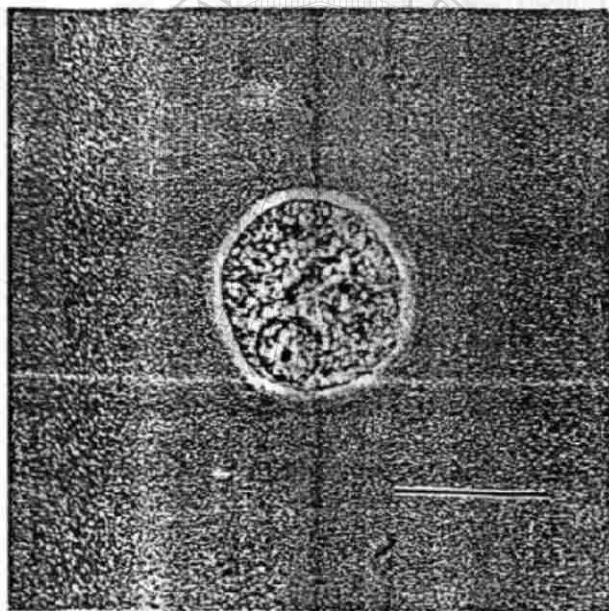


Figure 1. A high quality, cyst-like structure formed in a medium containing the seven factors favoring their formation under axenic conditions. These structures have a remarkable similarity to natural *Entamoeba histolytica* cysts, being spherical-shaped and having a smooth, birefringent surface, a granular cytoplasm, and nuclei showing a peripheral chromatin and a central centrosome. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

# Incorporation of $^{14}\text{C}$ -Glucose into Cytoplasmic Glycogen from *Entamoeba invadens* IP-1 Strain

José Juan Segura-Luna and Carmina Calzado-Flores

Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, Nuevo León, Mexico

**Key Words:** *Entamoeba invadens*,  $^{14}\text{C}$ -Glucose, Glycogen, Cyst, Ameba.

## Introduction

Glycogen represents the main intracellular source to obtain glucose in trophozoites of the *Entamoeba* genus (1). This carbohydrate is present in the trophozoite cytoplasm, and its concentration remains constant (2). However, in the cystic phase an important decrease in glycogen following cyst maturation has been observed (3). Previous reports concerning radioactive glucose transport were performed in ameba cultures to determine its participation in the different physiological conditions of this parasite (4,5).

The main goal of this study is to determine whether the radioactive glucose incorporated into trophozoites can be used as a precursor of the glycogen biosynthesis process. Standardization of the incorporation of radioactive glucose to intracellular glycogen granules of amebas could be used to identify whether these parasites degrade this polysaccharide when the cellular differentiation process has been initiated.

## Materials and Methods

**Ameba cultures.** Axenic amebas of *Entamoeba invadens* strain IP-1 were used and kept in culture in 11 mL of Diamond's TYI-S-33 medium in 16 × 125-mm Pyrex tubes with screw caps. Each tube was inoculated with  $10^4$  amebas/mL, and was incubated at 25°C.

**$^{14}\text{C}$ -glucose incorporation by amebas.** Trophozoites cultivated in TYI-S-33 medium were obtained after 7 days incubation at 25°C. The cells were transferred into Pyrex 16 × 125-mm tubes with screw caps that contained 10 mL of culture medium without glucose (this reagent was eliminated from the TYI-S-33 medium formulation). Each tube was inoculated with  $10 \times 10^5$  trophozoites/mL and incubated at 25°C for

72 h. Tubes were centrifuged (1500 rpm, 15 min at 6°C), the supernatant was eliminated, and the pellet was transferred into tubes (Pyrex 10 × 75 mm with screw caps) that contained 3 mL of medium without glucose. A glucose mixture (140 mM nonradioactive glucose and 25  $\mu\text{Ci}$  D- $^{14}\text{C}$ -glucose, CFB96 Amersham, UK) was added in 250- $\mu\text{L}$  aliquots to each tube and incubated at 25°C during 24 h.

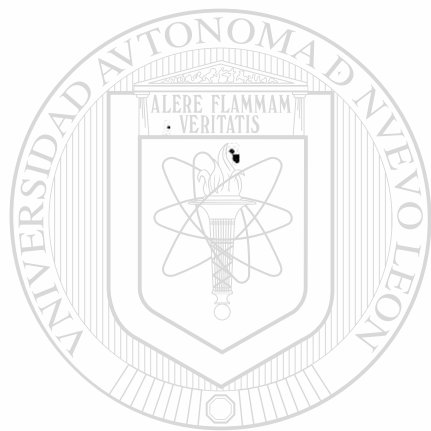
**Determination of  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporated into intracellular glycogen.** After the incorporation of radioactive glucose by axenic trophozoites, the following procedures were carried out to determine whether they were able to integrate this radioactive substance into intracellular glycogen. Trophozoites were washed twice by centrifugation (1500 rpm for 10 min at 4°C) and resuspended in 2 mL PBS to determine the number of amebas. Two milliliters of 1% SDS was added to each tube to induce complete disruption of cells. The tubes were heated in a water bath for 15 min at 96°C, immediately cooled to 4°C, and 8 mL of distilled water was added. This procedure assured the absence of intact cells, which was confirmed under microscopic examination. The tubes were centrifuged (3000 rpm for 15 min at 4°C), the supernatant was eliminated, and the sediment suspended in 5 mL ethanol. Samples were boiled for 15 min and immediately cooled in water. They were then centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4°C, and the radioactivity present in the cell sediment was determined. The sediment was transferred to a glass flask containing 3 mL of biodegradable liquid scintillation (LSC-cocktail, Packard, Cat. 6013259). The amount of radioactivity was detected with 90% efficiency for carbon in a liquid scintillation analyzer (Packard, model 1600TR).

## Results and Discussion

Trophozoites fasted of glucose for 72 h were capable of incorporating radioactive glucose in the following 24 h. Results obtained with about  $32 \times 10^5$  amebas showed that after a 24 h period, radioactive glucose was incorporated into

Address reprint requests to: José Juan Segura-Luna, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 020-L, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, México. Telefax: (52) (81) 190-3033. E-mail: jsegura@correoweb.com

Presenting author: José Juan Segura-Luna



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*J. Parasitol.* 37(4): 2001, p. 919-925  
© American Society of Parasitologists 2001

## Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup> Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material

S. Said-Fernández, E. Campos-Góngora\*, E. González-Salazar\*, H. G. Martínez-Rodríguez\*, J. Vargas-Villarreal\*, and J. M. Viader-Salvadó†, División de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigación Biomédicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apartado Postal 020-E, Colonia Independencia 64720, Monterrey, Nuevo León, México; \*Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, 64510, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Fray José E. González Monterrey, Nuevo León, México; Apartado Postal 1563 and †Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José E. González, Monterrey, Nuevo León, México; Apartado Postal 1145

**ABSTRACT:** The mechanism of *Entamoeba histolytica* cyst wall synthesis is not well understood. Previous research has shown that cyst-like structures formed in the presence of chitin synthase cofactors (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup>) resist 1% sodium dodecyl sulfate lysis (SDSL),

whereas those formed in the absence of cofactors (Cl<sup>-</sup> S) do not, and trophozoites are immediately desiccated. This suggests that *E. histolytica* is able to synthesize chitin, an important differentiation process under axenic conditions. To test this hypothesis, polysaccharide hydrolysates

from *E. histolytica* trophozoites. CLS, or RCLS were analyzed with high-performance liquid chromatography. The major components found in all 3 preparations were *N*-acetylglucosamine (NAG) and glucose (GLC), with RCLS possessing 129 and 180 times more NAG and 2.4 and 2.0 more GLC than trophozoites and CLS, respectively. After 36 hr of incubation with chitinase (16 U/ml) in a hypotonic medium (50 mOsm/kg), 68% of RCLS was lysed, and 100% lost affinity for calf-ovine white M2R. The RCLS polysaccharides bound wheat germ agglutinin and appeared as long and thin or short and thick fibers. Accordingly,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$  stimulated *E. histolytica* to synthesize a chitin-like material.

*Entamoeba histolytica* is the causative agent of amoebiasis. Its life cycle consists of trophozoite (invasive) and cyst (infective) phases. Trophozoites have been intensively studied, whereas the study of cysts is virtually nonexistent. This is mainly because of the absence of a medium that allows the mass encystation of amoebae under axenic conditions. A strategy to develop this medium would be to obtain an *in vitro* model where amoebae initiate their differentiation and then to analyze systematically each of the possible factors involved in the encystation mechanism. We previously reported that *E. histolytica* is able to form cystlike structures (CLS) in aged cultures maintained in PEHPS (*peptona de caseína, extracto de hígado y pancreas y suero*) medium (Said-Fernández et al., 1988). The microscopic appearance of CLS is remarkably similar to natural cysts, although the latter, but not CLS, resist hypotonic shock and detergent lysis (Said-Fernández et al., 1993). A possible cause of CLS weakness is a defect in the synthesis of chitin, assuming that chitin is present in the cell wall of *E. histolytica* cysts, as was suggested by Arroyo-Begovich et al. (1980). Chitin constitutes the matrix of the cell wall from fungi and *Entamoeba invadens*, conferring on them their characteristic resistance to adverse factors (Arroyo-Begovich et al., 1980; Ruiz-Herrera, 1982; Ruiz-Herrera et al., 1994).

Chitin is a polysaccharide formed exclusively by *N*-acetylglucosamine, with chitin synthase enzymes and their cofactors ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$ ) responsible for its synthesis (Ruiz-Herrera, 1982). We recently showed that, when trophozoites are incubated in PEHPS supplemented with these cofactors, amoebae form cystlike structures that are resistant to double-distilled water and 1% sodium dodecyl sulfate (RCLS), suggesting that these ions stimulate amoebae to produce chitin (Campos-Góngora et al., 2000). In the present study, the composition of polysaccharides produced by CLS and RCLS was determined and compared with the material obtained from trophozoites.

The *E. histolytica* HM-1:IMSS strain was used in this study. Amoebae were maintained under axenic conditions in PEHPS medium: 10 g casein peptone, 6 g glucose, 1 g L-cysteine, 0.2 g ascorbic acid, 0.6 g  $KH_2PO_4$ , 0.1 g  $K_2HPO_4$ , 250 ml bovine liver and swine and bovine pancreas extract, double distilled water as needed to 1 L and 9% (v/v) of bovine serum (Said-Fernández et al., 1988).

Three hundred culture tubes containing 11 ml PEHPS were inoculated with  $1 \times 10^6$  trophozoites/ml and incubated at 36.5 C. One hundred tubes were harvested after 72 hr incubation to obtain trophozoites. Another 100 tubes were incubated for 10 days to obtain CLS (Said-Fernández et al., 1993) and the remaining 100 tubes were used to produce RCLS as follows. After 7 days of incubation, 10.5 ml of spent medium was substituted with an equal amount of fresh PEHPS medium.  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ , and  $CoCl_2$  were added to produce final concentrations

of 1.22 mM, 14.44 mM, and 19.44 mM, respectively; and then the cultures were incubated for 10 additional days. After being incubated at 37 C, the trophozoites, CLS, and RCLS were harvested by centrifugation at 700 g for 5 min and washed twice—trophozoites with 10 ml phosphate-buffered saline (PBS; pH 8.0) and CLS and RCLS with double-distilled water. Then, all preparations were freeze-dried in glass ampoules by applying a vacuum of 25 mtorr, at -50 C for 4 hr. Ampoules were sealed and stored at -20 C until used.

In all of the experiments related to carbohydrate analysis, a System Gold chromatograph (Beckman Instruments, Inc., San Ramon, California), equipped with a diode array detector and an ion-exclusion column (Aminex HPX-87H; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) was used.

A monosaccharide standards analysis was performed to test the capacity of the HPLC system to resolve several of the monosaccharides found in cell walls and to determine the retention times of each carbohydrate. Each compound (reagent grade, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) was dissolved in 5 mM  $H_2SO_4$  (Merck, Darmstadt, Germany) at appropriate concentrations to obtain detectable peaks at an absorbance of 193 nm (about 0.02–2.5 absorbance units). The standards and their respective concentrations were as follows: 4.01 mg/ml fucose, 4.48 mg/ml mannose, 2.1 mg/ml glucosamine, 340  $\mu$ g/ml *N*-acetylneuraminic acid, 300  $\mu$ g/ml *N*-acetylmuramic acid, 70  $\mu$ g/ml *N*-acetylglucosamine, and 4.7 mg/ml glucose. All the standard solutions were filtered through 0.45- $\mu$ m Durapore filters (Millipore SA, de CV, México City, México), and 20  $\mu$ l from each solution was injected into the Aminex column. A 5 mM  $H_2SO_4$  isocratic elution, at a flow rate of 0.3 ml/min, was used. In addition, a solution containing all the monosaccharide standards was analyzed at the same final concentration of each individual solution. The retention time corresponding to each peak was matched with 1 of the standards injected separately to identify the corresponding compound.

The method described by Arroyo-Begovich et al. (1980), with minor modifications, was used to obtain amoebic polysaccharides. One hundred milligrams of freeze-dried trophozoites, CLS, or RCLS was resuspended in 5 ml double-distilled water and disrupted with 10 sonication cycles (75 W, for 30 sec, and 30 sec resting). The samples were centrifuged at 700 g for 15 min, and the pellet was washed 3 times with 10 ml double-distilled water. Each preparation was mixed with 1 ml of 0.5 N HCl and incubated at room temperature for 15 min, washed with 10 ml double-distilled water, and resuspended in 1 ml absolute ethanol:1 N NaOH (2:1, v/v). Each of these preparations was heated in boiling water for 5 min and filtered through microfiber glass filters (GF/A, Whatman). The polysaccharides retained in the filters were eluted with 3 ml double-distilled water, freeze-dried as for the amoebic preparations, and stored until used.

The main monosaccharides contained in the amoebic polysaccharide hydrolysates were identified and quantified by using the external standard method (see Scott, 1995). The protocol consisted of 3 main steps: obtaining glucose (GLC) and *N*-acetylglucosamine (NAG) standard curves, determining the percentage of NAG recovered from chitin sample or NAG standard hydrolysates, and determining the contents of NAG and GLC in amoebic polysaccharide hydrolysates. Variable concentrations of NAG (3.62, 36.2, and 362  $\mu$ g/ml) or GLC (48.0, 480,



charide hydrolysates could be underestimated by as much as 38%.

We have shown in this study that  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$  stimulate *E. histolytica* to produce a polysaccharide that has several of the chemical characteristics of chitin. In addition, this chitin-like material is mainly composed of fibers, similar to those observed in sagittal cuts from the *E. histolytica* cyst cell wall (Chávez et al., 1978). This strongly suggests that Mg, Mn, and Co ions stimulate *E. histolytica* to produce a chitin, which implies that *E. histolytica*, like *E. invadens* (Das and Gillin, 1991), has chitin synthase enzymes. Nevertheless, X-ray diffraction analysis of polysaccharides produced by RCLS, and the identification and cloning of the *E. histolytica* chitin synthase enzyme genes must be performed to confirm this possibility.

In addition to chitin, it is possible that another polysaccharide having GLC as a major component was produced by RCLS. It is highly unlikely that this molecule would be glycogen or cellulose, because glycogen is soluble in water (Budavari, 1996), and the procedure that we used to purify the amoebic polysaccharides included several washing steps with water. Furthermore, RCLS were not affected by cellulase. Thus, the GLC detected in our samples could belong to glucan(s) strongly bound to chitin, as in *Candida albicans* (Ruiz-Herrera et al., 1994).

The wall formed by RCLS is still abnormal (Campos-Gónzaga et al., 2000). This indicates that the  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$  concentrations that we used in this and previous studies are toxic to amoebae, and/or that other factors are involved in the *E. histolytica* cyst wall synthesis, such as possible inhibitory factors contained in PEHPS medium, the loss of genetic ability to encyst from the *E. histolytica* strain used in this and former studies, or the absence of some other factors needed to synthesize the cyst cell wall. All these possibilities are being investigated in our laboratory.

We thank Robert M. Chandler-Burns for their critical reading of our manuscript and Antonio Luna de la Rosa for the artwork. This study was partially supported by CoNaCyT (México), grants 264100-5-1379PM and F328-M9212, 28729M, and Master's degree fellowships awarded to E.C.G. and F.G.S.

## LITERATURE CITED

- ARROYO-BEGOVICH, A., A. CARABEZ-TREJO, AND J. RUIZ-HERRERA. 1980. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* 66: 735-741.
- BUDAVARI, S. 1996. 4506. Glycogen. In *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, S. Budavari (ed.), Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, p. 765-765.
- CAMPOS-GÓNGORA, E. J., M. VIADER-SALVADÓ, H. G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, M. A. ZUÑIGA-CHARLES, J. MORA-GALINDO, AND S. SAID-FERNÁNDEZ. 2000. Mg, Mn, and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures resistant to sodium dodecyl sulfate. *Archives of Medical Research* 31: 162-168.
- CHÁVEZ, B., A. MARTÍNEZ-PALOMO, AND M. DE LA TORRE M. 1978. Ultramicroscopic structure of the cyst wall of *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* and *E. coli*. *Archivos de Investigación Médica (México)* 9(Suppl. 1): 113-116.
- DAS, S., AND R. D. GILLIN. 1991. Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochemical Journal* 280: 641-647.
- GOLDSTEIN, I. I., AND R. D. PORETZ. 1986. Isolation and chemical properties of the lectins. In *The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine*, I. E. Leinek, N. Sharon, and I. J. Goldstein (eds.), Academic Press Inc., New York, New York, p. 103-115.
- MAEDA, H., AND N. ISHIDA. 1967. Specificity of binding of hexapyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 62: 276-278.
- RUIZ-HERRERA, J. 1982. Synthesis of chitin microfibrils *in vitro*. In *Cellulose and other natural polymer systems*, R. M. Brown (ed.), Plenum Press, New York, New York, p. 207-223.
- , S. MORMENGO, P. VANACLOCHA, J. FONT-DE-MORA, M. IRANZO, I. PUERTES, AND R. SENTANDREU. 1994. Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*. *Microbiology* 140: 1513-1523.
- RUPLEY, J. A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 83: 245-255.
- SAID-FERNÁNDEZ, S., B. D. MATA-CÁRDENAS, M. T. GONZÁLEZ-GARZA, E. RODRÍGUEZ-PÉREZ, AND L. NAVARRO-MARMOLEJO. 1993. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitology Research* 79: 200-203.
- , J. VARGAS-VILLARREAL, J. CASTRO-GARZA, B. D. MATA-CÁRDENAS, L. NAVARRO-MARMOLEJO, G. LOZANO-GARZA, AND H. G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ. 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 249-253.
- SCOTT, R. P. W. 1995. Quantitative analysis. In *Techniques and practice of chromatography*, R. P. W. Scott (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, New York, p. 135-162.
- SHAWERS, C. I., M. L. PARSONS, AND S. N. DEMING. 1979. Simplex optimization of chemical systems. *Journal of Chemistry Education* 56: 56-707.

## TRICHOMONAS VAGINALIS: IDENTIFICATION OF A PHOSPHOLIPASE A-DEPENDENT HEMOLYTIC ACTIVITY IN A VESICULAR SUBCELLULAR FRACTION

Javier Vargas-Villarreal, Benito D. Matá-Cárdenas, Francisco González-Salazar, Héctor G. Lozano-Garza, Elva I. Cortés-Gutiérrez, Rebeca Palacios-Corona, Herminia G. Martínez-Rodríguez\*, Enrique Ramírez-Bonf, and Salvador Saïd-Fernández†

División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 020 E, Colonia Independencia, Monterrey, CP 64720, Nuevo León, México e-mail: ssaïd@mail.mty.itesm.mx

**ABSTRACT:** Trichomonad total extracts (TTE), or vesicular (P30) and soluble (S30) subcellular fractions from 3 pathogenic *Trichomonas vaginalis* strains (GT-3, GT-13, and GT-15), lysed both human and Sprague-Dawley rat erythrocytes in a time- and dose-dependent manner. The entire hemolytic activity of TTE was located in P30, showing 2 peaks of maximum activity, one at pH 6.0 and another at pH 8.0, in the presence of 1 mM Ca<sup>2+</sup>. Hemolytic activity on rat erythrocytes was greater at pH 6.0 ( $6.71 \pm 0.33$  hemolytic units [HU]/mg/hr to  $11.69 \pm 0.24$  HU/mg/hr) than at pH 8.0 ( $3.81 \pm 0.30$  HU/mg/hr to  $5.75 \pm 0.65$  HU/mg/hr), and it was greater than that on human red blood cells at pH 6.0 ( $2.67 \pm 0.19$  HU/mg/hr to  $4.03 \pm 0.15$  HU/mg/hr) or pH 8.0 ( $2.24 \pm 0.09$  HU/mg/hr to  $2.81 \pm 0.06$  HU/mg/hr). The alkaline and acidic hemolytic activity diminished (60–93% at pH 6.0 and 78–93% at pH 8.0) by the effect of 80  $\mu$ M Rosenthal's inhibitor, which also inhibited 27–55% and 29–54% trichomonad alkaline and acidic phospholipase A activities, respectively. Vesicles, vacuoles, and hydrogenosomes were rich in P30. *Trichomonas vaginalis* has a hemolytic PLA, which could be involved in its cytopathogenic mechanism.

Trichomoniasis affects 12% of men and 16% of women worldwide. It is caused by sexually transmitted *Trichomonas vaginalis* and can either run an asymptomatic course or be manifest as vaginitis, urethritis, or both. This parasitic disease has been suggested as a factor in increasing the probability of developing cervical neoplasia (Zhang and Begg, 1994) and favoring the progression of human immunodeficiency virus (Krivacic, 1992). It has also been associated with intrauterine growth retardation (Germain et al., 1994) and male infertility (Moskowitz and Mellinger, 1992).

*Trichomonas vaginalis* has the ability to destroy in vitro monolayers of epithelial cells isolated from human vaginal mucosae. Phagocytosis (Rendon-Maldonado et al., 1998), cytotoxicity (Gilbert et al., 2000), hemolysis (De Carli et al., 1996), and mammalian cell monolayer disruption (González-Robles et al., 1995; Gilbert et al., 2000) are important components of trichomonad cytopathogenicity, which is closely related to virulence of these (De Carli et al., 1994, 1996; Nagay et al., 2000) and other parasitic protozoa, i.e., *Entamoeba histolytica* (Ravdin, 1988; *Trypanosoma cruzi* (Wainszelbaum et al., 2001), *Acanthamoeba castellanii* (Ferrante, 1991), *Naegleria fowleri* (Barbour and Marciano-Cabral, 2001), and *Plasmodium falciparum* (Ponrevez et al., 1995).

As in the case of *E. histolytica* (Ravdin, 1988), cytotoxicity produced by trichomonad depends on parasite contact with target cells (Gilbert et al., 2000). Notwithstanding, some workers have pointed out that *T. vaginalis* and *T. foetus* also are capable of releasing soluble cytotoxins and hemolysins (Burgess et al., 1990; Fiori et al., 1996).

Factors related to cytopathogenicity of *T. vaginalis* and other trichomonad species are surface glycoproteins, respiratory

parasite adherence to target cells (Alderete et al., 1986), neuraminidase (Dias Filho et al., 1999) and proteinases that contribute to detaching tissues and cultured monolayers (Arroyo and Alderete, 1995; Alvarez-Sánchez et al., 2000), and pore-forming proteins (Fiori et al., 1996) that lyse erythrocytes and nucleated cells.

Phospholipases A (PLA) have not yet been identified as virulence factors in pathogenic trichomonad species, even after these enzymes have been identified as significant virulence factors in other parasitic protozoa such as *E. histolytica* (Long-Krug et al., 1985; Vargas-Villarreal et al., 1995; González-Garza et al., 2000), *T. cruzi* (Wainszelbaum et al., 2001), and *N. fowleri* (Barbour and Marciano-Cabral, 2001), and as the main cytotoxicity of insect, arachnid, and reptile venoms (Dennis, 1983).

Most *T. vaginalis* cytopathogenic factors have been detected by using in vitro models in which living trichomonads or spent culture medium were coincubated with target cells. Nevertheless, the effects of incubation time, dose, pH, and ion concentration have often been disregarded, knowing that some of these chemical and physicochemical factors are usually essential in identifying and characterizing enzymatic activities related to cytopathogenicity, i.e., proteinases (Ravdin, 1988; Bozner and Dennis, 1991) and phospholipases (Dennis, 1983). Moreover, pore-forming proteins (Fiori et al., 1996) and lectins are also dependent on some of these factors (Goldstein and Gillin, 1986). This could explain why some (Burgess et al., 1990; Pindak et al., 1993; Fiori et al., 1996) but not other (Dauley et al., 1990; De Carli et al., 1994) researchers have been able to detect the effects of soluble hemolysins and why phospholipases have not yet been identified as trichomonad hemolytic or cytotoxic factors. In addition, systematic analysis for identifying subcellular fractions that contain hemolytic or cytotoxic activity of trichomonads has not been performed. We do not know whether or not cytotoxicity associated with membrane proteins such as PLA (González-Garza et al., 2000) or trypsin-like proteinase (Alvarez-Sánchez et al., 2000). This knowledge could contribute to understanding the manner in which these cytotoxins enter into contact with target cells and to facilitating the strategy for their isolation and further characterization.

Received 16 May 2001; revised 21 February 2002; accepted 20 June 2002.

\* Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Génica, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud, Av. Cuernavaca 1300, México DF, México.  
† Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Génica, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud, Av. Cuernavaca 1300, México DF, México.

Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José Martí s/n, Apartado Postal 1563, Monterrey, Nuevo León, México.

‡ To whom correspondence should be addressed.

Accordingly, in the present study we investigated whether *T. vaginalis* cell-free total extracts from 3 pathogenic strains (GT-3, GT-13, and GT-15) have hemolytic activity and also determined the subcellular distribution of this activity and identified several physicochemical factors that allow its maximum expression. In addition, we investigated if this activity depends on PLA activity and analyzed the ultramicroscopic structure of the trichomonad subcellular fraction that contained the complete hemolytic activity of these parasites.

## MATERIALS AND METHODS

### Parasites

*Trichomonas vaginalis* (GT-3, GT-13, and GT-15 strains) were used in all the experiments, except in those concerning an analysis of the ultrastructure of P30, pH, and  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of P30's hemolytic activity, where only GT-13 was used. All 3 trichomonad strains were kindly donated to us by Dr. Fernando Anaya-Velázquez, from the Instituto de Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, México. These strains were isolated in Guanajuato State, México, from vaginal secretions of patients having symptomatic trichomoniasis (Padilla-Vaca and Anaya-Velázquez, 1997). Immediately on arrival at our laboratory, the trichomonads were placed in PEHPS medium (Castro-Garza et al., 1996; Mata Cárdenas et al., 1998) and subcultivated twice a week, for 2 mo, throughout the experiments or cryopreserved until use to avoid changes in their original biological properties, as described below.

### Cultivation methods

**Preparation of PEHPS medium:** The medium components were combined (175 ml bovine liver and bovine adipine pancreas extract [Said-Fernández et al., 1988], 5.0 g casein, 3.0 g glucose, 0.5 g L-cysteine, 0.1 g ascorbic acid, 0.2 g NaCl, 0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), resuspended with double-distilled water, the pH adjusted to 7.0, and the volume brought up to 500 ml. This medium was distributed in 10-ml aliquots in 16 × 125-mm screw capped borosilicate culture tubes and sterilized at 121 °C for 15 min; 1 ml sterile bovine serum was added to each tube. The medium was used immediately (Said-Fernández et al., 1988).

**Trichomonad subcultivation:** Three tubes containing 10 ml PEHPS plus 10% (v/v) bovine serum and Diamond's vitamin-Tween 80 mixture (Diamond et al., 1978) were inoculated with  $1 \times 10^7$  trichomonads/ml and incubated at 36.5 °C for 96 hr. Each tube was observed with an inverted microscope, and the one containing protozoa with the highest density and mobility was cooled in ice water for 10 min. The number of trichomonads per milliliter was then determined with a hemacytometer. The trichomonads were inoculated, as above, into 3 tubes containing fresh culture medium. This procedure was repeated systematically every 96 hr to maintain the reference strain (Castro-Garza et al., 1996; Mata-Cárdenas et al., 1998).

**Mass cultures:** To perform each experiment, 3 spinner flasks (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey) containing 600 ml PEHPS, supplemented with 10% (v/v) bovine serum and Diamond's vitamin-Tween 80 mixture (Diamond et al., 1978), were inoculated with  $1 \times 10^7$  trichomonads/ml and incubated steadily at 36.5 °C for 96 hr. The cultures were chilled in ice water for 10 min and centrifuged at 1,000 g for 15 min at 4 °C. Protozoa were washed twice with 10 volumes of phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0) and processed immediately after obtaining the trichomonad total extracts (TTE) or the subcellular fractions.

### Cryopreservation

Trichomonads ( $1 \times 10^7$  growing logarithmically) were centrifuged at 1,000 g for 15 min at 4 °C and resuspended with 1 ml of 10% (v/v) sulfite-free pyruvate-free (LY-S-33) medium (Diamond et al., 1978). Preparations were put into 2 ml cryo-vials (Sigma) (hermetic Compair - St. Louis, Missouri) kept at 36.5 °C for 15 min, and frozen at -20 °C for 2 hr and then at -70 °C for 2 hr more before being placed in liquid nitrogen. Two cryo-vials containing frozen trichomonads were thawed in a water bath at 36.5 °C immediately before use, and trichomonads from each vial were inoculated into tubes containing 10 ml

PEHPS medium (Said-Fernández et al., 1988). Twenty hours later the trichomonads were reinoculated in fresh PEHPS medium. The successive reinoculations were performed every 96 hr.

### Obtaining TTE and subcellular fractions

The hemolytic activities of TTE, S30, and P30 were assayed at various pH values (5.0–9.5) or solely at pH 6.0 and pH 8.0, as described. Different batches of TTE, S30, or P30, having one of the aforementioned pH values, were prepared as follows. A pellet of freshly obtained trichomonads was washed, resuspended, fractionated, and diluted with Hank's balanced salt solution (BSS; 0.7 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5.5 mM glucose, 120 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.7 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM Trizma base). The pH was brought to the desired value by addition of appropriate concentrations of sodium acetate-acetic acid (pH 5.5, 6.0, and 6.5) or Trizma base (pH 7.0–9.5). A freshly obtained pellet of trichomonads was washed once with 10 volumes PBS and centrifuged at 1,000 g for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended with 1 volume BSS and the trichomonads disrupted with a motor-driven Elvehjem Potter Teflon/glass homogenizer (Yarlett et al., 1993). Three milliliters of TTE were saved, divided into 0.5-ml aliquots, and stored in liquid nitrogen until required. The remaining TTE was centrifuged at 30,000 g for 15 min at 4 °C. The resultant supernatant (S30) was stored until use. The pellet (P30) was resuspended with 1 volume BSS, distributed in 200- $\mu$ l aliquots, and stored at -70 °C. Immediately before the start of each experiment, a sufficient number of TTE, P30, and S30 aliquots were thawed at room temperature and diluted with BSS to adjust the protein concentration to 1–16 mg/ml, according to each experiment design (see below).

### Hemolysis assays

Hemolysis assays were performed by adapting experimental conditions to a method described previously to analyze the hemolytic activity of *E. histolytica* subcellular fractions (Said-Fernández and López-Revilla, 1982). Erythrocyte suspensions with predetermined pH values and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were used according to the design of each experiment. Twenty-five microliters of human (group O Rh+) from a healthy donor) or Sprague-Dawley rat erythrocyte suspensions, preadjusted at 300 mOsm/kg and to an optical density of 0.8 at 415 nm, were placed into 1.5-ml-capacity polypropylene centrifuge tubes (Sigma) and mixed with 25  $\mu$ l of TTE, S30, or P30. In addition, 3 tubes were treated with 25  $\mu$ l double-distilled water or 25  $\mu$ l BSS instead of the trichomonad extracts, which were used as 100% and 0% hemolysis controls, respectively. The hemolysis mixtures were incubated at 36.5 °C for various periods of time (see below). Subsequently, 1 ml PBS was added and the cultures centrifuged at 600 g for 5 min at 4 °C. The absorbance at 415 nm ( $A_{415}$ ) was measured with a spectrophotometer (PMQ III, model MM3, Zeiss, Oberkochen, Germany). The percentage of hemolysis in each tube was determined by applying the following equation: % He =  $(\text{EXHR} - \text{SHR})/(\text{MHR} - \text{SHR}) \times 100$ , where % He is the hemolysis percentage, EXHR the experimental hemoglobin release, SHR the spontaneous hemoglobin release (in mixtures with added BSS instead of trichomonad extracts), and MHR the maximum hemoglobin release (in mixtures treated with double-distilled water instead of trichomonad preparations). One hemolytic unit (HU) was defined as the amount of protein from TTE, or any of the subcellular fractions, required to produce 5% hemolysis (HU<sub>5%</sub>) in the aforementioned assay mixtures. These data were interpolated in the respective dose-response curves. The specific hemolytic activity of the trichomonad preparation was expressed as the amount of HU per milligram of protein for 1 hr incubation at 36.5 °C (HU/mg/1hr).

### Effects of extract dose, incubation times, $\text{Ca}^{2+}$ concentration, pH, and Rosenthal's inhibitor on the hemolytic activity of trichomonad extracts

All of these experiments were performed following the hemolysis method previously described, with the following exceptions. The effect of pH was determined with hemolysis mixtures containing rat erythrocytes, a P30, at a dose equivalent to 200  $\mu$ g of protein. The hemolysis mixtures containing 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  were incubated for 2 hr at 36.5 °C with a series of pH values ranging from 5.5 to 9.5. The  $\text{Ca}^{2+}$  effect was analyzed in hemolysis mixtures containing rat erythrocytes, 200  $\mu$ g of P30 proteins, and 0–3.5 mM  $\text{CaCl}_2$ . The assays were carried out at both



pH 6.0 and pH 8.0. The incubation times were 1 and 2 hr, respectively. To determine the effects of incubation time and dose-response curves, hemolysis mixtures containing rat or human erythrocytes and 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  were used. The temporal relationship of hemolytic activity was determined by using 25  $\mu\text{l}$  of P30 (having 200  $\mu\text{g}$  proteins), TTE, or S30 (cocontaining 400  $\mu\text{g}$  proteins). These assays were carried out at both pH 8.0 and pH 6.0. Dose-response curves were used to calculate the specific hemolytic of trichomonad preparations. These were determined by testing a series of TTE, S30, or P30 doses (having 0–400  $\mu\text{g}$  protein). Hemolysis mixtures were incubated for enough time to obtain at least 80% hemolysis or for 5 hr maximum, i.e., TTE and S30 hemolysis mixtures were incubated for 5 hr, P30 with rat erythrocytes for 2 hr at pH 8.0 and 1 hr at pH 6.0 and with human erythrocytes for 5 hr at pH 8.0 and 2.5 hr at pH 6.0.

To analyze the effect of a PLA inhibitor on hemolytic activity, P30 samples containing 200  $\mu\text{g}$  protein were mixed with various doses (0–80  $\mu\text{M}$ ) of Rosenthal's inhibitor (dimethyl-DL-2,3-distearoyloxypropyl-2'-hydroxyethylammonium; Sigma). The mixtures were incubated for 30 min at 36.5 C, and immediately afterward 25  $\mu\text{l}$  of a 2% (v/v) rat erythrocyte suspension (pH 6.0 or 8.0) was added. Each hemolysis preparation was mixed thoroughly with a vortex and incubated again for 1 hr (pH 6.0 preparations) or 2 hr (pH 8.0 preparations) at 36.5 C.

### Phospholipase A assays

These assays were performed as described previously (Vargas-Villarreal et al., 1995), with minor modifications. In 1.5-ml cone-bottom borosilicate vials (Bellco Glass) were mixed 1.0 ml of 100 mM sodium acetate-acetic acid (pH 6.0) or 100 mM of Trizma base (pH 8.0), 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.2% Triton X-100, 0.27 mM phosphatidylcholine, and 4  $\mu\text{Ci}$  of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-(choline-methyl- $^3\text{H}$ )-choline per milliliter ( $^3\text{H}$ -choline)-PC; 60 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, Massachusetts). The mixtures were sonicated with an Ultratip Labsonic System (Lab-Line Instrument Inc., Melrose Park, Illinois), which was operated at 40 W for 60 sec. The resultant emulsion was divided into 0.5-ml aliquots in vials and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until required.

The assays were performed in 15  $\times$  15-mm borosilicate test tubes, in which 10  $\mu\text{l}$  of 1 of the above-described substrate mixtures was added, and mixed with 10  $\mu\text{l}$  of the P30 of GT-3, GT-13, or GT-15 suspension containing 200  $\mu\text{g}$  of total protein. After 1 hr (pH 6.0) or 2 hr (pH 8.0) of incubation at 36.5 C in a water bath, phospholipid hydrolysis was stopped by addition of 25  $\mu\text{l}$  of 1 mg egg yolk lysophosphatidylcholine (LPC)/ml and 0.75 mg egg yolk phosphatidylcholine (PC)/ml in 5% trichloroacetic acid in *n*-butanol to bring the mixture to a final volume of 45  $\mu\text{l}$ .

The radioactivity in PC and LPC from the assay was determined and separated by thin-layer chromatography as follows. On 20  $\times$  20-cm silica-gel plates (0.25-mm thickness, 60-mesh; Merck, Darmstadt, Germany) was poured, drop by drop, 45  $\mu\text{l}$  of the above-described mixture, at the origin of the chromatograms. The plates were placed into a thin-layer chromatograph (TLC)-developing tank with a solvent system of chloroform-methanol-acetic acid-water (140:40:16:8, v/v/v/v). Lipid spots were developed by exposing the TLC plates to iodine vapor (Skip-sky and Barclay, 1969).

Identification of PC and LPC was performed by comparing the appearance and relative migration coefficients (Rf: PC, 0.43 and LPC, 0.185) of spots from experimental samples with those of the corresponding standards (Sigma). The lipid spots from each lane (developed with iodine vapor) were scraped, the released material put into vials containing 5 ml of scintillation liquid (biodegradable counting scintillant, Amersham Corporation, Arlington Heights, Illinois), and its radioactivity determined by a 5,255 Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Packard Instrument Company, Incorporated, Downers Grove, Illinois), equipped with an external standard source ( $^3\text{H}$ -Ra) assembly, and preadjusted to analyze the relatively unquenched samples. Specific PLA activity (PLA/ing/hr) was calculated by defining arbitrarily 1 unit of PLA (PLAU) as the hydrolysis of 1 nmol of [ $^3\text{H}$ ]-choline-PC/mg protein/hr.

### Effect of Rosenthal's inhibitor on trichomonads PLA activity

Assay mixtures containing 200  $\mu\text{g}$  P30 total protein of GT-3, GT-13, or GT-15 and 80  $\mu\text{M}$  of Rosenthal's inhibitor were incubated for 30 min at 36.5 C. Immediately afterward, 4  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-choline-PC/ml dis-

solved in 0.020 ml of 100 mM sodium acetate-acetic acid (pH 6.0) or 100 mM of Trizma base buffer (pH 8.0), 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , and 0.1% Triton X-100 were added. Each preparation was mixed thoroughly with a vortex and incubated again for 1 hr (pH 6.0 preparations) or 2 hr (pH 8.0 preparations) at 36.5 C. The hydrolysis products ([ $^3\text{H}$ ]-LPC) were separated by thin-layer chromatography and quantified as described above.

### Protein determination

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

### Electron microscopy

A P30 sample (200  $\mu\text{l}$ ) was fixed with 1 volume of 5% (v/v) glutaraldehyde for 1 hr at 36.5 C and centrifuged at 310 g for 5 min at 4 C. The pellet was washed twice with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) and resuspended in 1% (w/v) osmium tetroxide. The sample was dehydrated with a series of ethanol concentrations (60–100%) and embedded with Epon Epoxic Resin (Pellico, Redding, California). The electron micrographs were obtained with a Carl Zeiss EM-109 electron microscope (Zeiss).

### Statistical analysis

All results are the average and standard error (SE) of 3 experiments, each performed in triplicate. Where indicated, the association between dose-response hemolysis and PLA curves was calculated by using the 2-tailed lineal correlation simple method, with the aid of the Statistical Package for Social Science (SPSS for Windows, Standard Version 19.0), with 95% confidence. In addition, the means of HD<sub>50</sub> determined in triplicate in GT-3, GT-13, and GT-15 were compared by using the 1-way analysis of variance test.

## RESULTS

### Dependence of P30's hemolytic activity on pH, and $\text{Ca}^{2+}$ concentration

Hemolytic activity of P30 presented 2 peaks of maximum activity as a function of pH, one at pH 6.0 and the other at pH 8.0 (Fig. 1). The difference between hemolysis obtained at pH 6.0 and pH 8.0 was highly significant with respect to that determined for all other pH values ( $P < 0.005$ ). Hemolysis produced at pH 6.0 and pH 8.0 rose as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration from 0.5 to 1 mM. Higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations inhibited both alkaline and acidic hemolytic activities (Fig. 2). The differences between hemolysis produced by P30 containing 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , at both pH 6.0 and pH 8.0, were highly significant ( $P < 0.005$ ) with respect to that produced by P30 preparations containing any other  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, except for those that were assayed at pH 8.0 and contained 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P = 0.05$ ).

### Time relationship of hemolytic activity in TTE and subcellular fractions

Trichomonad total extracts from GT-3, GT-13, and GT-15 were capable of lysing both human and rat erythrocytes at pH 8.0 or at pH 6.0. In all cases the hemolytic activity observed up to the first hour of incubation (Fig. 3) and the second hour, the range of hemolysis produced against human erythrocytes at pH 6.0 or 8.0, or against rat erythrocytes at pH 6.0, did not surpass 31.5% with respect to that produced by TTE, whereas the hemolytic effect of TTE at pH 6.0 against erythrocytes increased with time, reaching 78–99% after 4.0 min, higher than under the aforementioned conditions. The hemolysis produced against rat erythrocytes at pH 6.0 and at pH 8.0 by using a total P30 increased with respect to incubation time, reaching

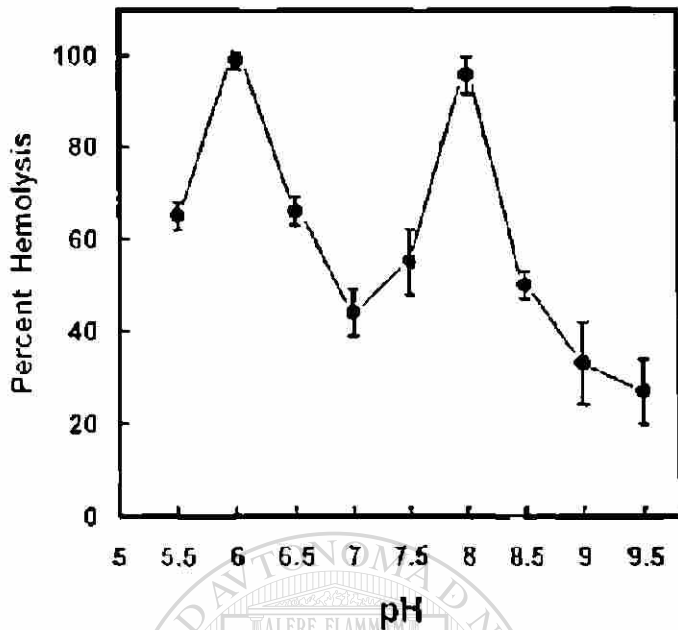


FIGURE 1. Effect of pH on P30 hemolytic activity. The hemolytic activity of P30 doses equivalent to 200 µg proteins at several pH values was analyzed using rat erythrocytes. The samples were incubated for 2 hr at 36.5 C. Symbols correspond to the averages ± SE of 3 experiments in triplicate. The difference between percent hemolysis observed at pH 6.0 and 8.0 was highly significant with respect to that determined at all other pH values ( $P < 0.005$ ).

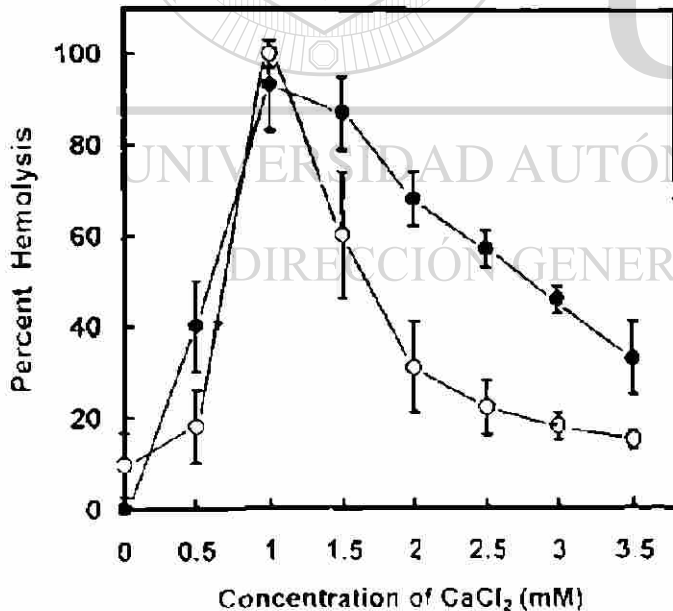


FIGURE 2. Calcium dependence of P30 hemolytic activity. Assay mixtures contained 200 µg of P30 proteins and various CaCl<sub>2</sub> concentrations. The assays were carried out at pH 6.0 (○) and pH 8.0 (●). Assay mixtures with pH 6.0 were incubated for 1 hr and those with pH 8.0 for 2 hr. All experiments were incubated at 36.5 C. Symbols correspond to the averages ± SE of 3 experiments in triplicate. Differences between hemolysis produced by P30 containing 1 mM Ca<sup>2+</sup> at both pH 6.0 and pH 8.0, were highly significant ( $P < 0.005$ ) with respect to that produced by P30 preparations containing any other Ca<sup>2+</sup> concentration, except for those that were assayed at pH 8.0 and contained 1.5 mM Ca<sup>2+</sup> ( $P = 0.3$ ).

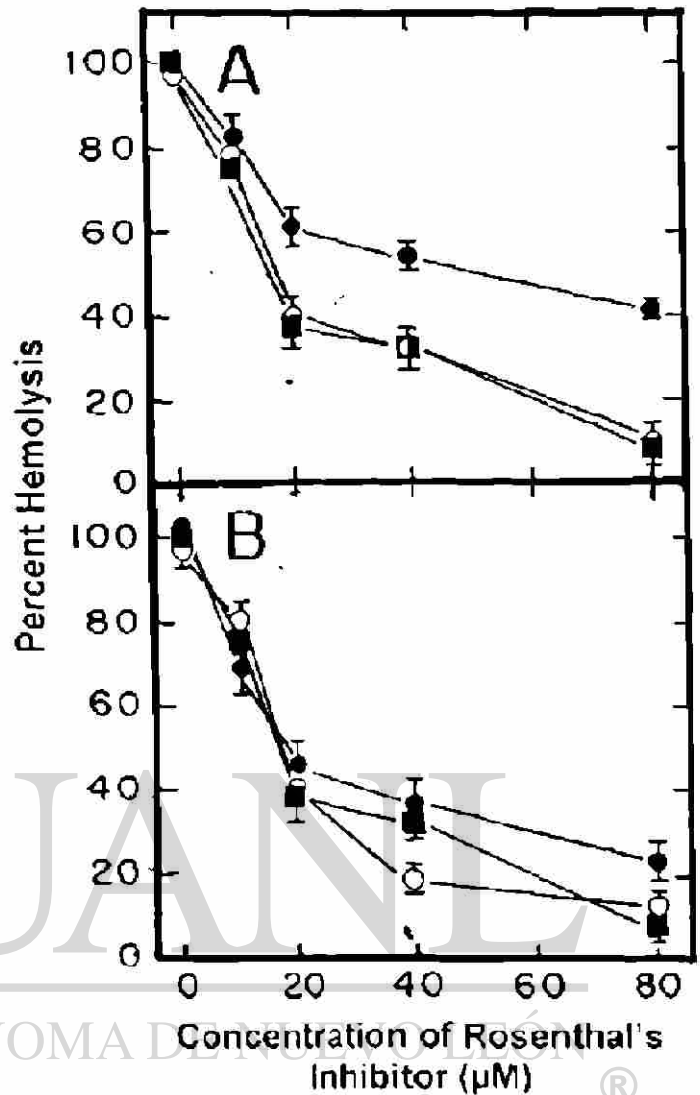


FIGURE 3. Effect of Rosenthal's inhibitor on the hemolytic activity of P30. Ten microliters of P30 from strains GT-3 (○), GT-13 (●), or GT-15 (■) were mixed with various doses of Rosenthal's inhibitor and incubated at 36.5 C for 30 min. Immediately afterward, 25 µl of 2% (v/v) rat erythrocytes were added and reincubated at 36.5 C, those mixtures with pH 6.0 for 1 hr (frame A) and those with pH 8.0 for 2 hr (frame B). Each point corresponds to the averages ± SE of 3 determinations in triplicate. The P30 hemolytic activity of GT-13 was more susceptible to the effect of Rosenthal's inhibitor at pH 8.0 than at pH 6.0 at all concentrations ( $P < 0.05$ ).

98%. Maximum rat red blood cell hemolysis took 1 hr at pH 6.0 and 2 hr at pH 8.0. Whereas that of human erythrocytes lasted for 2.5 hr at pH 6.0, and 5 hr at pH 8.0 (Fig. 3). S30 had no detectable hemolytic activity.

**Dose-dependence of TTE and P30 specific hemolytic activity**

Hemolysis produced by TTE from GT-3, GT-13, and GT-15, assayed on rat erythrocytes at pH 6.0 and pH 8.0, increased with respect to dose, reaching 74–99% and 80–99% after a 1- and 2-hr incubation period, respectively. P30 produced 86–96% and 78–93% hemolysis on human erythrocytes at pH 6.0 and

TABLE I. Differential susceptibility of erythrocyte species and subcellular distribution of the specific hemolytic activity of 3 *Trichomonas vaginalis* strains.

Strain	Subcellular fraction	Specific hemolytic activity* (HU/mg/hr)			
		Human		Rat	
		pH 6.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 8.0
GT-3	TTE	<0.25	<0.25	<0.25	1.25 ± 0.001
	P30	2.67 ± 0.19	2.24 ± 0.09	6.71 ± 0.33	3.81 ± 0.30
GT-13	TTE	<0.25	<0.25	<0.25	1.59 ± 0.39
	P30	4.08 ± 0.15	2.74 ± 0.15	10.81 ± 0.83	5.75 ± 0.65
GT-15	TTE	<0.25	<0.25	<0.25	2.14 ± 0.26
	P30	3.08 ± 0.00	2.81 ± 0.06	11.60 ± 0.24	5.54 ± 0.46

\* Averages ± SE from 3 experiments, in triplicate, were plotted and the mean hemolytic dose ( $HD_{50}$ ) interpolated. One hemolytic unit (HU) was defined as 1  $HD_{50}$ , which was equivalent to 50% of hemolysis (100% hemolysis was equivalent to  $0.8 \pm 0.05$  unit of optical density at 415 nm). Hemolysis having values <0.25 HU/mg/hr did not reach 50% hemolysis. Other values were significantly different from each other ( $P < 0.05$ ).

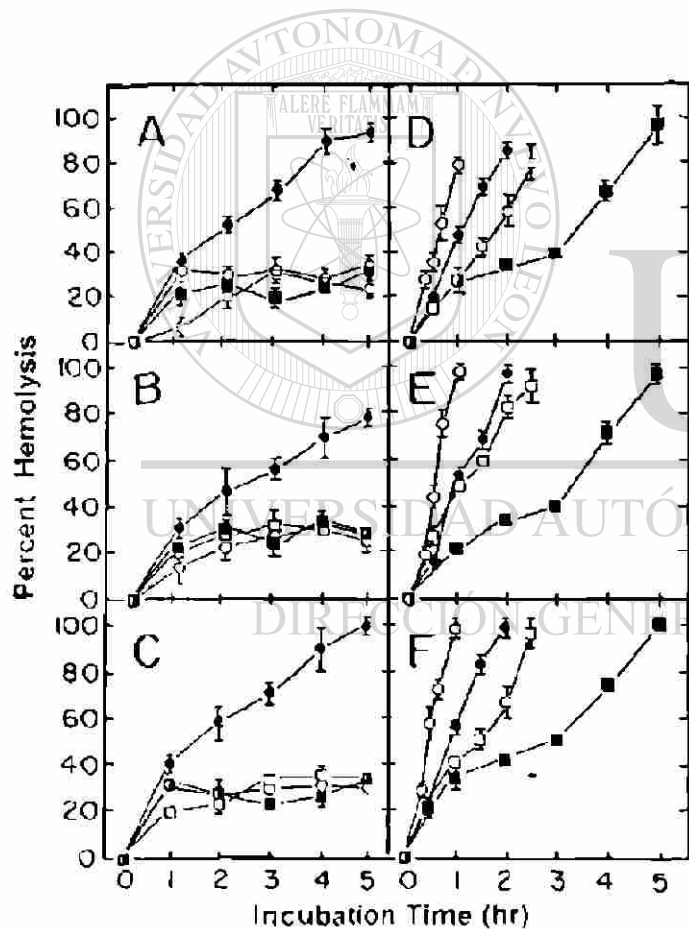


FIGURE 4. Time course of the hemolytic activities of trichomonad cell-free preparations. Figures A-C correspond to the hemolytic activity of GT-3, GT-13, and GT-15 of TTE, respectively. Figures D-F correspond to that of P30 from the same strains, in the same order. The hemolysis mixtures were adjusted at pH 6.0 with (○) or human (■) erythrocytes added or at pH 8.0 with rat (○) or human (■) red blood cells added. All assays were performed at 37.5°C. Trichomonad total extracts and P30 assays contained 0.0 and 2.0 μg protein, respectively. Each point corresponds to the average ± SE of 3 determinations, in triplicate. Even though S30 from the aforementioned strains was tested, any hemolytic activity that was detected was not plotted.

pH 8.0 after 2.5 and 5 hr incubation, respectively. In all instances GT-3 showed the lowest hemolysis and GT-15 the highest. Hemolysis produced by TTE did not reach 50%, and S30 had no detectable activity.

Table I shows that the highest specific hemolytic activity corresponded to P30 from the GT-15 and GT-13 strains on rat erythrocytes at pH 6.0, with significant differences between each as in the case of P30 from GT-3 ( $P < 0.005$ ) under the same experimental conditions. The specific hemolytic activity of the 3-strain P30 preparations on rat erythrocytes at pH 6.0 was 1.6–2.0 times higher than that at pH 8.0 ( $P < 0.05$ ) and 2.5–3 and 3–4 times higher than the activity showed by this same preparation at pH 6.0 and pH 8.0 on human erythrocytes, respectively ( $P < 0.05$ ).

#### Effect of Rosenthal's inhibitor on alkaline and acidic hemolytic activities

Figure 4 shows that the hemolytic activity of P30 assayed at pH 6.0 and pH 8.0 diminished as a function of Rosenthal's inhibitor. Under both experimental conditions, and in all the 3-trichomonad strains, 2 slopes were observed, one from 5 to 20 μM and another from 20 to 80 μM. The P30 hemolytic activity of GT-13 was more susceptible to the effect of Rosenthal's inhibitor at pH 8.0 than at pH 6.0 at all concentrations ( $P < 0.05$ ). The dose of Rosenthal's inhibitor that produced 50% diminution at pH 6.0 and at pH 8.0 with respect to the untreated controls ( $ID_{50}$ ) was 17.7 μM in all 3 strains at pH 8.0, and at pH 6.0 it was 18.8 μM, 16.6 μM, and 55.6 μM in GT-3, GT-15, and GT-13, respectively.

#### Alkaline and acidic specific PLA activities and effect of Rosenthal's inhibitor

The highest specific acidic and alkaline PLA activities corresponded to GT-15, followed by those of GT-13, these being 47% and 27% lower ( $P < 0.005$  in both cases), and then by those of GT-3, which were 17% and 30% lower than those of GT-15, respectively ( $P < 0.005$  in both cases) (Table II). Rosenthal's inhibitor (80 μM) diminished PLA acidic activity of GT-3, GT-13, and GT-15 by 27%, 36%, and 45%; and alkaline activity by 29%, 48%, and 54%, respectively ( $P < 0.005$ ).

TABLE II. Inhibition of trichomonads specific PLA activity by Rosenthal's inhibitor.

Strain	PLA specific activity (PLAU/mg/hr)*			
	Untreated controls		Added with Rosenthal's inhibitor	
	Acidic†	Alkaline‡	Acidic†	Alkaline‡
GT-3	215 ± 40§	166 ± 20	157 ± 30#	118 ± 14¶
GT-13	235 ± 40§	174 ± 42	152 ± 25¶	90 ± 4¶
GT-15	244 ± 40	237 ± 4	134 ± 22¶	109 ± 9¶

\* P30 preparations, having 200 µg of protein, were incubated for 1 hr at pH 6.0 or for 2 hr at pH 8.0 in the presence or absence of 80 µM Rosenthal's inhibitor. Specific PLA activity was expressed as Units of PLA (PLAU) per milligram of protein for 1 hr incubation at 36.5°C. Data correspond to averages ± SE of 3 experiments in triplicate.

† Assayed at pH 6.0.

‡ Assayed at pH 8.0.

§  $P < 0.005$  with respect to the acidic specific activity of GT-15.

||  $P < 0.005$  with respect to the alkaline specific activity of GT-15.

#  $P = 0.11$  with respect to the acidic specific activity of GT-15.

¶  $P < 0.005$  with respect to the specific activity of preparations from the correspondent strain that were not added with Rosenthal's inhibitor.

### Ultramicroscopic appearance of P30

When observed by transmission electron microscopy, P30 exhibited hydrogenosomes, which are characteristic for this species, in addition to vesicles and vacuoles.

### DISCUSSION

In this study we have shown that hemolytic activity in rat and human erythrocytes TTE and P30 was time and dose dependent at pH 6.0 and pH 8.0. Rat blood cells were significantly more susceptible to hemolysis than were human erythrocytes.

The strikingly lower specific hemolytic activity of TTE than that of P30 at both pH values suggests that TTE possesses strong inhibitors and that both the alkaline and the acidic PLA-hemolysins of these parasites require activation. In our study this activation could have occurred during acquisition of P30, as it did with the hemolytic activity of *E. histolytica* (Said-Fernández and López-Revilla, 1982).

All trichomonad hemolytic activity was localized in P30, which is rich in membranes, hydrogenosomes, vesicles, and vacuoles. This result strongly suggests that trichomonad hemolytic factors are associated with the plasma membrane or vesicles inasmuch as hydrogenosomes and vacuoles have no hemolytic activity, as far as we know. Thus, hemolysins contained in P30 could contribute to contact-dependent cytolysis, as has been proposed previously (Gilbert et al., 2000).

Hemolytic activity of *T. vaginalis* was dependent on pH. All 3 strains tested in this study showed 2 peaks of maximum hemolytic activity, one at pH 6.0 and the other at pH 8.0. This indicates that trichomonads have both acidic and alkaline hemolysins. P30 from GT-3, GT-13, and GT-15 have both alkaline and acidic PLA activities, causing the hemolytic effect to be faster and stronger at pH 6.0 than at pH 8.0. In addition, trichomonad hemolytic activity showed a clear dependence on  $Ca^{2+}$ .

PLA enzymes showing strong hemolytic activity have been identified and characterized in diverse parasite protozoa. These enzymes along with *T. vaginalis* hemolytic activity share their dependence on  $Ca^{2+}$  and pH (Oppenhaus and VanRoy, 1982;

Dennis, 1983; Said-Fernández and López-Revilla, 1988; Poirriez et al., 1995; Vargas-Villarreal et al., 1995, 1998). Trichomonad PLA activity assayed at the same pH values (6.0 and 8.0) in the presence of 1 mM  $Ca^{2+}$  was detected in all 3 trichomonad strains included in the current study. Specific hemolytic and PLA activities were lower in GT-3 than in GT-13 and GT-15 ( $P < 0.05$ ). GT-3 is also less cytopathogenic than GT-13 and GT-15 (González-Robles et al., 1995). By analyzing the association of the specific acidic hemolytic activity with the specific acidic PLA activity and that of the specific alkaline hemolytic activity with the specific alkaline PLA activity of GT-3, GT-13, and GT-15, we found very high positive correlation coefficients ( $r = 0.99$  in both cases). Thus, alkaline and acidic hemolytic activities and alkaline and acidic PLA activities in *T. vaginalis* are statistically related to each other and to the cytopathogenicity of this species.

We also analyzed the effect of Rosenthal's inhibitor on both specific hemolytic and specific PLA activities. In all the 3-strain preparations, and at both pH 6.0 and pH 8.0, PLA and hemolytic activities were blocked by Rosenthal's inhibitor. Nevertheless, under the same experimental conditions, PLA activity was less inhibited than the hemolytic effect. Rosenthal's inhibitor is an analog of phosphatidylcholine, a natural substrate of phospholipase enzymes (Rosenthal and Geyer, 1960), and is highly specific for PLA enzymes (Vargas-Villarreal et al., 1991). In our experience, Rosenthal's inhibitor is strikingly less hemolytic than another well-known PLA inhibitor, 1-11-carboxyundecyl-2-hexadecyl-L-1-glycerol-3-phosphatidylcholine (Roch and Snyder, 1975). This strongly suggests that hemolytic activity is at least partially due to PLA enzymes. As noted above, Rosenthal's inhibitor produced a lower inhibition on PLA activity than that observed in hemolytic activity. This could be due to the fact that phospholipases are not direct cytolysins. In the first step of their hemolysis mechanism, phospholipases hydrolyze phospholipids from the cell surface, but hemolysis does not occur until a sufficient quantity of free fatty acids and phospholysoderivates (phospholipid hydrolysis products) have accumulated. These PLA products act as detergents on the cell membrane and stimulate and potentiate PLA activity. Thus, the hemolytic effect of these enzymes is due, in fact, to the triple action of PLA activity and its 2 detergent products (Dennis, 1983), and blocking the enzyme inhibits the production of all 3 hemolysins. We postulate that the 27–54% inhibition of PLA activity, shown as the effect of Rosenthal's inhibitor, was enough to stop a critical quantity of free fatty acids and phospholysoderivates from being accumulated, thereby blocking the hemolytic effect of PLA enzymes.

We did not observe 100% hemolysis inhibition under any experimental condition. This result could be due to the presence of other hemolysins working under the same experimental conditions as those used in this study or to the fact that Rosenthal's inhibitor is not 100% effective in blocking trichomonad PLA activity.

The remaining hemolytic activity in trichomonad preparations treated with Rosenthal's inhibitor is hardly attributable to the trichomonad pore-forming proteins described by Fion et al. (1993, 1996), as long as Fion and his colleagues observed the maximum hemolytic activity of pore-forming protein at pH 5.6, whereas under our assay conditions, the maximum hemolytic activity occurred at pH 6.0 and pH 8.0. Moreover, in our study



the trichomonad hemolytic activity assayed at pH 5.6 was 25% lower than that at pH 6.0, and at pH 8.0 the hemolysis produced by the pore-forming protein was null. On the other hand, the effect of the pore-forming protein does not depend on  $Ca^{2+}$ , as was seen in hemolytic and PLA activities.

We conclude that *T. vaginalis* alkaline and acidic hemolytic activities depend, at least partly, on alkaline and acidic PLA, respectively. Alkaline and acidic PLA need to be isolated and further characterized to investigate whether these enzymes are relevant in the cytolytic mechanism of nucleated cells, particularly cells from vaginal mucosa. These PLA pore-forming proteins and perhaps other hemolysins could make up a cytolytic mechanism involved in the virulence of this species, as it does in several other parasitic protozoa.

#### ACKNOWLEDGMENTS

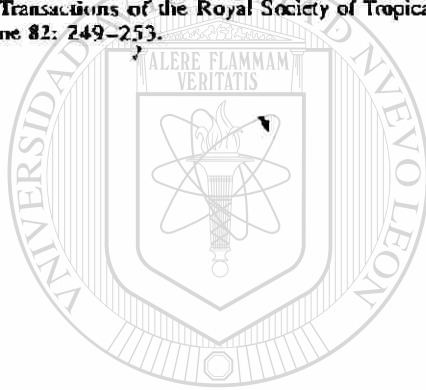
We thank Professor Robert M. Chandler Burns for his critical reading of our manuscript, Dr Fernando Anaya, from the Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Gto, México, for the generous gift of *T. vaginalis* strains GT-3, GT-13, and GT-15, Leticia Navarro Marmolejo Q.FB. for her technical assistance, and Antonio Luna de la Rosa for artwork.

#### LITERATURE CITED

- ALDERETE, J. E., L. KASMA, E. D. METCALFE, AND G. E. GARZA. 1986. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonad virulence determinants. *Infection and Immunity* 53: 285-293.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A., L. AVILA-GONZÁLEZ, C. BECERRIL-GARCÍA, L. V. FATEL-FACENDA, J. ORTEGA-LÓPEZ, AND R. ARROYO. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* 28: 193-202.
- ARROYO, R., AND A. D. ALDERETE. 1995. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Archives of Medical Research* 26: 279-285.
- BARBOUR, S. E., AND F. MARCIANO-CABRAL. 2001. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta* 1530: 123-133.
- BOZNER, P., AND P. DEMES. 1991. Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type. *Parasitology* 102: 113-115.
- BURGESS, D. E., K. F. KNOBLOCK, T. DAUGHERTY, AND N. P. ROBERTSON. 1990. Cytotoxic and hemolytic effects of *Trichomonas foetus* on mammalian cells. *Infection and Immunity* 58: 3627-3632.
- CASTRO-GARZA, J., E. ANAYA-VELÁZQUEZ, S. SAID-FERNÁNDEZ, AND M. T. GONZÁLEZ-GARZA. 1996. Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEMPS and TYI-S-33 media. *Archives of Medical Research* 27: 567-569.
- DAILEY, D. C., T.-H. CHANG, AND J. F. ALDERETE. 1990. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101: 171-175.
- DE CARLI, G. A., R. BRASSEUR, A. C. DA SILVA, A. WENDORFF, AND M. ROTT. 1996. Hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 107-110.
- , M. ROTT, A. C. DA SILVA, AND A. WENDORFF. 1994. Hemolytic activity of various strains and clones of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas suis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 36: 207-211.
- , A. C. DA SILVA, A. WENDORFF, AND M. ROTT. 1996. Lysis of erythrocytes by *Trichomonas gallinae*. *Avian Diseases* 40: 228-230.
- DEMETS, E. A. 1983. Phospholipases. In *The enzymes*, P. Boyer (ed.), Academic Press, New York, New York, p. 307-353.
- DIAMOND, L. S., D. HARLOW, AND C. C. CUNNINGHAM. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba* spp. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 431-432.
- DIAS FILHO, B. P., M. BENCHIMOL, A. F. ANDRADE, J. ANGLUSTER, AND W. DE SOUZA. 1999. Purification and immunocytochemical localization of neuraminidase from *Trichomonas foetus*. *Parasitology* 118: 17-25.
- FERRANTE, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasitic Immunology* 13: 31-47.
- FIORI, P. L., P. RAPPELLI, M. F. ADDIS, A. SECHI, AND P. CAFFUCCINELLI. 1996. *Trichomonas vaginalis* hemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microbial Pathogenesis* 20: 109-118.
- , A. M. ROCCHIGIANI, AND P. CAFFUCCINELLI. 1993. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: Evidence of functional pore formation on red cell membranes. *FEMS Microbiology Letters* 109: 13-18.
- GERMAIN, M., M. A. KROHN, S. L. HILLIER, AND D. A. ESCHENBACH. 1994. Genital flora in pregnancy and its association with intrauterine growth retardation. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2162-2168.
- GILBERT, R. O., G. ELIA, D. H. BEACH, S. KLAESSING, AND B. N. SINGH. 2000. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. *Infection and Immunity* 68: 4200-4206.
- GOLDSTEIN, I. J., AND R. D. GILLEN. 1986. Isolation and chemical properties of the lectins. In *The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine*, L. E. Leiner, N. Sharon, and I. J. Goldstein (eds.), Academic Press, New York, New York, p. 103-115.
- GONZÁLEZ-GARZA, M. T., J. CASTRO-GARZA, D. E. CRUZ-VEGA, I. VARGAS-VILLARREAL, P. CARRANZA-ROSALES, B. D. MATA-CÁRDENAS, L. SILLER-CAMPOS, AND S. SAID-FERNÁNDEZ. 2000. *Entamoeba histolytica*: Diminution of Erythrophagocytosis, phospholipase A<sub>2</sub> and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. *Experimental Parasitology* 96: 116-119.
- GONZÁLEZ-ROBLES, A., A. LÁZARO-HALLER, M. ESPINOZA-CASTELLANO, E. ANAYA-VELÁZQUEZ, AND A. MARTÍNEZ-PALOMO. 1995. *Trichomonas vaginalis*: Ultrastructural basis of the cytopathic effect. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 641-651.
- KRYVAVAC, Z. F. 1992. Pre-existing chronic intraepithelial trichomonas invasion with consecutive immunodepression enables progression of human immunodeficiency virus: a new concept of acquired immunodeficiency syndrome pathogenesis. *Medical Hypothesis* 39: 225-228.
- LONG-KRUG, S. A., J. K. FISHER, M. R. HYGINTH, AND J. I. RAYDIN. 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: Description and subcellular localization. *Journal of Infectious Diseases* 152: 536-541.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-273.
- MATA-CÁRDENAS, B. D., I. VARGAS-VILLARREAL, L. NAVARRO-MARMOLEJO, AND S. SAID-FERNÁNDEZ. 1998. Axenic cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a serum-free medium. *Journal of Parasitology* 84: 638-639.
- MOSKOWITZ, M. O., AND B. C. MELINGER. 1992. Sexually transmitted diseases and their relation to male infertility. *Urology Clinics in North America* 19: 35-45.
- NAGAO, E., A. YAMAMOTO, T. IGARASHI, N. GOTO, AND R. SASA. 2000. Two distinct hemolysins in *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiology and Immunology* 15: 355-359.
- OPFERDOES, F. R., AND J. VANROY. 1982. The phospholipase of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and cultured procyclics. *Molecular Biochemistry Parasitology* 5: 309-319.
- PADILLA-VACA, E., AND E. ANAYA-VELÁZQUEZ. 1997. Biochemical properties of a neuroaminidase of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 83: 1001-1006.
- PODUK, F. E., M. MORA DE PODUAK, AND W. A. GARDNER JR. 1993. Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Gynecology and Obstetrics* 69: 35-40.
- POIRRIEZ, J., G. SNOUOU, AND D. BLANCKAERT. 1985. Multiple invasion of red blood cell by *Plasmodium vivax* in vitro. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 509-510.
- RAYDIN, J. L. 1988. Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*. L. H. Diamond, R. L. Guerrant, G. R. Healy, R. A. Salata,



- J. A. Walsh, and J. L. Ravdin (eds.). Churchill Livingstone, London, U.K., p. 232-263.
- RENDON-MALDONADO, J. G., M. CASTELLANO-ESPINOZA, A. GONZALEZ-ROBLES, AND A. MARTINEZ-PALOMO. 1998. *Trichomonas vaginalis*: In vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Experimental Parasitology* 89: 241-250.
- ROCH, C. O., AND E. SNYDER. 1975. Rapid purification of phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus adamanteus* venom by affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 250: 2564-2566.
- ROSENTHAL, A. F., AND R. P. GEYER. 1960. A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. *Journal of Biological Chemistry* 235: 2202-2206.
- SAID-FERNÁNDEZ, S., AND R. LÓPEZ-REVILLA. 1982. Subcellular distribution and stability of the major cytolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Zeitschrift fuer Parasitenkunde* 67: 249-259.
- \_\_\_\_\_, AND \_\_\_\_\_. 1988. Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection and Immunity* 56: 874-879.
- \_\_\_\_\_, J. VARGAS-VILLARREAL, J. CASTRO-GARZA, B. D. MATA-CÁRDENAS, L. NAVARRO MARMOLEJO, G. LUZANO-GARZA, AND H. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ. 1988. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 249-253.
- SKIPSKY, J. P., AND M. BARCLAY. 1969. Thin-layer chromatography of lipids. In *Methods in enzymology*, J. M. Lowenstein (ed.). Academic Press, New York, New York, p. 530-599.
- VARGAS-VILLARREAL, J., J. J. MARTÍN-POLO, E. KEYNAUD, AND A. C. ALAGÓN. 1991. A new affinity adsorbent for the purification of phospholipase A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> from animal venom. *Toxicon* 29: 119-124.
- \_\_\_\_\_, H. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, J. CASTRO-GARZA, B. D. MATA-CÁRDENAS, M. T. GONZÁLEZ-GARZA, AND S. SAID-FERNÁNDEZ. 1995. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L<sub>1</sub> activities. *Parasitology Research* 81: 320-323.
- \_\_\_\_\_, A. OLVERA-RODRÍGUEZ, B. D. MATA-CÁRDENAS, H. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S. SAID-FERNÁNDEZ, AND A. ALAGÓN-CASO. 1998. Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A<sub>2</sub>. *Parasitology Research* 84: 310-314.
- WAINZELBAUM, M., E. ISOLA, S. WILKOWSKY, J. J. CANNATA, AND J. FLORIN-CHRISTENSEN. 2001. Lysosomal phospholipase A<sub>1</sub> in *Trypanosoma cruzi*: An enzyme with a possible role in pathogenesis of Chagas' disease. *Biochemistry Journal* 355: 765-770.
- YARLETT, N., B. GOLDBERG, M. A. MOHARRAMI, AND C. J. BACCHI. 1993. *Trichomonas vaginalis*: Characterization of ornithine decarboxylase. *Journal of Biochemistry* 293: 487-493.
- ZHANG, Z. F., AND C. B. BEGG. 1994. *Trichomonas vaginalis*, a cause of cervical neoplasia?. Results of a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology* 23: 682-690.

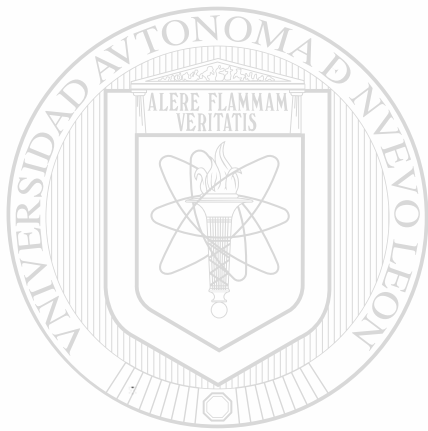


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



