

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 protozooario 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 $CD4^+$ T_H1 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 $CD4^+$ T_H1 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 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 α_1 , α_2 y α_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 β_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 α y la β . 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 α como la β 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 α_1 y α_2 y en los de clase II por los dominios α_1 de la cadena α y β_1 de la cadena β .

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 β_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 $CD8^+$ (*killer*), y como consecuencia de ello esta célula se activa y destruye a las células infectadas. De esta manera se restringe la 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 $CD4^+$ (*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 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 los 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 epítipo, el heterodímero

inmediatamente lo captura y lo fija en el canal que forman sus dominios α_1 y β_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-quinazas, entre ellas la proteína *Fyn* (que forma parte del complejo CD3, y otras proteínas, entre ellas una fosfolipasa C- γ , 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 γ (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). 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_2O_2) 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 patogenia 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 anti-amibianos 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 timectomizados 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 (Ghadirian , 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⁺ 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⁺ 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- α , 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- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) 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 linfocinas INF- γ y TNF- α son capaces de producir NO *in vitro* (Denis 1989; Lin 1992 ; Lin 1994).

Cuando 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 trofozoítos de *E. histolytica* inducen la activación de macrófagos y éstos son capaces de matar a trofozoítos 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⁺ T_H1 (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 trofozoítos. 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- α e INF- γ (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 protozario 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 trofozoítos 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⁺ 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- γ 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.

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, Johns 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 °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
KH ₂ PO ₄	0.6 g
K ₂ 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°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 × 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 °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 × g, por 15 min, a 4°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°C . Antes de usarlo, el suero se descomplementó por calentamiento a 56°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°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 megaohms ($M\Omega$). 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 ₂ HPO ₄	2.8 g
KH ₂ PO 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 μ l 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°C hasta su uso.

2.4.7.- Solución de [³H- Timidina] ([³H]-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 [³H]-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 nafdietanolamino 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 H₃ PO₄ 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 Na₂CO₃ 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 IICI 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 Naftiletilendiamida (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 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 5×10^3 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 $600 \times g$. 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 $600 \times g$. 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°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 μl 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 μl de HCl 1N y se agitó durante un minuto y luego se almacenó en los mismos tubos a -70°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 (μ l)	Agua desionizada
0 μ l	200 μ l
5 μ l	195 μ l
10 μ l	190 μ l
20 μ l	180 μ l
40 μ l	160 μ l
60 μ l	140 μ l
80 μ l	120 μ 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 μ 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 $400 \times g$ 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 $400 \times g$ 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.

2.5.5 Activación de linfocitos de sangre venosa periférica utilizando antígeno ambiental.

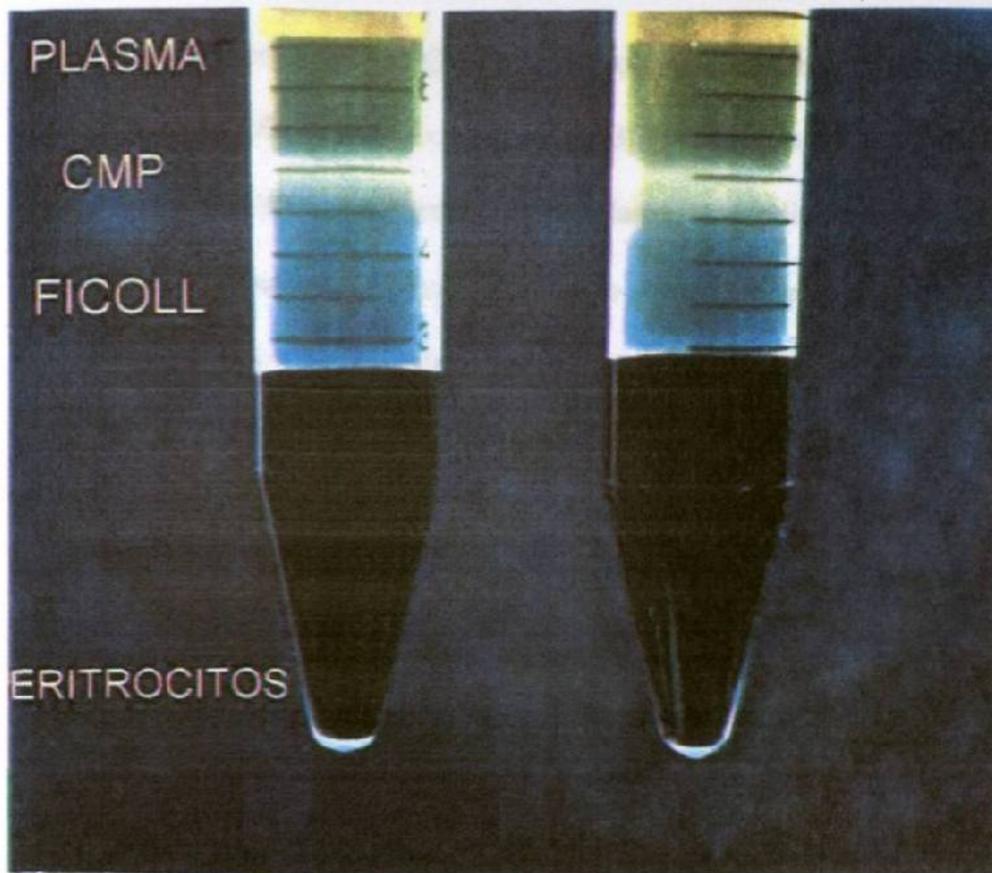


Figura 1.- Se muestran tubos cónicos de polipropileno estériles de 15 ml de capacidad y con tapón de rosca posterior a centrifugar durante 10 min a $400 \times g$. Se observa en la parte superior el plasma, luego una delgada capa conteniendo las células mononucleares periféricas, enseguida una capa traslúcida 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 Tripano 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 amibianos.

Se resuspendieron las CMP en un volumen suficiente de medio RPMI adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF) para ajustar su concentración a 1×10^6 células/ml. De esta preparación se inocularon, en condiciones de asepsia, 100 μ 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 μ l de medio RPMI con 10% de SFB. Los testigos positivos, recibieron 10 μ l de fitohemaglutinina (FHA, 10 mg/ml) en 90 μ 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 CO₂ al 5% por 72 h. Se agregaron a cada pozo 10 μ l de [³H-TdR] (1 μ Ci/ 10 μ 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 utilizados 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°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°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 ^3H 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 μl de una suspensión fresca de CMP como se hizo con los experimentos de incorporación de [^3H -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 μ l de medio RPMI adicionado con 10% de SFB. El grupo 2 se adicionó con 100 μ l de LPS (10 mg/ml) ó 100 μ 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 μ g- 4 mg de proteínas totales. Las microplacas se incubaron a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5% por 12-72 h. Se desecharon los sobrenadantes y a cada pozo se le agregaron 200 μ 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; Thitheradge, 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 μ M (concentraciones 5-1). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 μ l de agua bidestilada y 100 μ l (por duplicado) de las soluciones de nitritos 5 a 1 por duplicado. En la misma placa se colocaron, por triplicado 100 μ 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 μ 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 A₅₄₅ 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 μ l por pozo de una suspensión de CMP en medio RPMI + 10% SBF (1×10^6 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 μ l de medio RPMI mas 10% de SFB. A los grupos 2-6 y del 11 al 16 se les agregaron 80 μ 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 μ l de LPS (10 mg/ml); a los grupos 6 y 10 se les agregaron 10 μ l de LPS (10 mg/ml) mas 10 μ l de INF- γ (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 μ l de LPS (10 mg/ml) mas 30 μ l de INF- γ ; 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 μ l de LPS (10 mg/ml) mas 50 μ l de INF- γ ; 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 μ l de INF- γ (10,000 unidades/ml); a los grupos 12 y 18 se agregaron únicamente 30 μ l de INF- γ ; a los grupos 15 y 21 se agregaron únicamente 30 μ l de INF- γ (ver tabla 2). Todos los pozos se ajustaron a un volumen de 230 μ l por pozo utilizando medio RPMI + 10% SBF. Las cajas de cultivo se incubaron durante 12 horas a 37° C en atmósfera de CO² al 5%. Se cambió el medio usado por 200 μ 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- γ 100 U	Grupo 9 Medio RPMI LPS	Grupo 10 Medio RPMI LPS IFN 100 U	Grupo 11 Medio RPMI ATA IFN- γ 300 U LPS	Grupo 12 Medio RPMI ATA IFN- γ 300 U
Grupo 13 Medio RPMI ATA LPS IFN- γ 300 U	Grupo 14 Medio RPMI ATA IFN- γ 500 U LPS	Grupo 15 Medio RPMI ATA IFN- γ 500 U	Grupo 16 Medio RPMI ATA LPS IFN 500 U	Grupo 17 Medio RPMI IFN- γ 300 U LPS	Grupo 18 Medio RPMI IFN- γ 300 U
Grupo 19 Medio RPMI LPS IFN- γ 300 U	Grupo 20 Medio RPMI IFN 500 U LPS	Grupo 21 Medio RPMI IFN- γ 500 U	Grupo 22 Medio RPMI LPS IFN- γ 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 μ l de ATA-soluble (a una concentración de 9 mg/ml). A 5 pozos con cultivos de CMP se les agregaron 20 μ 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 CO₂, se aspiraron los sobrenadantes, se agregaron 200 μ 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 ambientales 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 1×10^6 células/ml. Se inoculó esta suspensión en micorplacas de 96 pozos (100 μ l 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 μ l 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 ambiental digerido con tripsina (AADT) en forma soluble. Las microplacas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% por 12 h. Se aspiraron los sobrenadantes y se cambió el medio de cultivo por 200 μ l 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 μ m y 3.9 \times 150 mm además de una guarda columna (Waters), modelo Sentry C18, con malla de 5 μ 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 μ l. El flujo se mantuvo constante a 1ml por min. 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 μ 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 μ l de todas las fracciones obtenidas por

HPLC, agregando de 90-50 μl de medio RPMI adicionado con SFB hasta completar 100 μl 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 CO_2 al 5%, por 12 h. Luego se cambió el medio de cultivo por 200 μl 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 μl de 1×10^6 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 μl 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 μl 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 CO₂. 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 1×10^6 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 1×10^6 amibas/ml 50 µl a cada pozo. Se incubó a 37 °C por 30 min en atmósfera de CO₂ 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 S1-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 ambiental

3.1.1 Incorporación de [³H]-TdR inducida por antígeno ambiental 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 [³H]-TdR) 1.9 veces superior a los testigos no tratados ($p < 0.01$), y similar a la inducida por fitohemaglutinina de germen de trigo ($p > 0.05$).

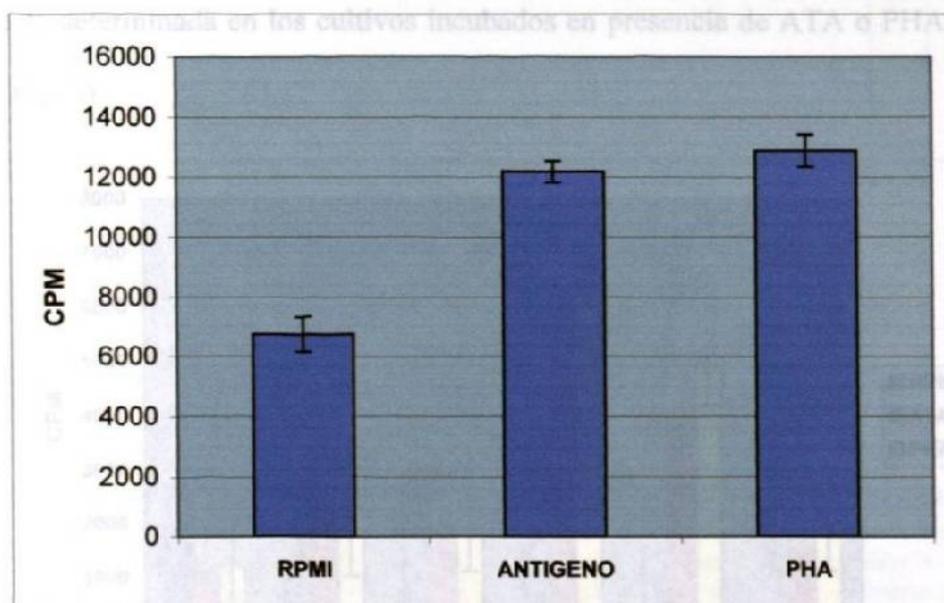


Figura 2.- Incorporación de [³H]-TdR por CMP en presencia de ATA particulado. En microplacas de 96 pozos se mezclaron 100 μ l de una suspensión de CMP con una densidad celular de 1×10^6 células/ml y 100 μ l (40 mg de proteínas/ml) de ATA particulado, 100 μ l de medio RPMI más 10% de SBF ó 100 μ l de fitohemaglutinina (PHA)(10 mg/ml). Las preparaciones se incubaron 72 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A todos los pozos se les agregaron 10 μ l de [³H]-TdR] (1 μ 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 [³H]-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 [³H]-TdR (1.43 veces). A las 4, 8 y 24 h de incubación no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de [³H]-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).

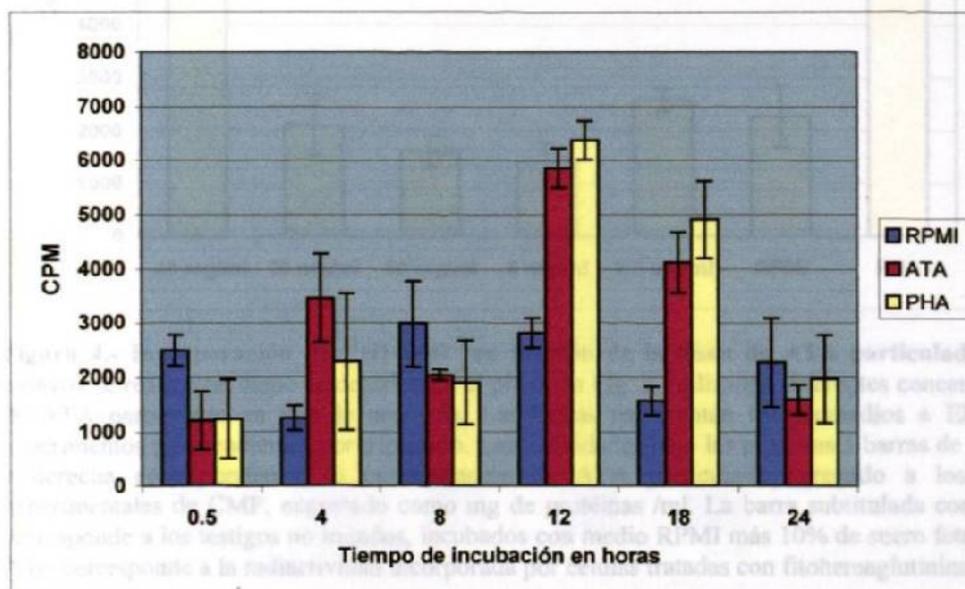


Figura 3.- Relación temporal de la incorporación de [³H]-TdR inducida por ATA particulado en cultivos de CMP. Estos ensayos se realizaron como se describe en el pie de la Fig. 2, pero en vez de incubar las preparaciones en un solo tiempo después de agregar la [³H]-TdR se usaron varios tiempos de post-incubación. 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 [^3H]-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).

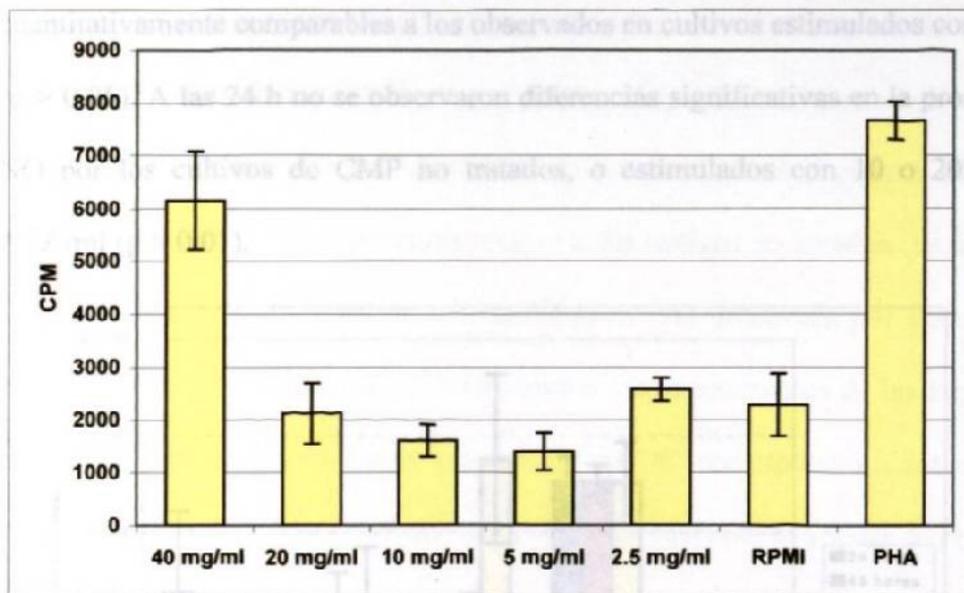


Figura 4.- Incorporación de [^3H]-TdR en función de la dosis de ATA particulado. Estos ensayos se realizaron como se describe en el pie de la Fig. 2, utilizando diferentes concentraciones de ATA particulado en vez de una sola. Las barras representan los promedios \pm EE de tres experimentos independientes 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 mg/ml ($p < 0.01$). La mayor la producción de NO se observó en cultivos tratados con 10 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 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 mg de ATA/ ml ($p > 0.01$).

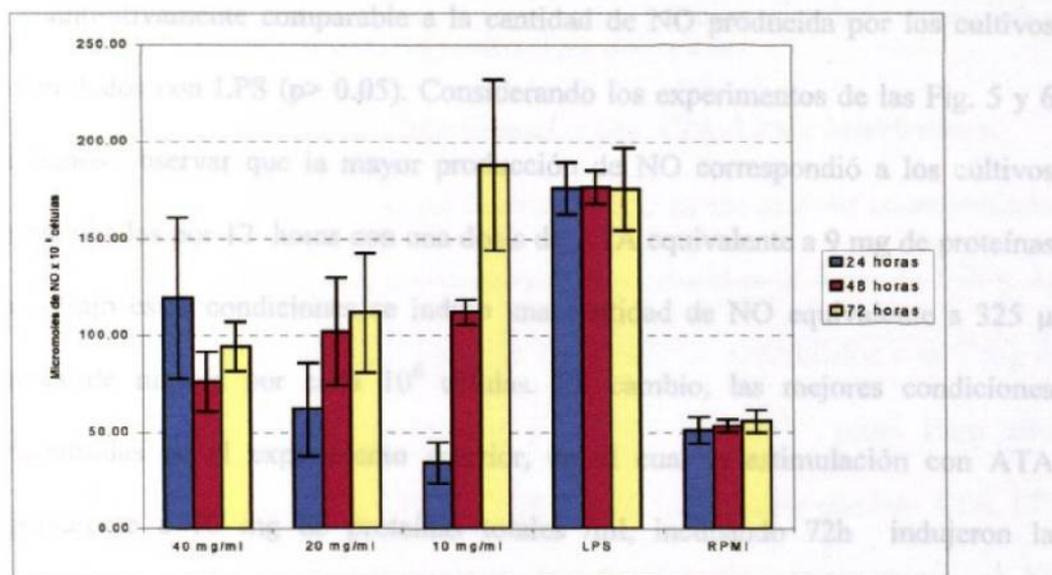


Figura 5.- Efecto de la dosis y el tiempo de incubación sobre la producción de NO. En pozos de 200 μl se mezclaron 100 μl de una suspensión celular 1×10^6 CMP y 100 μl de medio RPMI con 10% de SBF o 100 μl de lipopolizacárido [(LPS) (10 mg/ml)] o 100 μl de diferentes concentraciones del ATA particulado (expresadas bajo las primeras 3 barras como 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 μ 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 μ moles de nitritos o sea 1.39 veces menos ($p > 0.05$).

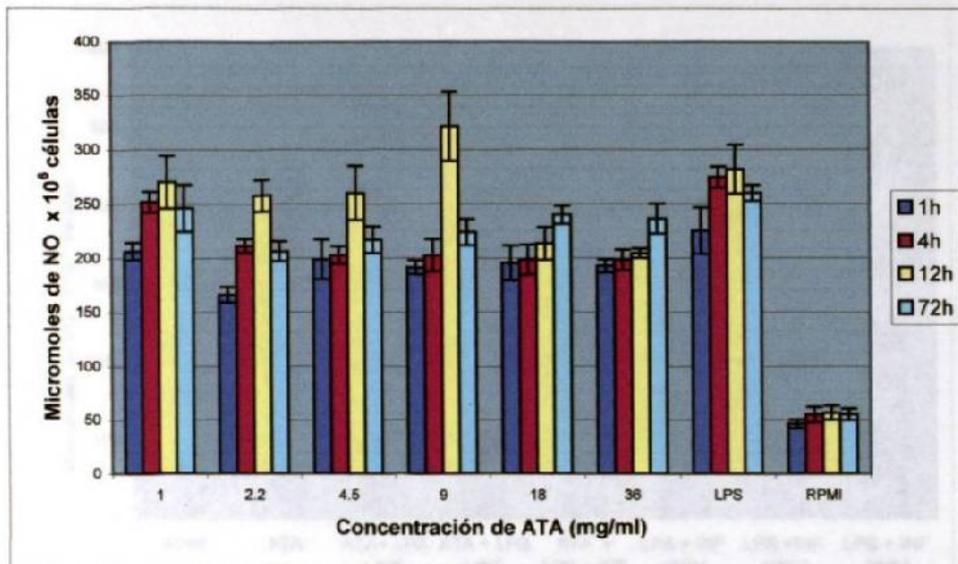


Figura 6.- Relación temporal y efecto de diferentes concentraciones de ATA para inducir producción de NO. Corresponden a la producción de NO por cultivos de CMP tratados con dosis variables de 1 a 36 mg/ml de ATA y pre-incubados por tiempos variables de 1-72 h con el antígeno. Se aspiraron los sobrenadantes, 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- γ .

La Fig 7 muestra que la producción de NO en los cultivos co-estimulados con ATA, LPS e INF- γ fue inversamente proporcional a la dosis de INF- γ . 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- γ 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 ($p < 0.01$).

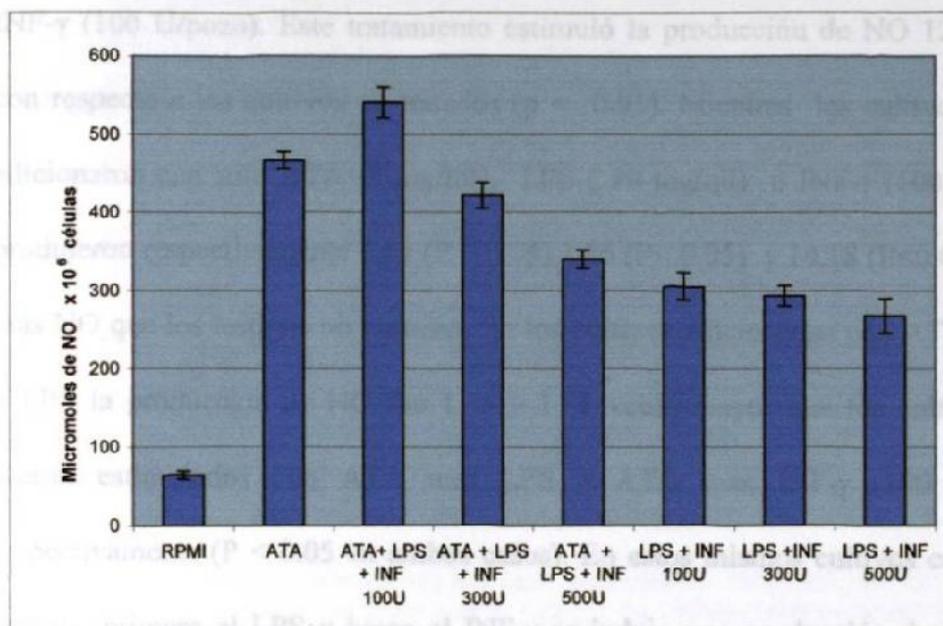


Figura 7.- Co-estimulación de ATA con LPS e INF- γ . Estos experimentos se realizaron como en el ensayo anterior induciendo la producción de NO utilizando 100 μ l por pozo de la suspensión de CMP. La primera barra, de izquierda a derecha representa al testigo negativo al cual se incubó únicamente con 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- γ por pozo (INF). Las últimas tres barras muestran la inducción de producción de NO por LPS e INF- γ (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- γ solamente, pero se incluyeron como testigos cultivos de CMP tratados únicamente con 10 mg de LPS/ml y 100 U de INF- γ solo. También se analizó el efecto adicionar los cultivos primero con INF- γ y luego con LPS o viceversa. Los cultivos de CMP estimulados con ATA soluble, INF- γ 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- γ (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- γ (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- γ 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- γ (100 U/pozo) respectivamente ($P < 0.05$ en ambos casos). En estos mismos cultivos cuando se agregó primero el LPS y luego el INF- γ 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- γ mostraron inducción de producción de NO de 1.38 hasta 14.18 veces menor que el grupo con antígeno INF- γ y LPS y un valor de $p < 0.05$.

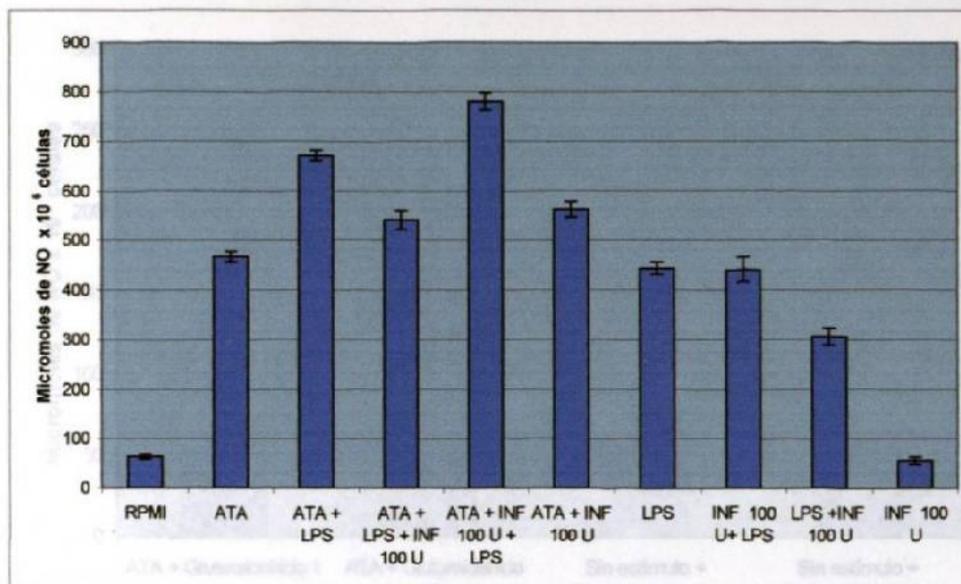


Figura 8.- Capacidad co-estimuladora del antígeno amibiano. Para estos ensayos se indujo la producción de NO como en los ensayos de la figura 7. La primera barra de izquierda a derecha representa al testigo negativo al cual se agregó únicamente RPMI + 10% de suero bovino fetal, enseguida la inducción 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- γ . Las condiciones que indujeron la mayor producción de NO fueron ATA + 100 U de INF- γ + LPS. Las últimas 5 barras muestran la producción inducida por ATA + 100 U de INF- γ , LPS solo, 100 unidades de INF- γ + LPS, LPS + 100 U de INF- γ , y 100 U de INF- γ solo. Cada barra representa el promedio \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).

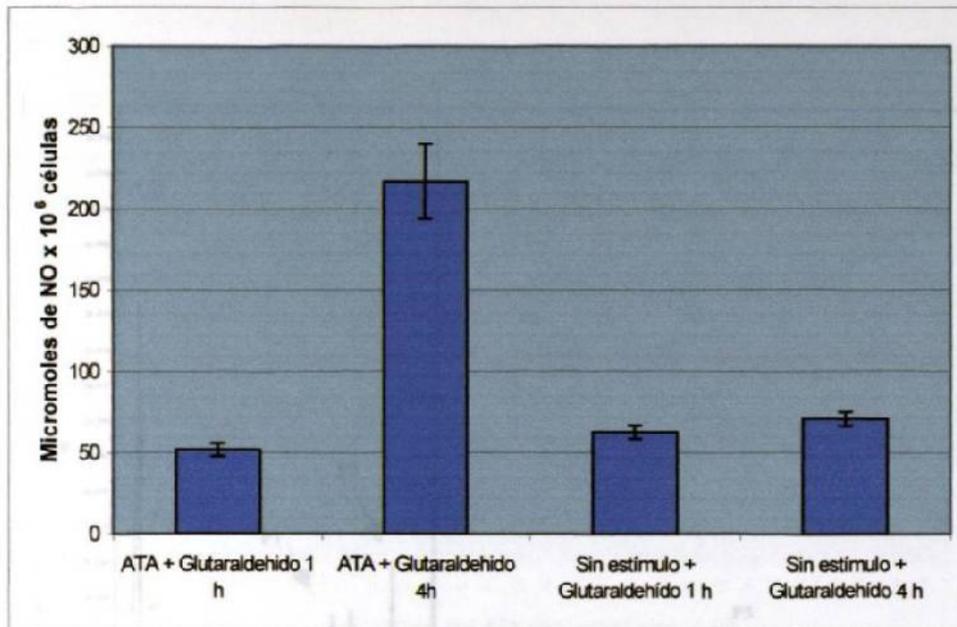


Figura 9.- Efecto del bloqueo en la presentación del antígeno sobre la producción de NO.

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 µl por pozo de ATA (9 mg/ml) y a la otra solo 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 20µl 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 ± 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).

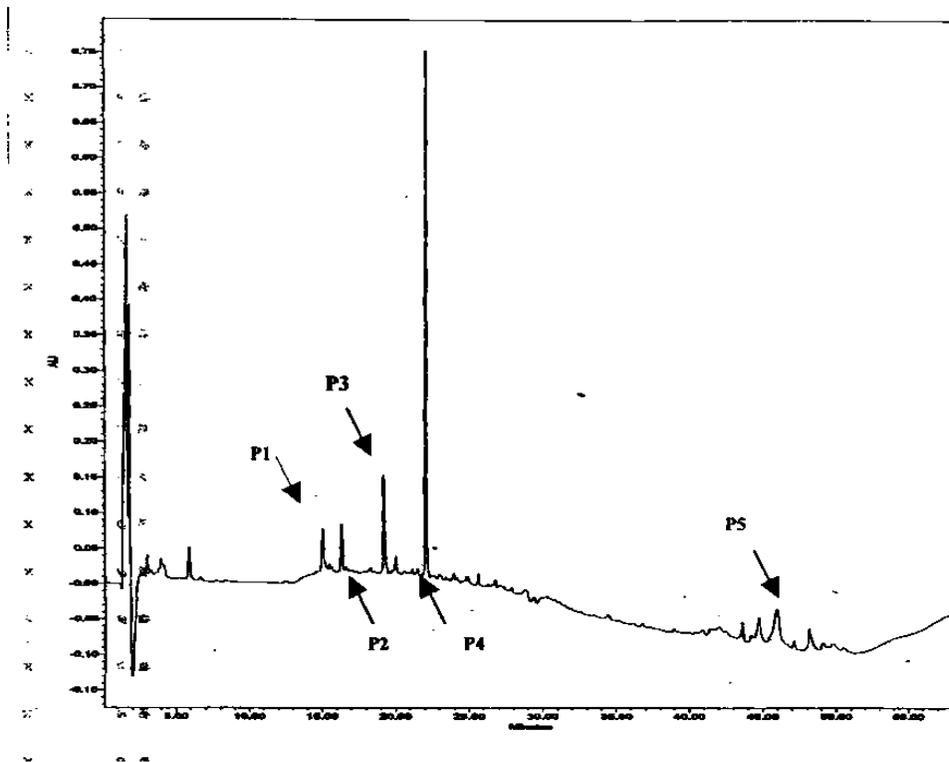


Figura 10.- Separación de fracciones del ATA por HPLC. El ATA soluble se digirió con tripsina y los péptidos se separaron mediante HPLC. Se colectaron fracciones de 1.6 ml. Los tiempos de retención y A_{220} de los 5 picos (P1 a P5) mayores fueron los siguientes: **P1**, 15.23 min, $A_{220}=0.055$ UDO,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

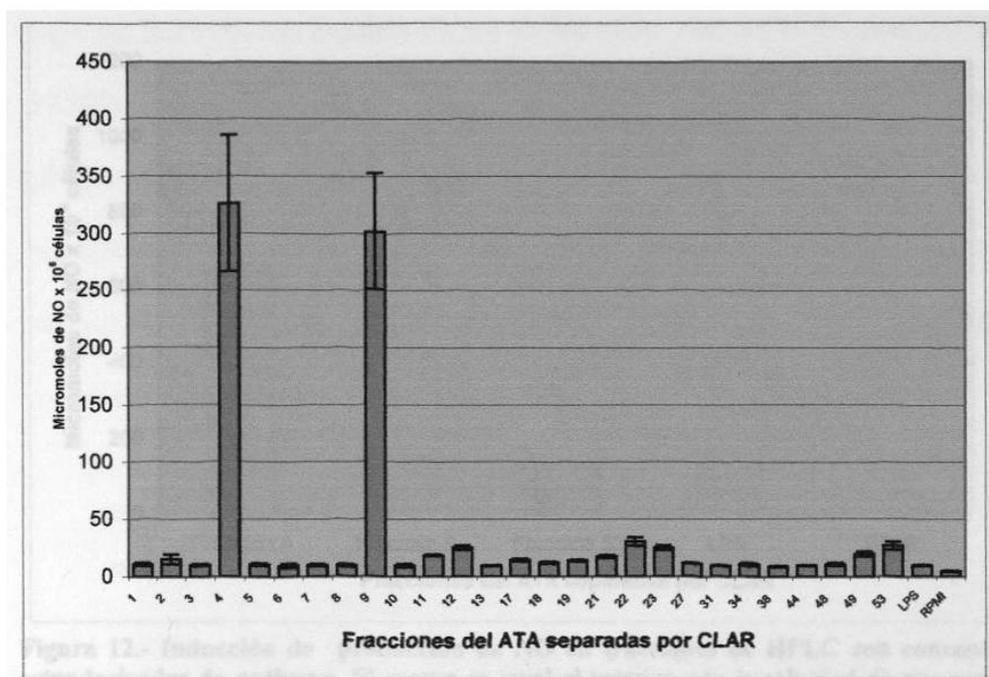


Figura 11.- Inducción de la producción de NO por las fracciones del ATA separadas por CLAR. Se indujo la producción de NO igual que en los ensayos anteriores, a cada grupo de tres pozos con excepción de los testigos se les agregaron 90 µl por pozo de cada fracción separada por HPLC más 10µl de LPS (10 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 esta 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 ($p < 0.00001$).

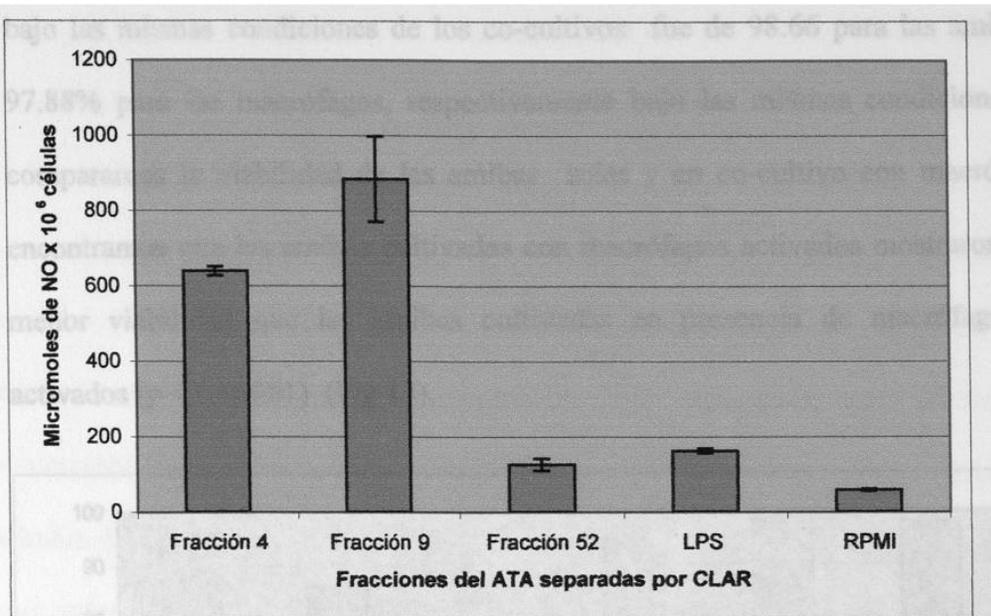


Figura 12.- Inducción de producción de NO en fracciones de HPLC con concentraciones estandarizadas de antígeno. El ensayo es igual al anterior, con la salvedad de que para realizar estos ensayos estandarizó a 8.5 mg/ml el contenido de péptidos en las fracciones (4 y 9) separados por HPLC que mostraron 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).

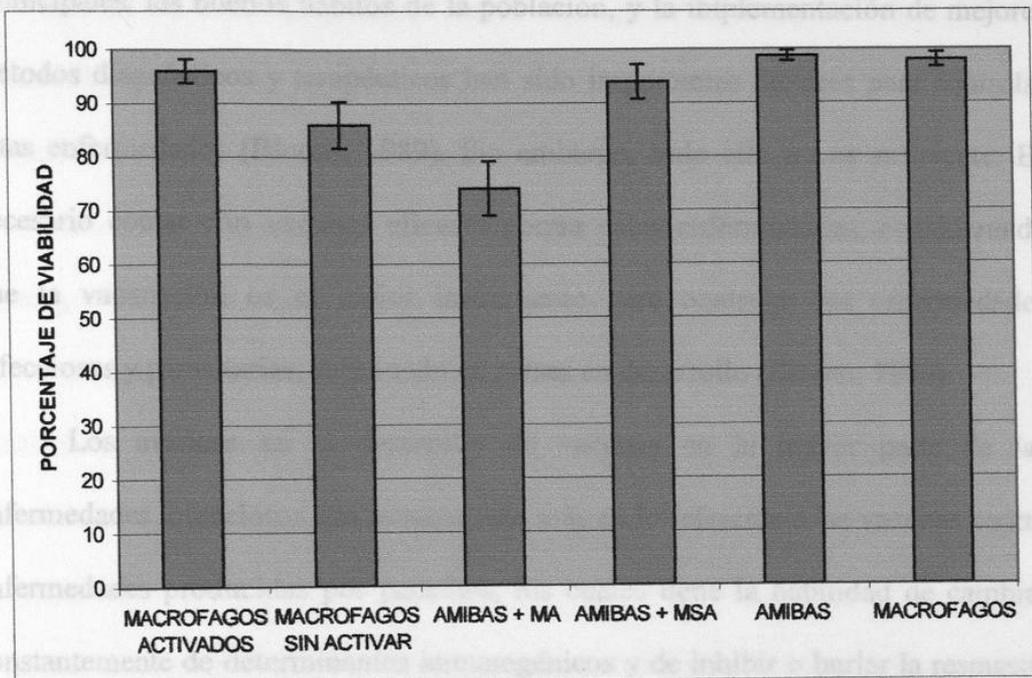


Figura 13.- Actividad citotóxica de macrófagos activados con los péptidos bioactivos sobre trofozoítos. Los cultivos de conteniendo CMP se dividieron en 2 grupos, a uno de los grupos denominado macrófagos activados (MA) se agregaron 80 μ l de una mezcla a partes iguales (V/V) de las fracciones-HPLC 4 y 9 (8.5 mg/ml) y 10 μ l de LPS (10 mg/ml). Al otro grupo llamado macrófagos sin activar (MSA) se agregaron 100 μ 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 1×10^6 amibas/ml 50 μ 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 μ l de medio RPMI fresco a MSA y para integrar el cuarto grupo denominado amibas; se agregaron a pozos vacíos 200 μ l de medio RPMI mas 10% de SBF y luego 1×10^6 amibas/ml 50 μ l a cada pozo. Se incubó a 37 °C por 30 min en atmósfera de CO₂ 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 trofozito (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- α y de INF- γ . 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 L5178Y 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⁺ y T CD8⁺ (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 [³H]-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 [³H-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