

Amibiasis hepática

Coordinador: Dr. Ruy Pérez Tamayo*

*Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

Coautores: Dr. Irmgard Montfort,* Dr. Alfonso Olivos García,* Espiridión Ramos,* Mario Nequiz,* Eusebio Tello*

*Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Los textos clásicos de patología de enfermedades parasitarias señalan que, haciendo honor a su nombre, la *Entamoeba histolytica* es el parásito con mayor capacidad para destruir los diferentes tejidos que afecta, como el intestino grueso, el hígado, el pulmón, la piel, el cerebro y otros más. Las descripciones corresponden a lesiones avanzadas y en la mayor parte de los casos se ilustran con órganos y tejidos obtenidos de autopsias. Las lesiones se caracterizan histológicamente por la presencia de numerosos trofozoítos viables, extensa necrosis y muy escasa reacción inflamatoria. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que, en la relación hospedero: parásito conocida como amibiasis invasora, el papel activo corresponde a los trofozoítos y el hospedero es víctima pasiva de los potentes mecanismos moleculares que los hacen virulentos. De hecho, ya se han señalado diferentes moléculas amibianas como responsables de la patogenicidad y hasta de la virulencia del parásito. Sin embargo, varias observaciones, algunas muy antiguas, sugieren que la relación hospedero: parásito de la amibiasis es más complicada de lo que parece. Una de ellas es la existencia de “portadores sanos”, infectados con amibas que en otros sujetos producen enfermedad y por lo tanto son patógenas; otra es que las amibas patógenas conservadas en cultivo axénico pueden perder su virulencia (medida en animales experimentales) sin modificaciones detectables en las moléculas supuestamente responsables de ella. Una tercera es que existen distintas especies animales naturalmente resistentes a *E. histolytica* patógena; de hecho, los únicos animales susceptibles de sufrir amibiasis invasora son el hombre, ciertos primates en cautiverio, el hámster y el gerbo. Con objeto de examinar con más detalle los distintos posibles componentes de la relación hospedero: parásito en la amibiasis, en nuestro laboratorio hemos realizado una serie de observaciones sobre la patogenia de la amibiasis aguda experimental, que en principio es un fenómeno menos complejo que la amibiasis invasora avanzada, tanto experimental como humana. Nuestros estudios incluyen el

análisis del papel desempeñado en el desarrollo de lesiones hepáticas agudas (tres a 168 horas) en el hámster y en la rata por las proteasas de cisterna de la amiba, por las células inflamatorias, por el complemento y por otros componentes de la inmunidad innata, por la isquemia y por factores aún no determinados pero presentes en el tejido hepático del hámster. Las observaciones *in vitro* realizadas en paralelo con los experimentos *in vivo* nos han convencido de que la amiba patógena conservada en cultivo axénico es un animal diferente a la amiba patógena invadiendo tejidos vivos, y que con toda su mayor complejidad y dificultad de análisis, los modelos *in vivo* (experimentos “sucios”) de la amibiasis son preferibles porque incluyen la participación del hospedero, que se revela como importante y hasta determinante del desarrollo de las lesiones.

INTRODUCCIÓN

La amibiasis en humanos es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario *Entamoeba histolytica* (Figura 1). Este padecimiento es de distribución mundial, tiene alta incidencia en países pobres y es la causa de aproximadamente cien mil muertes por año en el mundo.^{1,2}

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

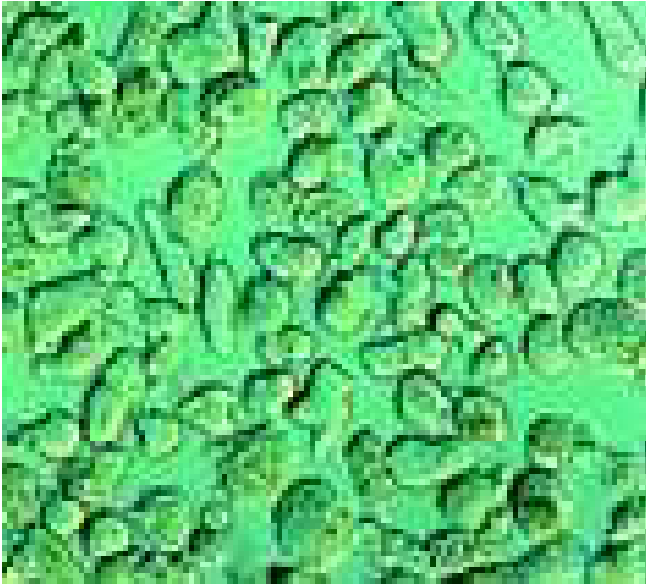


Figura 1. Trofozoítos axénicos virulentos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM-1 IMSS.

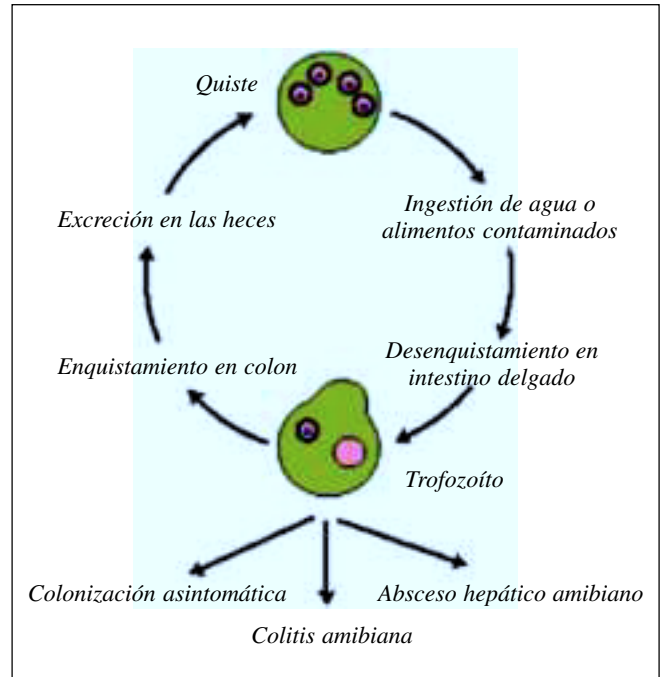


Figura 2. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en humanos (Huston, et al. 1999).

causar destrucción en otros tejidos como el cerebro, la piel y el pulmón (Figura 3).

La amibiasis causada por *Entamoeba histolytica* se caracteriza por inflamación aguda y necrosis en el intestino grueso y en otros órganos,^{4,6} y lo mismo sucede en varios modelos experimentales de la enfermedad.⁷ La frecuencia y extensión de la destrucción de tejidos en humanos y en animales experimentales justifica el nombre histolytica del parásito. Los mecanismos de daño a tejidos en la amibiasis se atribuyen, en parte, a la actividad de varias moléculas presentes en el parásito:⁸ 1)

amiboporos (proteínas formadoras de poros sin actividad enzimática), 2) fosfolipasas, 3) colagenasa, 4) adhesinas (alguna con actividad proteolítica) y (5) proteasas de cisteína (CP1-CP19;CP112).⁹ Sin embargo, los datos que apoyan el papel de cada una de estas cinco diferentes moléculas en la destrucción de tejidos no son uniformes y para algunas de ellas son indirectos. Es posible que las moléculas más ampliamente estudiadas en su

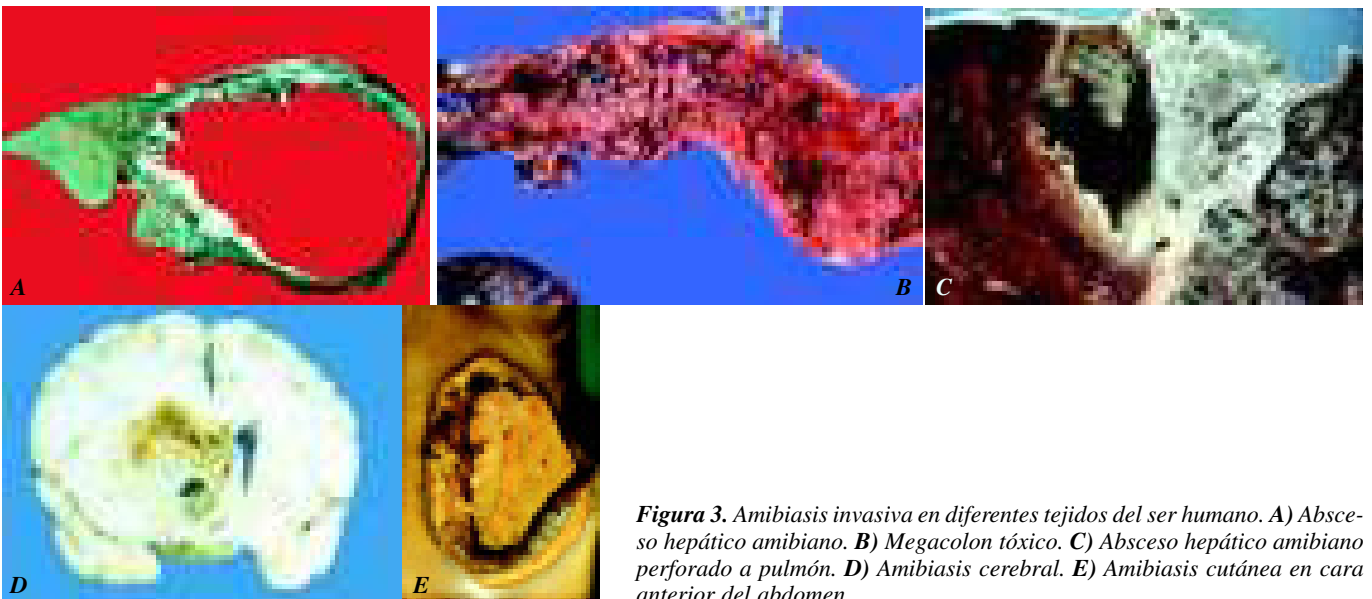


Figura 3. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. **A)** Absceso hepático amibiano. **B)** Megacolon tóxico. **C)** Absceso hepático amibiano perforado a pulmón. **D)** Amibiasis cerebral. **E)** Amibiasis cutánea en cara anterior del abdomen.

capacidad para producir daño de tejidos sean las proteasas de cisteína (CPs). Los datos que se conocen hasta la fecha pueden resumirse como sigue:

Experimentos *in vitro*

Las proteasas de cisteína purificadas tienen efecto citopático sobre monocapas de células HeLa,¹⁰ células BHK¹¹ y fibroblastos humanos, sin efecto citotóxico. El efecto citolítico sobre hepatocitos muertos de rata y hámster, causado por proteasas de cisteína de 30-kDa se bloquea con el inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64.¹² La disminución de la expresión de CP5 inducida en *E. histolytica* con ARNm antisentido se correlaciona con la disminución de fagocitosis, pero el efecto citopático y la actividad hemolítica permanecen sin cambio.¹³ La sobre-expresión de CP2 en *E. histolytica* y *E. dispar* da como resultado el incremento del efecto citopático producido por ambas especies.¹⁴

Experimentos *in vivo*

Los trofozoítos axénicos de *E. histolytica* crecidos en presencia de E-64¹⁵ o laminina,¹⁶ tienen disminuida la capacidad para producir abscesos hepáticos en ratones inmunodeficientes (SCID). Los lisados de *E. histolytica* virulenta disminuyen la resistencia eléctrica transepitelial en ciego de gerbos y este efecto es inhibido por E-64.¹⁷ La disminución de la expresión de CP5, inducida en *E. histolytica* con ARNm antisentido, se correlaciona con la disminución de la capacidad del parásito para inducir abscesos hepáticos en hámster.¹⁸ La disminución de la expresión de CP5 inducida en *E. histolytica* se correlaciona con la disminución de la inflamación, producción de IL-2 y capacidad de las amibas para convertir próIL-1 a IL-1, en intestino humano transplantado a ratones SCID.¹⁹

A pesar de que la información resumida anteriormente sugiere un papel importante para las EhCPs en el daño celular y tisular en la amibiasis, no discrimina entre un efecto proteolítico directo sobre proteínas de la matriz extracelular y un papel *permissivo* de tales enzimas, cuya función primaria podría ser preservar la viabilidad del parásito para permitir a otros mecanismos moleculares dañar células y tejidos. Se sabe que las proteasas de cisteína son capaces de disminuir la expresión de CD4 en linfocitos T;²⁰ además, las CPs son capaces de degradar receptores de macrófagos, lo que podría explicar por qué los macrófagos recuperados de abscesos hepáticos de

gerbos no están activados ni son activables por lipopolisacárido (LPS) y tienen disminuida su actividad amebicida, mientras que los macrófagos peritoneales y de bazo obtenidos del mismo animal responden rápidamente a LPS.²¹ Por otro lado, en varios experimentos *in vitro*, la inhibición de las CPs interfiere con el crecimiento y sobrevivencia de la amiba,²² excepto cuando se usa E-64.¹⁵ Las CPs están presentes en muchas especies de protozoarios^{23,24} y cuando su actividad se bloquea con inhibidores, su ciclo de vida y metabolismo nutritivo se dañan gravemente.²⁵ Todo lo anterior sugiere que probablemente las CPs desempeñan papeles esenciales en la fisiología del parásito y, por lo tanto, se requieren para su sobrevivencia.

Por otra parte, se ha estudiado la participación del hospedero en la patogenia de la amibiasis experimental. Durante las etapas tempranas del absceso hepático amibiano experimental en hámsters (AHAEH), los dos principales componentes celulares son los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y los mononucleares (*Figura 4*). Se cree que la rápida desintegración de los PMNs (con liberación de sus enzimas lisosomales) y otras sustancias son responsables, por lo menos en parte, del daño al tejido hepático.²⁶ También es posible que la isquemia generada por la inflamación²⁷ y las lesiones (causadas por el parásito, hospedero o ambos) permitan la sobrevivencia de la amiba, creándole un microambiente favorable de baja tensión de oxígeno y evitándole el contacto con el complemento.

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

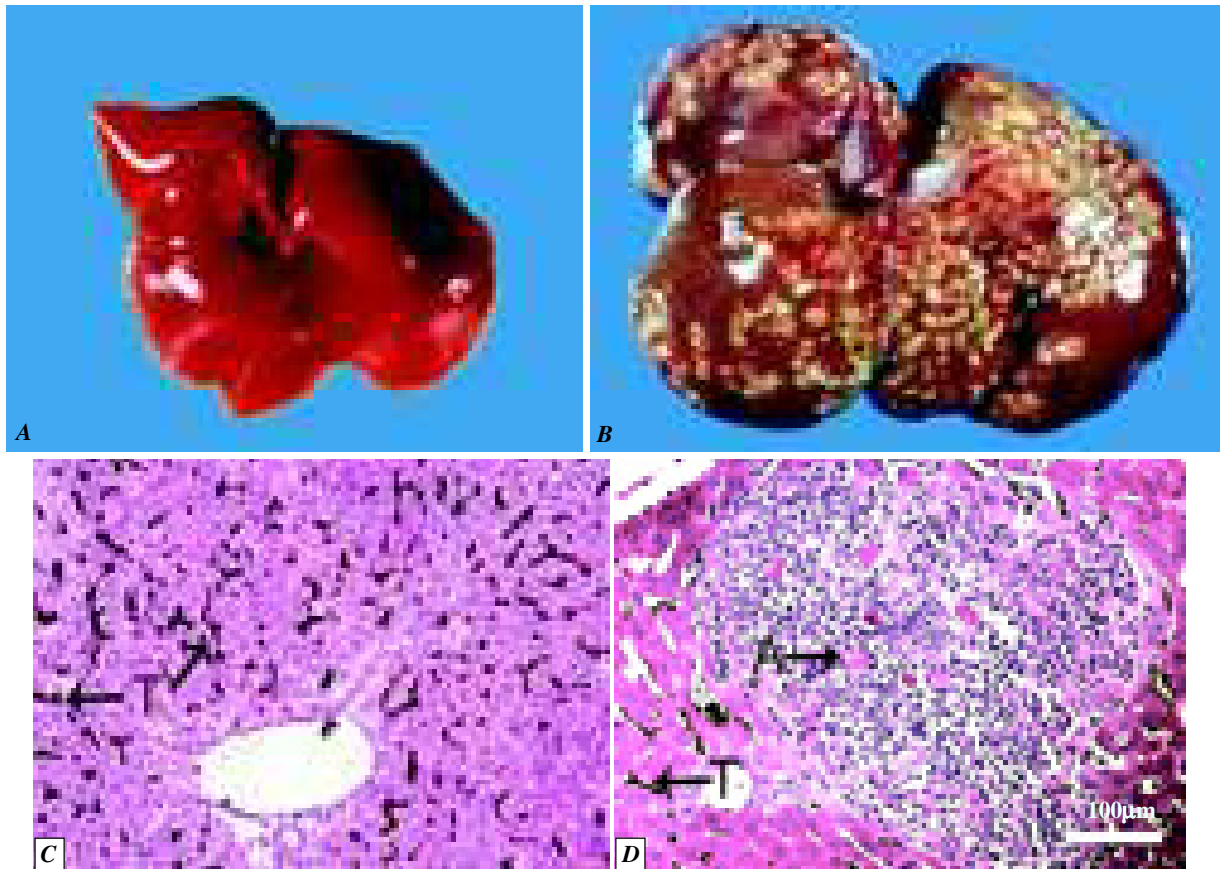


Figura 4. A) Aspecto macroscópico del hígado de un hámster normal y de otro con absceso amibiano de cinco días. B) Se observa hepatomegalia y necrosis en todo el hígado. C) Corte histológico de un hígado normal inyectado con tinta china, nótese la tinta china (T) distribuida en todos los sinusoides.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

rece ser el procesamiento de nutrientes, que permite la sobrevida del parásito *in vivo*. Además, la reacción inflamatoria del hospedero también es indispensable para la sobrevida de este parásito en el tejido hepático, ya que en su ausencia el parásito desaparece en corto tiempo. Finalmente, la respuesta inmune innata del hospedero es la principal responsable de la destrucción tisular en el AHAEH.

HIPÓTESIS

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

les en el procesamiento de nutrientes y de esta manera también ser esenciales para su sobrevida (Figura 5).

OBJETIVOS

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

CUADRO 1

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS DE CISTEÍNA DE *E. HISTOLYTICA*. OBSÉRVESE EN NEGRITAS LA GRAN CANTIDAD Y RECUPERACIÓN DE PROTEASAS DE CISTEÍNA

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

RESULTADOS

La actividad específica de las proteasas purificadas fue mayor en el extracto amibiano con éter, preparado con 2.5 M de NaCl (*Cuadro 1*). La fracción proteica con actividad proteolítica eluida de la columna de ultragel ACA 54, se encontró en una zona de aproximadamente 30 kDa. La *figura 6* muestra el patrón electroforético y el correspondiente zimograma de las diferentes fracciones electroeluidas del sistema Prep Cell. Debido a que las fracciones mostraron dos intervalos bien definidos con actividad proteolítica, se separaron y se marcaron como I: fracciones 56-68 y II: fracciones 80-92 (*Figura 7*). La actividad proteolítica de ambas fracciones se inhibió completamente con E-64. Para evitar agregación proteica durante la electroforesis-SDS, las fracciones se hirvieron en presencia de EDTA y iodoacetamida (*Figura 8*).

La determinación del punto isoeléctrico (pI) de la fracción II del extracto amibiano éter NaCl 0.5 M, reveló una banda proteica en la zona ácida del gel preparativo, que en el gel resolutivo mostró un pI de 5.14 (*Figura 9A*), que es cercano al pI teórico de EhCP2 (5.13), pero lejano del pI de EhCP5 (8.41). El análisis de la inmunoelectrotransferencia reveló una banda de aproximadamente 30 kDa en presencia de DTT, EDTA y iodoacetamida, y una banda semejante a 26 kDa en las mismas condiciones, pero sin DTT (*Figura 8B*). El control con la EhCP5 recombinante fue negativo (no mostrado).

La secuenciación NH²-terminal de la proteína de la fracción II purificada a partir del extracto éter NaCl 0.5M, mostró que es una mezcla de dos moléculas; una es precursor de la CP2 de *E histolytica* (aminoácidos 94-106: ALA-PRO-GLU-SER-VAL-ASP-X-ARG-LYS-GLU-

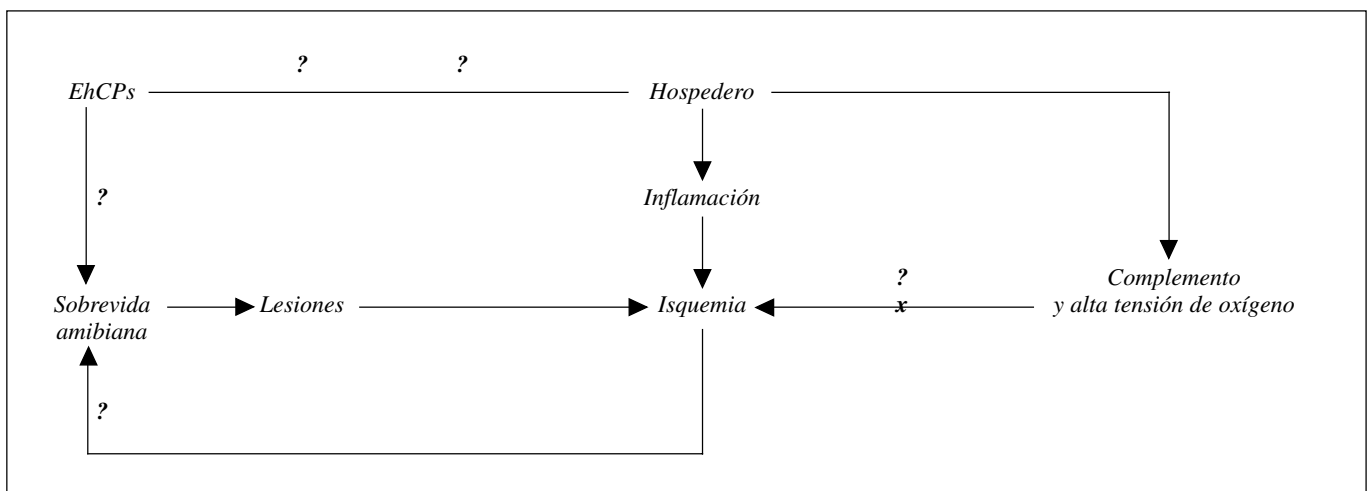


Figura 5. Absceso hepático amibiano agudo experimental en hámster.

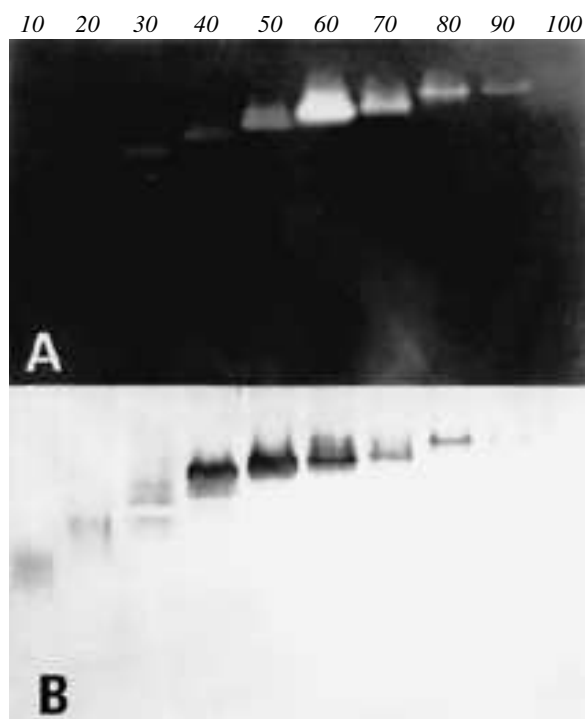


Figura 6. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes de diferentes fracciones proteicas electroeluidas en Prep Cell. Se analizó una fracción de cada 10. **A)** Zimograma en gel con gelatina. **B)** Migración proteica en gel al 12%.

GLY-X-VAL) y la otra es ubiquitina(s) de *E. histolytica* (aminoácidos 1-13: MET-GLN(o ASP)-ILE(o LYS)-PHE(o ALA)- VAL-(o TYR)-LYS-THR(o GLY)-LEU-

THR-GLY(o MET o ILE)-X-THR-ILE). Los aminoácidos en paréntesis indican posibles sustituciones.

El efecto de dos IgGs anti-EhCP2 obtenidas de diferentes conejos sobre la actividad proteolítica de EhCPs purificadas por cromatografía de afinidad se muestra en la *figura 10*. La IgG control inhibió la actividad proteolítica de manera dependiente de la concentración; por otro lado, uno de los anticuerpos anti-EhCP2 inhibió menos y, el otro, por el contrario, mostró un incremento de la actividad proteolítica por arriba de la actividad de la enzima control, de manera dependiente de la concentración. Resultados similares se obtuvieron cuando la actividad proteolítica de trofozoítos axénicos vivos se determinó en presencia de IgG de conejo normal y con los dos anticuerpos anti-EhCP2. Con la IgG normal la actividad proteolítica fue 58.16% respecto a los trofozoítos control, mientras que para los anticuerpos específicos ésta fue de 99.48 y 128.06%, respectivamente. La viabilidad de los trofozoítos no se modificó por la presencia de los anticuerpos anti-EhCP2.

Experimentos preliminares con microesferas de gelatina inyectadas en la vena porta de los hámsters revelaron (en el hígado), intensa reacción inflamatoria en sus alrededores después de 24 horas y por esta razón no se usaron. En cambio, las microesferas vacías de superdex 75 no mostraron reacción inflamatoria a su alrededor después de tres y 24 horas de la inyección intraportal (*Figura 11A*) y sólo algunas de ellas se rodearon de po-

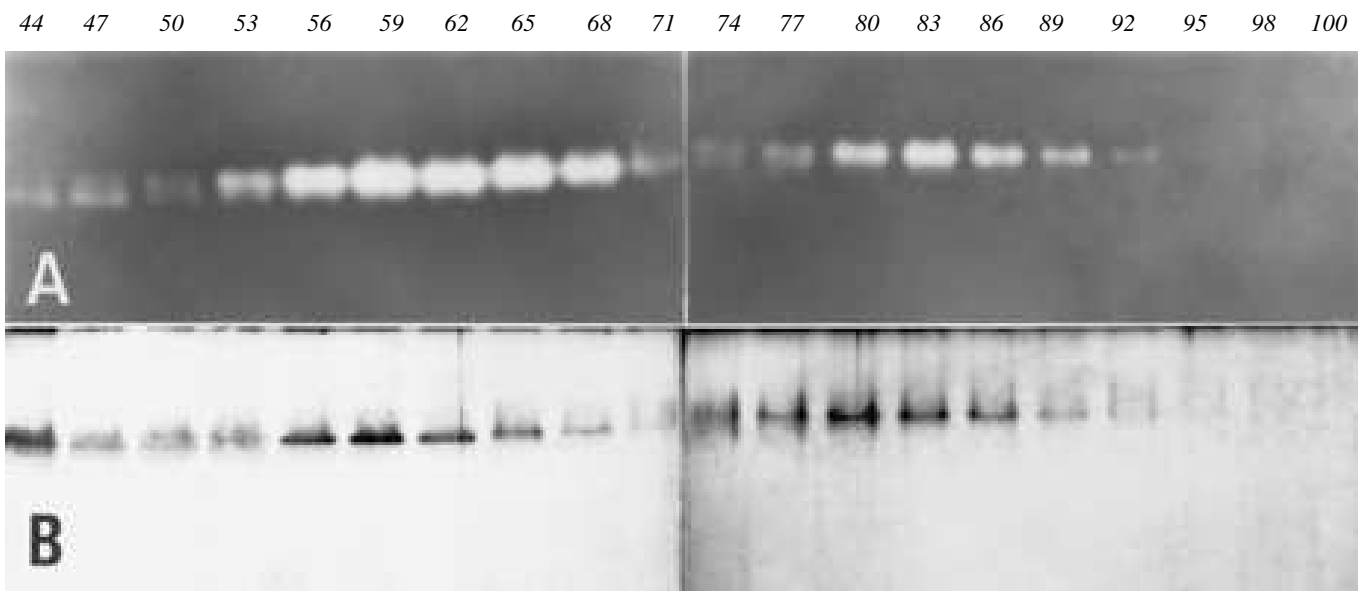


Figura 7. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes de fracciones proteicas con alta actividad proteolítica. Se analizó una fracción de cada 3. **A)** Zimograma en gel con gelatina y **B)** migración proteica en gel al 12%. Se observan dos zonas positivas (56-68 y 80-92), separadas por una zona intermedia (71-77) con menos actividad.

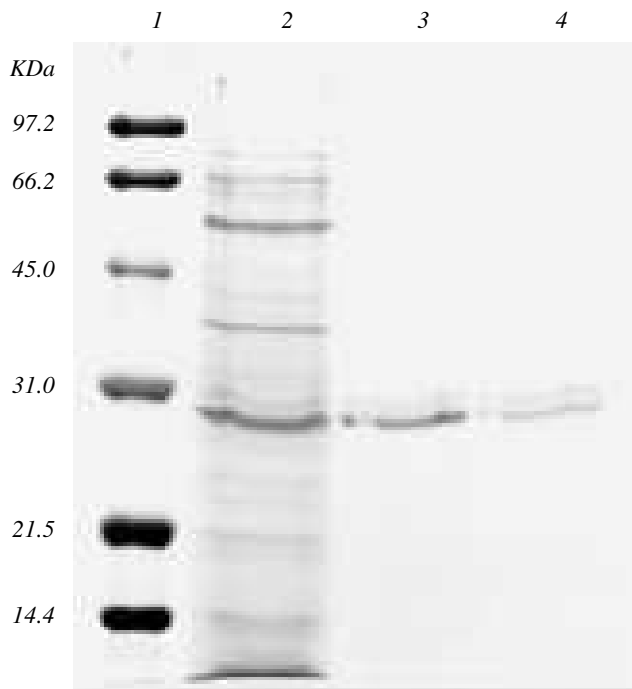


Figura 8. Electroforesis al 12% con SDS del extracto amibiano éter NaCl 0.5 M. 1, marcadores moleculares. 2, extracto amibiano éter. 3, fracción I de la electroelución en Prep Cell. 4, fracción II de la electroelución en Prep Cell. Las fracciones I y II tuvieron actividad proteolítica inhibible con E-64.

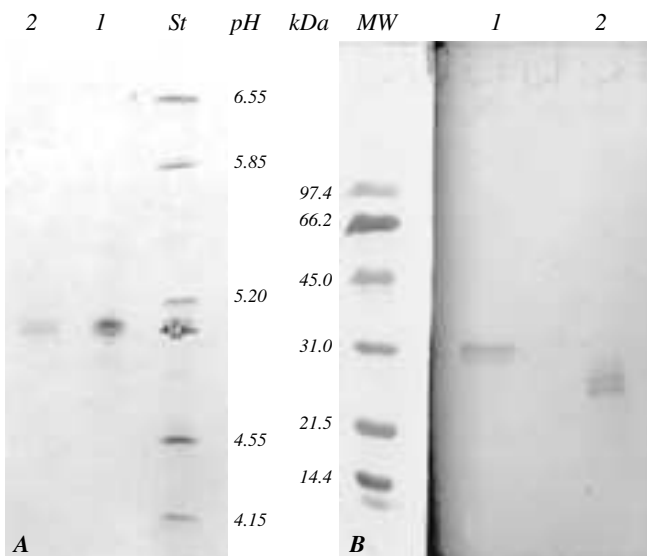


Figura 9. A) Isoelectroenfoco en gel resolutivo de pH 4.0-6.5 de EhCP2 purificada. St = standards; 1 y 2 son diferentes diluciones de la muestra EhCP2 y muestran un valor de 5.14. B) Inmunoelectrotransferencia de EhCP2 purificada detectada con anticuerpos anti-EhCP2. 1, hervida en presencia de DTT, EDTA y iodoacetamida. 2, hervida en presencia de EDTA y iodoacetamida sin DTT.

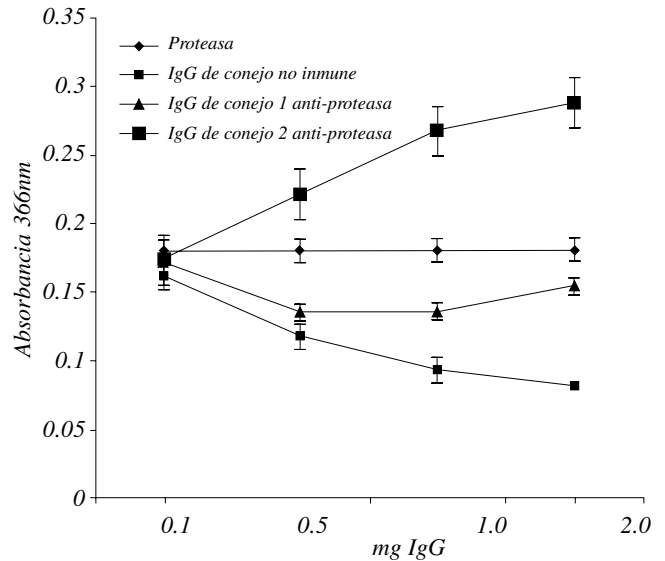


Figura 10. Efecto de dos diferentes anticuerpos anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica sobre azocaseína de EhCPs. La actividad proteolítica se redujo en presencia de IgG normal, con uno de los anticuerpos se disminuyó y con el otro esta actividad se incrementó de manera dependiente de la concentración.

teñidas con azul de Coomassie, mostraron que la incorporación fue heterogénea (Figura 11B). Después de inyectadas en la vena porta de los hámsters, éstas presentaron una moderada infiltración de leucocitos polimorfonucleares a tres horas (Figura 11C) y a 24 horas algunas de ellas tuvieron un reducido e irregular halo de células hepáticas necróticas y células inflamatorias (Figura 11D). A las 96 horas sólo se observaron algunas microesferas rodeadas de lesiones residuales. En los cortes de estos hígados, mediante inmunohistoquímica con IgG anti-EhCP2, la EhCP2 se observó dentro de las microesferas de superdex 75, hasta una hora después de la inyección intraportal. No se observó tinción positiva en los alrededores de las microesferas. Por otra parte, los cortes de hígados de hámster con abscesos amibianos de uno y cinco días de desarrollo, que se incubaron con IgG anti-EhCP2 y se revelaron con peroxidasa, mostraron trofozoítos amibianos positivos sin tinción en la zona de necrosis ni en los bordes con el tejido sano (Figura 12A,B y C). La inyección local de la proteasa EhCP2 purificada en el hígado de hámster con absceso de cinco días, permitió visualizar a la enzima en la zona de necrosis y en los sinusoides del tejido sano (Figura 12D). En la inmunolocalización de EhCP2 revelando con un segundo anticuerpo marcado con oro y en presencia de sales de plata encontramos la misma localización de la enzima que nos mostró la inmunohistoquímica revelada con peroxidasa, solo que más intensa (Figura 12F).

cas células mononucleares después de 96 horas. Las microesferas de superdex 75 con la EhCP2 incorporada,

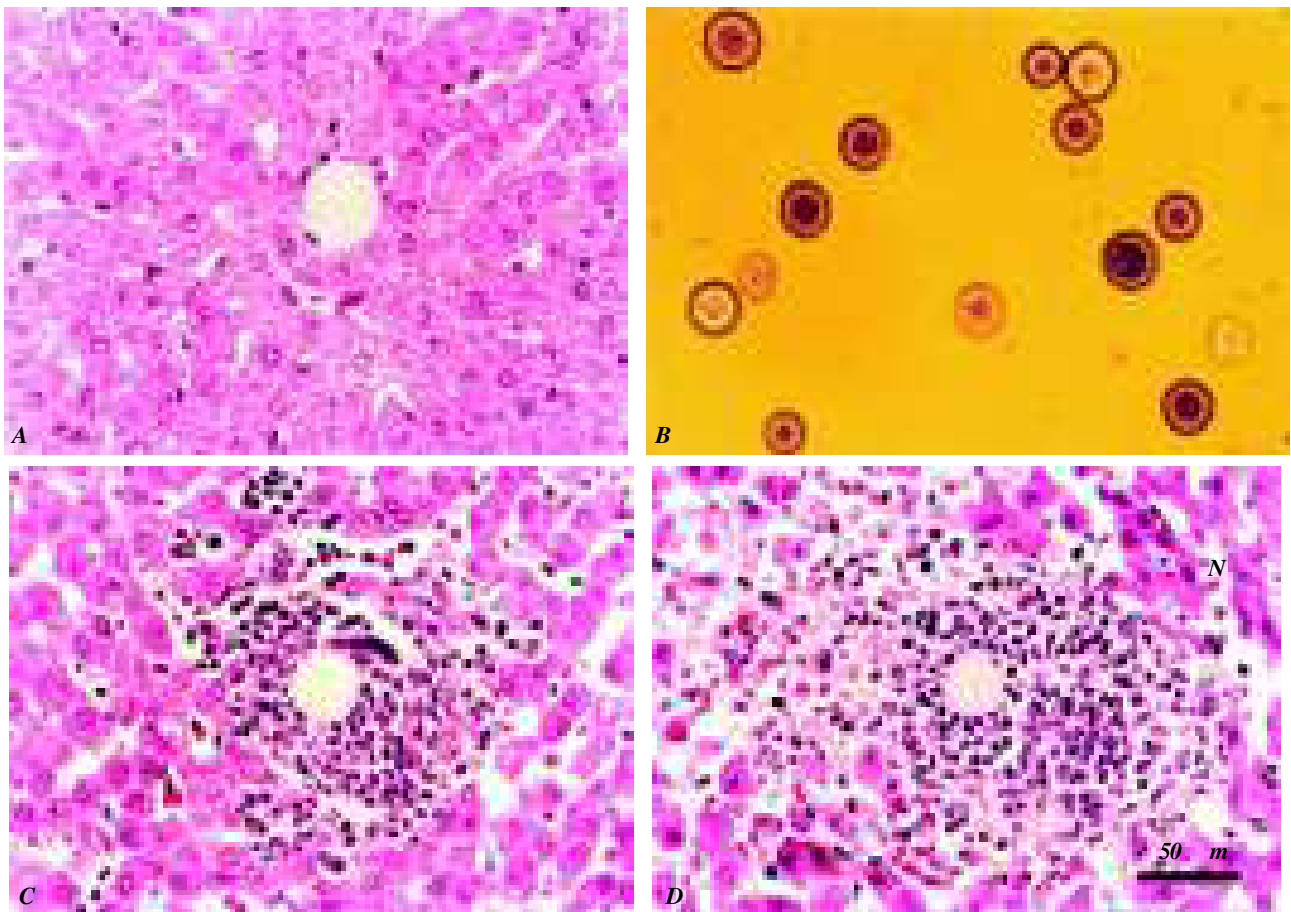


Figura 11. Inyección intraportal en hámsters de microesferas de superdex, con EhCP2 incorporada. **A)** Microesferas vacías (control), 24 horas después de la inyección. No se observa reacción inflamatoria. **B)** Microesferas con EhCP2 incorporada y teñidas con azul de Coomassie. **C)** Microesferas con EhCP2 incorporada tres horas después de ser inyectadas. Se observa infiltrado inflamatorio (PMNs) alrededor de la microesfera sin destrucción celular. **D)** microesferas con EhCP2 incorporada 24 horas después de ser inyectadas. Además de inflamación (PMNs) se observa destrucción de algunas células hepáticas (N).

Los trofozoítos de *E. histolytica* tratados 72 horas con E-64 500 M, no mostraron diferencias en crecimiento, viabilidad, resistencia a complemento y citotoxicidad, con respecto a los trofozoítos control. En cambio, se inhibió su capacidad de disminuir la resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células MDCK (Figura 13). Por otra parte, la actividad proteolítica de los trofozoítos crecidos en medio TYI-S-33 con E-64, se inhibió gradualmente durante las 72 horas de cultivo (Figura 14). Resultados similares se obtuvieron con los zimogramas en gel de gelatina (Figura 15), así como también con la actividad proteolítica de cisteína intracitoplásmica, en trofozoítos amibianos vivos, visualizada con el sustrato AMNP (Figura 16). Al incrementar las concentraciones de E-64, se observó una disminución general en el número de gránulos citoplásmicos fluorescentes y un incremento en el número de amibas completamente negativas. Cuando las amibas crecidas por 72 horas en

E-64 se lavaron y se cultivaron nuevamente sin E-64, se recuperó el 50% de la actividad de proteasas de cisteína en aproximadamente 24-48 horas (detectada con azocaína) (Figura 14).

En los experimentos *in vivo* con E-64, los abscesos hepáticos amibianos fueron iguales en los grupos 1, 2 y 3 (Cuadro 2 y Figura 17). Un día después de la inyección de los trofozoítos, todos los hígados de estos animales mostraron múltiples lesiones con poca necrosis, y a los cinco días se observaron áreas extensas de necrosis con poco infiltrado inflamatorio y con algunos trofozoítos viables.

Por otra parte, no se observaron lesiones en ningún hígado de los animales del grupo 4 al cabo de cinco días y los hepatocitos no mostraron actividad intracelular de proteasas de cisteína (Figura 18). Además, no se detectaron amibas en los cortes de tejido teñidos con PAS.

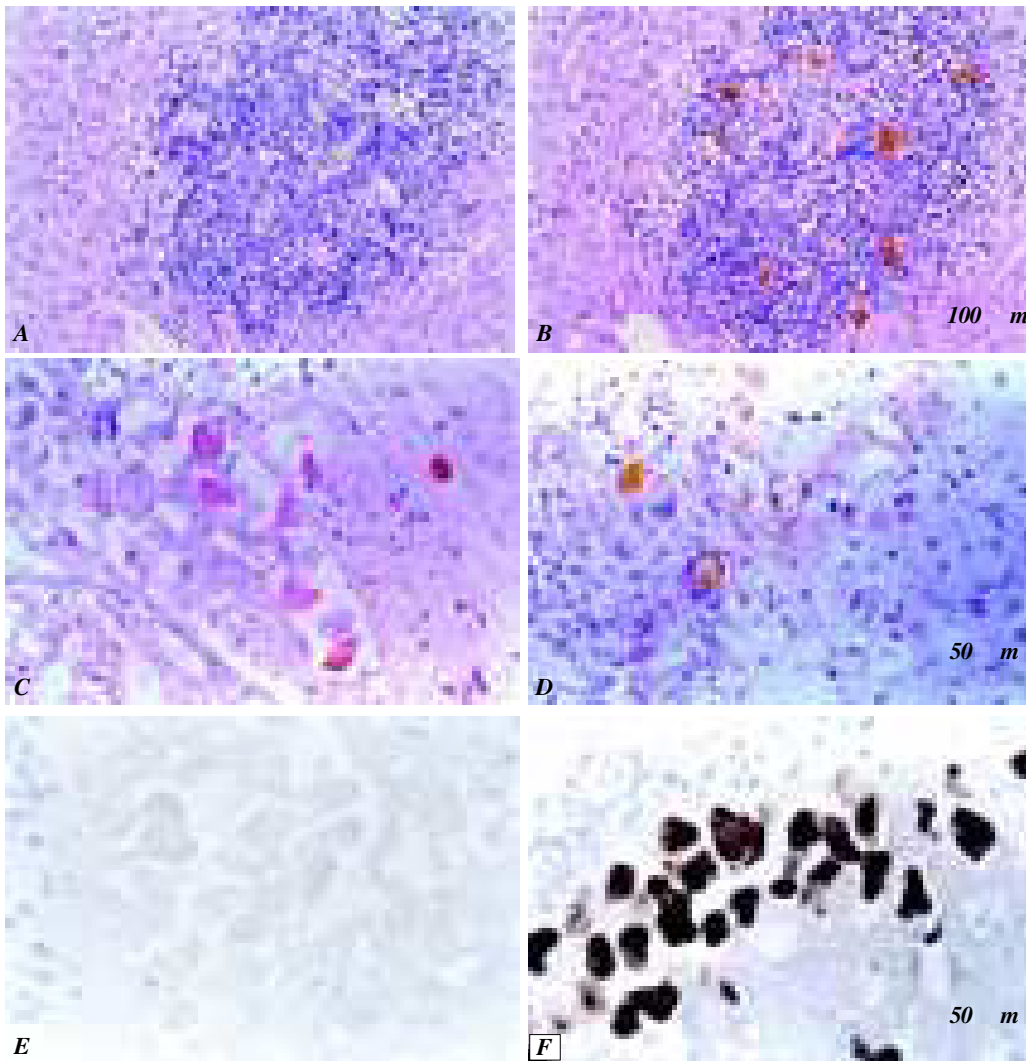


Figura 12. Inmunolocalización de EhCP2 en cortes de AHAEH. **A)** AHAEH de 24 horas incubado con IgG normal (control). **B)** AHAEH de 24 horas incubado con anti-EhCP2. **C)** AHAEH de cinco días incubado con anti-EhCP2. **D)** AHAEH de cinco días, inyectado previamente con EhCP2 purificada e incubado con anti-EhCP2. **E)** AHAEH de cinco días incubado con IgG normal (control). **F)** AHAEH incubado con anti-EhCP2. Inmunohistoquímica revelada con peroxidasa (**A-D**) y con oro-plata (**E-F**). En presencia de anti-EhCP2, los trofozoítos se tiñen intensamente y no se observa tinción en la zona de necrosis ni en la periferia con el tejido sano, excepto cuando la EhCP2 purificada se inyecta previamente (**D**).

En los animales del grupo 4 (especialmente preparados para detectar lesiones y amibas a tiempos cortos), ocho horas después de la inyección de los trofozoítos, se observaron pequeños grupos de PMNs con pocas amibas fragmentadas. Después de 20 horas los parásitos desaparecieron; sólo estuvieron presentes restos de PMNs (polvo nuclear) y células gigantes ocasionales, en las lesiones involutivas de este tiempo (*Figura 19*).

La irradiación de los hámsters causó disminución de los leucocitos circulantes, de $10429 \pm 1512/\text{mm}^3$ a $287 \pm 216/\text{mm}^3$ en 48 horas y permaneció en este nivel hasta siete días después, en que los animales mueren (*Figura 20*). La inyección del glucógeno en la cavidad peritoneal ocasionó el secuestro de los leucocitos periféricos residuales. Los animales controles inyectados con amibas mostraron leucopenia periférica temporal a las seis horas, que evolucionó a leucocitosis a las 96 horas; en cambio, en los animales radiados la leucopenia se man-

tuvo durante la infección (*Figura 21*). Por otra parte, en los cortes de los hígados de los animales normales inyectados con amibas, a las tres y seis horas posteriores se observaron amibas bien conservadas, rodeadas por PMNs sin destrucción tisular y con isquemia; a las 24 horas la necrosis se sumó a este proceso. En los animales leucopénicos tres y seis horas después de la inyección, se observaron amibas bien conservadas en ausencia de células inflamatorias, sin daño celular y tisular en sus alrededores y sin isquemia, ya que la tinta china se encontraba en todos los sinusoides, en cambio a las 24 horas se observó lo mismo, sólo que con amibas fragmentadas que desaparecieron en 48 horas (*Figura 22*).

Las microesferas de superdex mezcladas con amibas e inyectadas en el hígado de hámster leucopénico produjeron múltiples sitios de isquemia focal y la tinta china inyectada por vía intraportal antes del sacrificio fue incapaz de penetrar en estas áreas. Las amibas se obser-

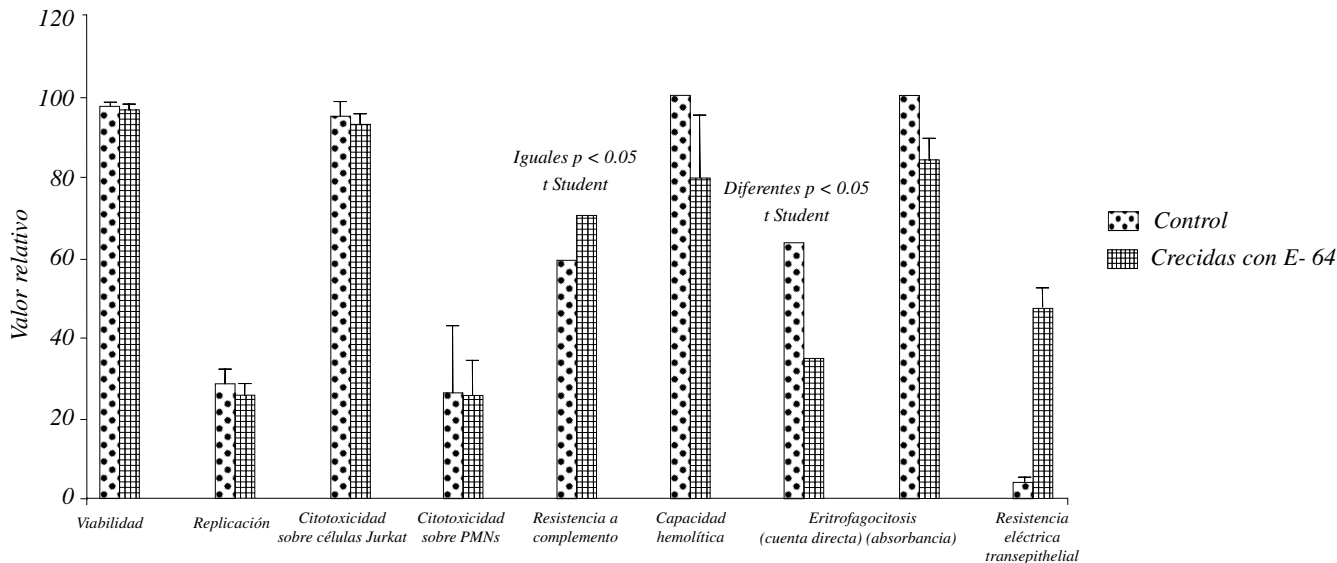


Figura 13. Efecto del crecimiento de *E. histolytica* con E-64 (72 horas), sobre diferentes funciones in vitro.

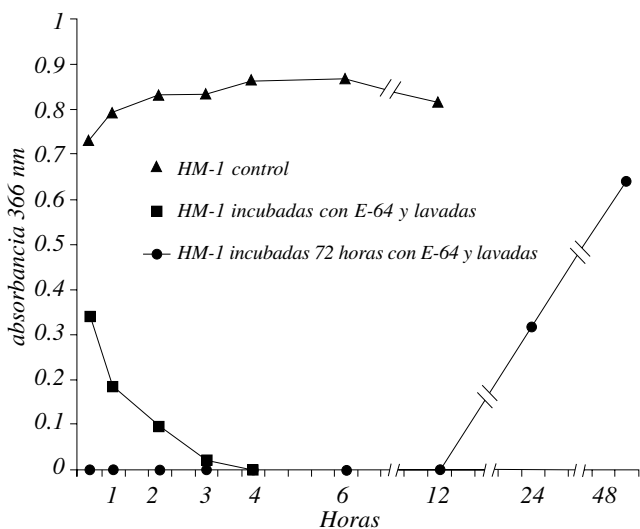


Figura 14. Actividad proteolítica sobre azocaseína de homogenados amibianos después de varios periodos de incubación en presencia de E-64. La actividad desaparece después de cuatro horas de incubación con E-64 y reaparece 12 horas después de quitar el inhibidor.

varon bien conservadas dentro de las zonas isquémicas hasta las seis horas (Figura 23) y después de este tiempo desaparecieron.

Se purificaron 1.04 mg de FHVC a partir de 450 mg de extracto crudo de *Naja haje* (Figura 24). La administración intraperitoneal del FHVC en hámsters indujo la baja del complemento en más del 95% y permaneció en este nivel durante por lo menos 72 horas. El efecto citolítico amibiano del suero de hámster se bloqueó con la inyección intraperitoneal del FHVC, este efecto perma-

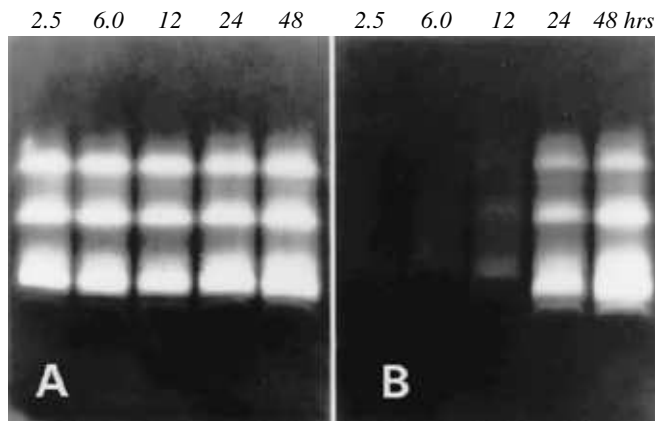


Figura 15. Zimogramas de homogenados amibianos control (A) y de los que recuperaron la actividad proteolítica (B), correspondientes al experimento mostrado en la figura 14. La actividad proteolítica se visualiza (con esta técnica) seis horas después de retirar el inhibidor.

neció durante 72 horas (Figura 25). La inyección intraperitoneal de amibas en hígados de hámsters leucopénicos + hipocomplementémicos permitió ahora la sobrevivencia de las amibas hasta por 24 horas (Figura 26), sin embargo, después de este tiempo los trofozoítos desaparecieron. Los hígados de los hámsters inyectados con amibas dos horas después de la radiación, mostraron a las 24 horas lesiones similares a los controles, es decir; amibas bien conservadas, isquemia, leucocitos y necrosis (Figura 27). Después de este tiempo, que es cuando se observa leucopenia casi total, las amibas desaparecen. El resumen de estos experimentos *in vivo* se puede observar en el cuadro 3.

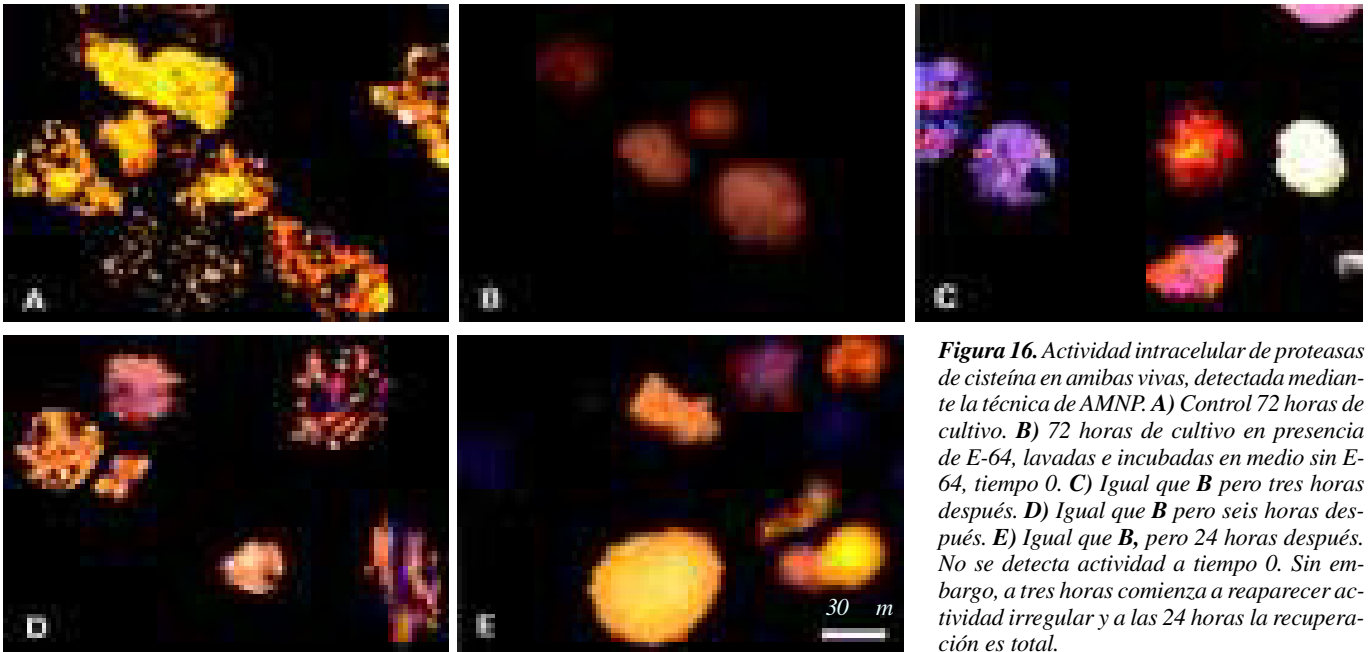


Figura 16. Actividad intracelular de proteasas de cisteína en amibas vivas, detectada mediante la técnica de AMNP. **A)** Control 72 horas de cultivo. **B)** 72 horas de cultivo en presencia de E-64, lavadas e incubadas en medio sin E-64, tiempo 0. **C)** Igual que **B** pero tres horas después. **D)** Igual que **B** pero seis horas después. **E)** Igual que **B**, pero 24 horas después. No se detecta actividad a tiempo 0. Sin embargo, a tres horas comienza a reaparecer actividad irregular y a las 24 horas la recuperación es total.

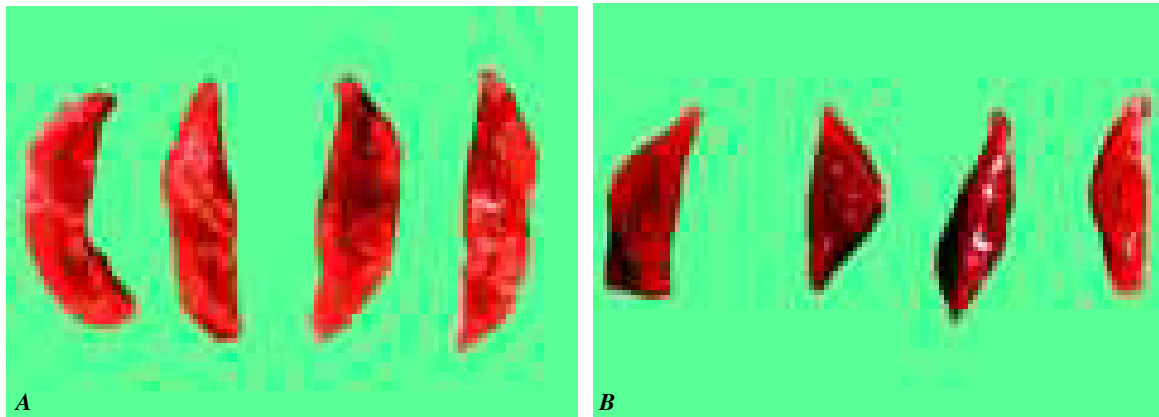


Figura 17. Aspecto macroscópico de los hígados de hamster inyectados con amibas. **A)** Imagen representativa de los grupos 1, 2 y 3; se aprecia hepatomegalia y múltiples lesiones distribuidas en todos los lóbulos. **B)** Imagen del grupo 4; se observan lóbulos de tamaño normal y sin lesiones.

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

El aspecto macroscópico de los hígados de los hamsters inyectados con CsA, mostró mínimas lesiones con respecto al control (sin CsA). En la histología de los hígados control se observaron algunas amibas bien conservadas dentro de zonas con necrosis extensa e infiltrado inflamatorio. En cambio en los hígados de los animales tratados con CsA se observaron múltiples cúmulos de amibas bien conservadas, rodeadas de mínimo infiltrado inflamatorio y sin necrosis (*Figura 28*).

DISCUSIÓN

EhCP2

La purificación de EhCP2 en dos etapas, descrita en este trabajo, tuvo un rendimiento satisfactorio (*Cuadro 1*), mucho más alto del descrito previamente para una proteasa de 30 kDa con un protocolo diferente.¹² Durante la extracción se evitaron los detergentes y en su lugar se usó éter, que es fácil de eliminar. La adición de ZnCl₂ al extracto amibiano y la primera etapa de purificación por filtración molecular eliminó muchas proteínas y la segunda etapa por electroelución en Prep-Cell completó la purificación. La secuenciación de la fracción II de la

CUADRO 2
 TRATAMIENTO DE LOS CUATRO DIFERENTES GRUPOS DE HÁMSTERS INYECTADOS CON AMIBAS.
 NINGUNO DE LOS HÍGADOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO 4 PRESENTÓ LESIONES (0/8)

Grupos	1	2	3	4
Amibas	Normales	Crecidas 72 horas con E-64	Normales Con E-64 cada 12 horas	Crecidas 72 horas con E-64 Con E-64 cada 12 horas
Hámsters	Normales	Normales	Normales Con E-64 cada 12 horas	Crecidas 72 horas con E-64 Con E-64 cada 12 horas
AHAEH/hámster	8/8	8/8	8/8	0/8

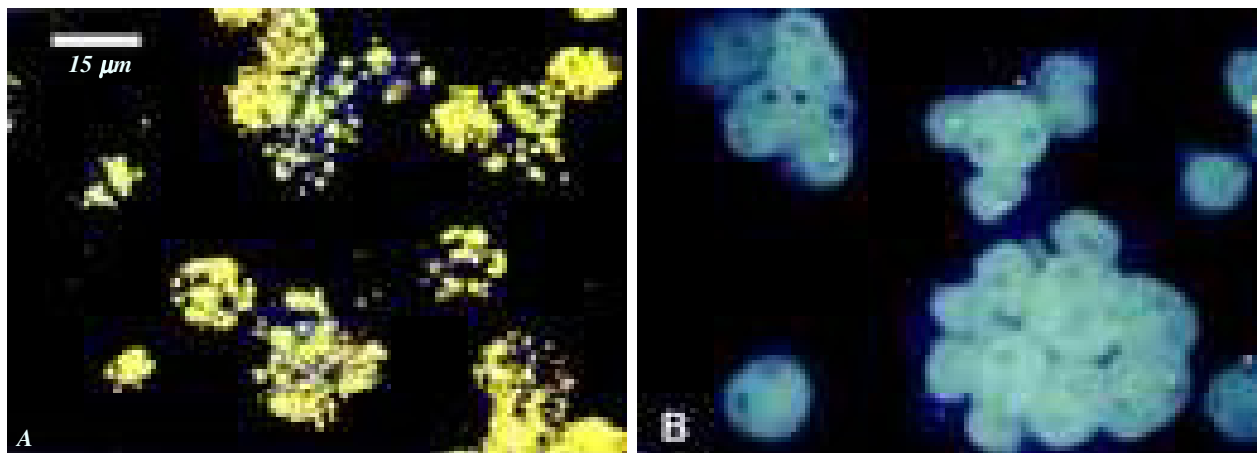


Figura 18. Actividad de CPs en células hepáticas, detectada mediante la técnica de AMNP. **A)** hepatocitos de hámster normal (control). **B)** hepatocitos de un hámster del grupo 4 (inyectado durante cinco días con E-64). Se observa inhibición de la actividad de CPs en células hepáticas del animal tratado con E-64.

proteína purificada mostró que el producto final es una mezcla de EhCP2 y Eh-Ubiquitina(s), que puede ser una de las formas en que tales moléculas existen normalmente en el parásito. La mayor parte de la proteína purificada en nuestra preparación es EhCP2 y la(s) Eh-ubiquitina(s) están presentes en cantidades mínimas, debido a que nunca se observó alguna banda cercana a 8.5 kDa en electroforesis-SDS,²⁸ a pesar de teñir el gel con solución de plata.

Durante todo el procedimiento de purificación, la actividad proteolítica inhibible con E-64 se mantuvo y se asoció con proteínas de masa molecular de 30 kDa. Cuando la proteína purificada se examinó en electroforesis-SDS, se observaron bandas de diferente masa molecular con actividad proteolítica, que regresaron a una banda proteica de aproximadamente 30 kDa cuando la muestra fue hervida en presencia de EDTA, DTT y iodoacetamida. Debido a que casi todos los genes clonados hasta la fecha codifican para proteínas con masa molecular de aproximadamente 30kDa,²⁹ la existencia de CPs prove-

nientes del mismo parásito con masas moleculares de 16-96 kDa^{10-12,17,30-32} debe tener una explicación postraduccionnal. Se ha sugerido que durante la electroforesis-SDS las EhCPs de bajo peso molecular provienen de sus precursores por autoproteólisis.³³ Por otra parte,³⁴ cortaron del gel de electroforesis-SDS las bandas proteicas de 35 y 48 kDa con actividad proteolítica, y las secuenciaron; éstas resultaron ser EhCP2 y EhCP1 respectivamente, que son codificadas por genes con productos de 30kDa. Lo anterior sugiere un fenómeno de oligomerización/agregación, con el que estamos de acuerdo.

El efecto estabilizante de las IgG anti-EhCP2 sobre la actividad proteolítica de los trofozoítos vivos y las EhCPs purificadas por afinidad, fue un resultado interesante. Aunque no tenemos explicación para este fenómeno, éste ya ha sido observado con otros anticuerpos antienzima^{35,36} y frecuentemente se atribuye a cambios en la conformación de la enzima causados por el anticuerpo, sin alteración del sitio catalítico. Con el objeto de estimular la producción de anticuerpos protectores a la ami-

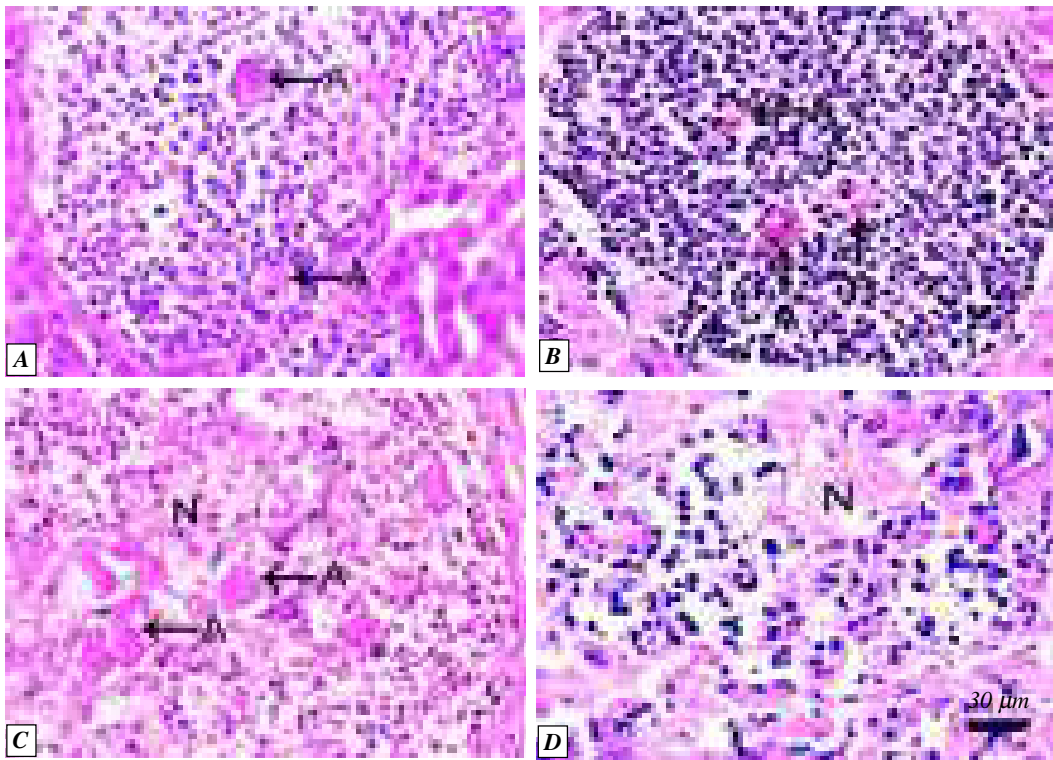


Figura 19. Histología de los hígados de los animales del grupo 4 (inyectado continuamente con E-64 + amibas crecidas en presencia de E-64). **A)** Control ocho horas, amibas bien conservadas (A) rodeadas de PMNs y con mínima destrucción tisular. **B)** Grupo cuatro a ocho horas, restos amibianos (A) con inflamación aguda; principalmente PMNs y escasa necrosis. **C)** Control 20 horas, múltiples amibas con inflamación y destrucción tisular (N). **D)** grupo cuatro a 20 horas; mínimo daño celular hepático (N) con fragmentación de PMNs y sin amibas.

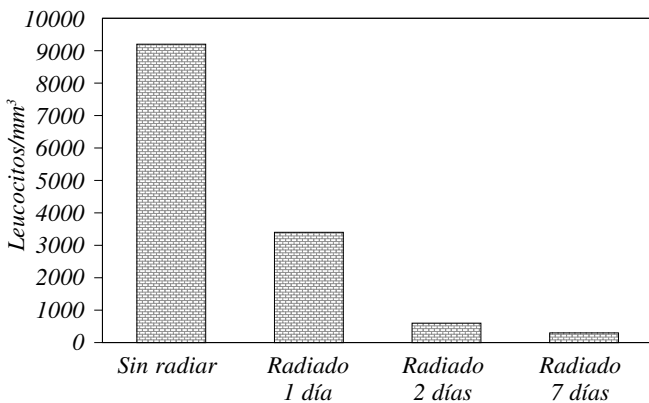


Figura 20. Leucocitos de sangre periférica de hámsters normales y expuestos a 800 rads de radiación gamma (⁶⁰Co). Se observa que 24 horas después de la radiación, permanece aproximadamente el 30% de los leucocitos y a partir de las 48 horas la leucopenia es casi total y se mantiene en este nivel hasta los siete días.

biasis experimental, algunas moléculas amibianas han sido utilizadas como inmunógenos³⁷⁻³⁹ Ciertas CPs de 56-66 kDa secretadas por *E. histolytica* y purificadas parcialmente, se usaron para tal propósito por Gupta, *et al.*⁴⁰ y no observaron correlación alguna entre títulos de anticuerpos y protección. En 83% de los pacientes humanos con amibiasis invasiva se detectaron anticuerpos antiproteasas, mientras que en los infectados con *E. dispar* éstos estuvieron ausentes.⁴¹ La clase de Ig puede ser

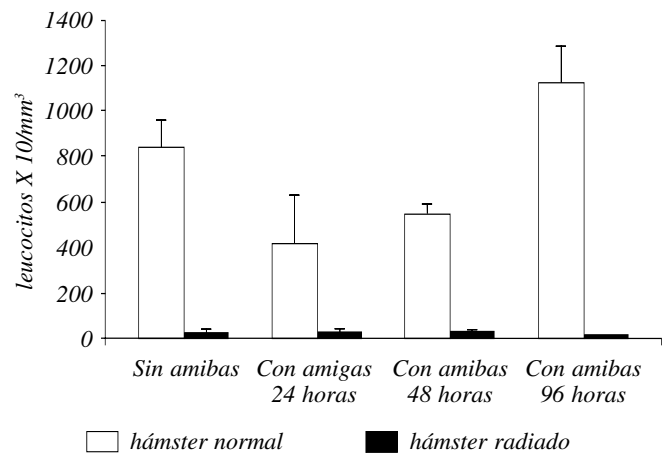


Figura 21. Leucocitos en sangre periférica de hámsters normales y radiados inyectados con amibas. En los hámsters normales con amibas se observó una leucopenia parcial a 24 horas que evolucionó a leucocitosis a las 96 horas. En cambio, en los hámsters radiados con amibas, la leucopenia permaneció durante todo el experimento.

importante, ya que anticuerpos IgA anti-EhCPs inhiben eficientemente la actividad proteolítica *in vitro*.⁴² La frecuencia y el efecto de los anticuerpos anti-EhCPs estabilizantes producidos por el hospedero durante el desarrollo de lesiones amibianas experimentales, todavía no han sido estudiados.

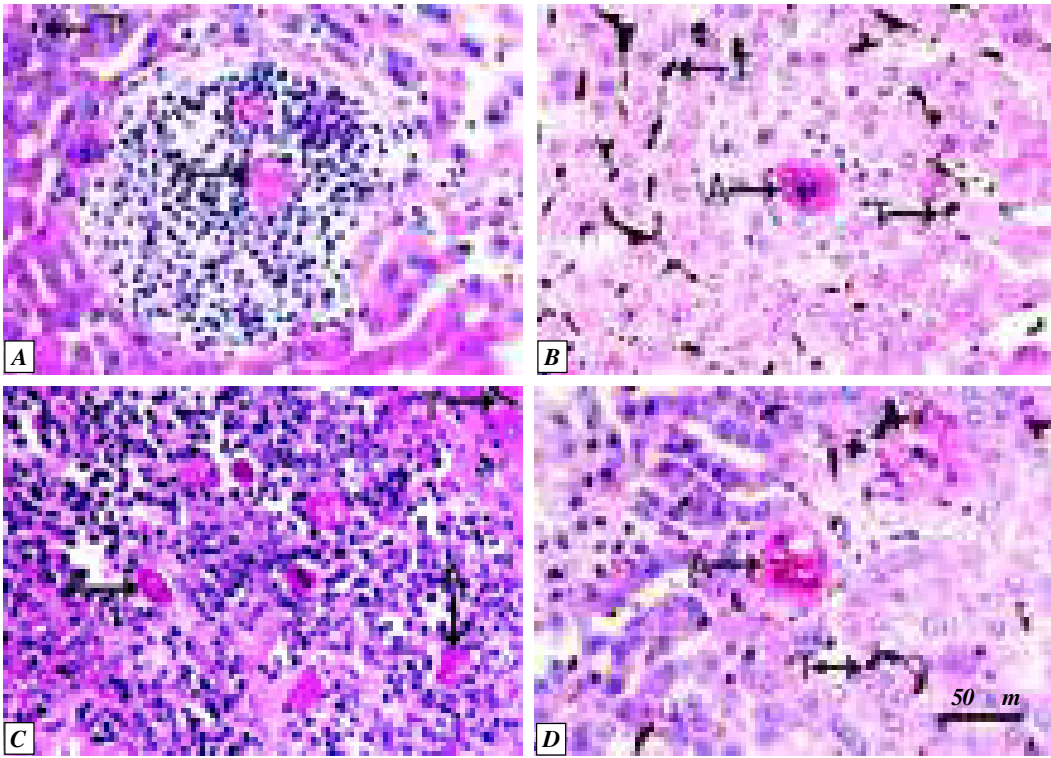


Figura 22. Histología de los hígados de los animales leucopénicos inyectados con amibas. **A)** Control 6 h. **B)** Leucopénico seis horas. Amibas bien conservadas. **C,** control 24 horas. **D,** leucopénico 24 horas, se observan restos de amibas (A). En los animales leucopénicos (**B y D**); nótese la ausencia de isquemia (presencia de tinta china (T) en sinusoides), células inflamatorias y destrucción tisular en la vecindad de las amibas (A).

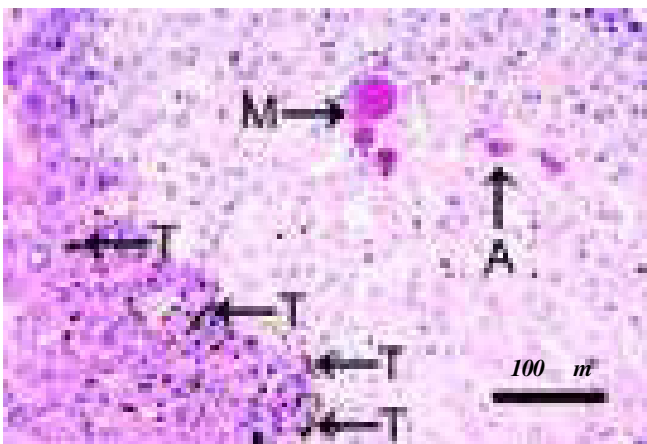


Figura 23. Aspecto microscópico del hígado de hámster, inyectado con amibas (A) mezcladas con microesferas de superdex (M). El área de isquemia se demuestra por la decoloración (en rosa) y por la falta de penetración de la tinta china (T) en esta zona. Se observan amibas bien conservadas sin células inflamatorias y sin necrosis (seis horas).

La inyección intraportal en hámsters con proteasa EhCP2 incorporada en microesferas de liberación lenta (de tamaño semejante a los trofozoítos de *E. histolytica*) y el estudio inmunohistoquímico e histológico del hígado a tres, 24 y 96 horas después de la inyección, mostró que EhCP2 es capaz de inducir una reacción inflamatoria moderada, acompañada ocasionalmente de necrosis en los alrededores de algunas microesferas, que desapare-

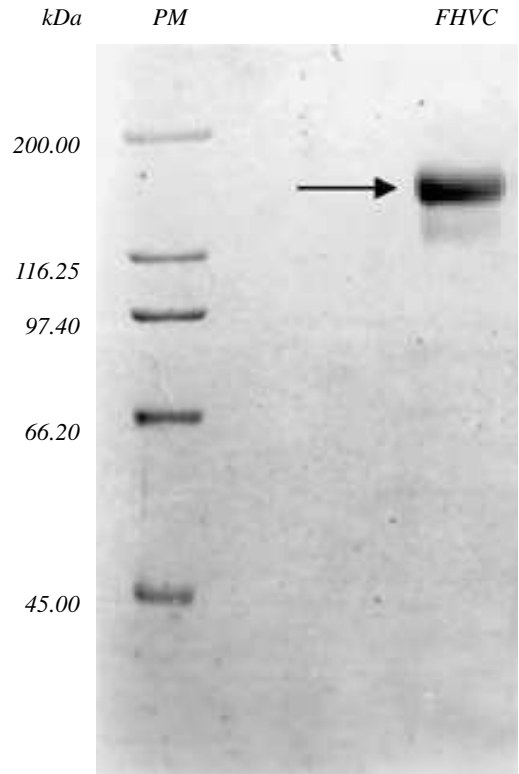


Figura 24. Purificación del factor hipocomplementémico del veneno de cobra (FHVC) a partir de extracto crudo de *Naja haje*. Se aprecia principalmente una banda de proteína de ~ 144 kDa. (→) Esta proteína disminuyó los niveles de complemento de hamsters normales en más del 95%.

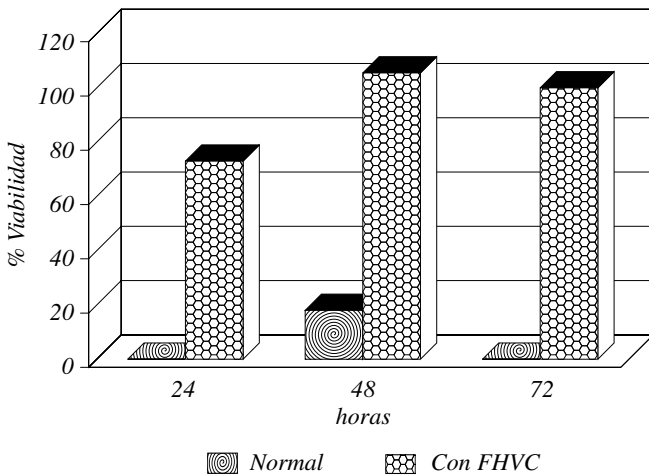


Figura 25. Capacidad amebicida del suero de hámster normal y del inyectado con FHVC. El suero normal es citotóxico para las amibas y el FHVC bloquea este efecto hasta por 72 horas.

cen a las 96 horas. Admitimos que esta “amiba sintética” es un modelo muy crudo del parásito real, sin embargo, representa el primer intento de examinar la participación de un solo componente molecular de *E. histolytica* en el daño del tejido, en un modelo de amibiasis *in vivo* en ausencia de otros posibles elementos amibianos participantes. Dos de los principales problemas en esta situación experimental, son el desconocimiento de la cantidad de enzima liberada, tanto de las microesferas inertes como de los trofozoítos en las lesiones *in vivo*, y el hecho que una sola dosis de la enzima debe tener un efecto bioquímico muy breve. Sin embargo, se saben dos cosas: primero, que la cantidad de enzima incorporada y

liberada por cada microesfera es variable (semejante a los trofozoítos amibianos) y segundo, que cualquier cantidad que ésta sea, la mayor parte es proteína con actividad proteolítica. A pesar de estas limitaciones, los resultados sugieren que EhCP2 es capaz de inducir una moderada reacción inflamatoria y mínima necrosis en el tejido hepático. Se ha demostrado que las EhCPs activan C3⁴³ con la consecuente liberación de péptidos quimiotácticos (C3a y C5a) y rápida llegada de PMNs, que en lesiones experimentales agudas se desintegran, liberan enzimas lisosomales y dañan células vecinas y elementos intercelulares.^{26,44} Es probable que los cambios morfológicos observados alrededor de las microesferas con EhCP2 incorporada, después de llegar al tejido hepático, pueda explicarse por este mecanismo, a pesar de que las amibas pueden causar daño en tejidos de animales leucopénicos.⁴⁵

La correlación del nivel de actividad proteolítica en *E. histolytica* con la virulencia es controversial.^{13,14,46,47} Experimentos *in vitro* han mostrado que las amibas secretan proteasas al medio de cultivo^{43,48,49} y se ha sugerido que tales proteasas son responsables, por lo menos en parte, de la extensa destrucción de tejidos que caracteriza a esta enfermedad. Ventura-Juárez, *et al.*⁵⁰ tiñeron lesiones amibianas experimentales iniciales mediante inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales antiextractos amibianos totales y mostraron que además de la tinción positiva de los trofozoítos amibianos, había difusión de material positivo alrededor de éstos. Por otra parte, Stanley, *et al.*¹⁵ tiñeron los trofozoítos amibianos en cortes de hígados de ratones SCID con abscesos ami-

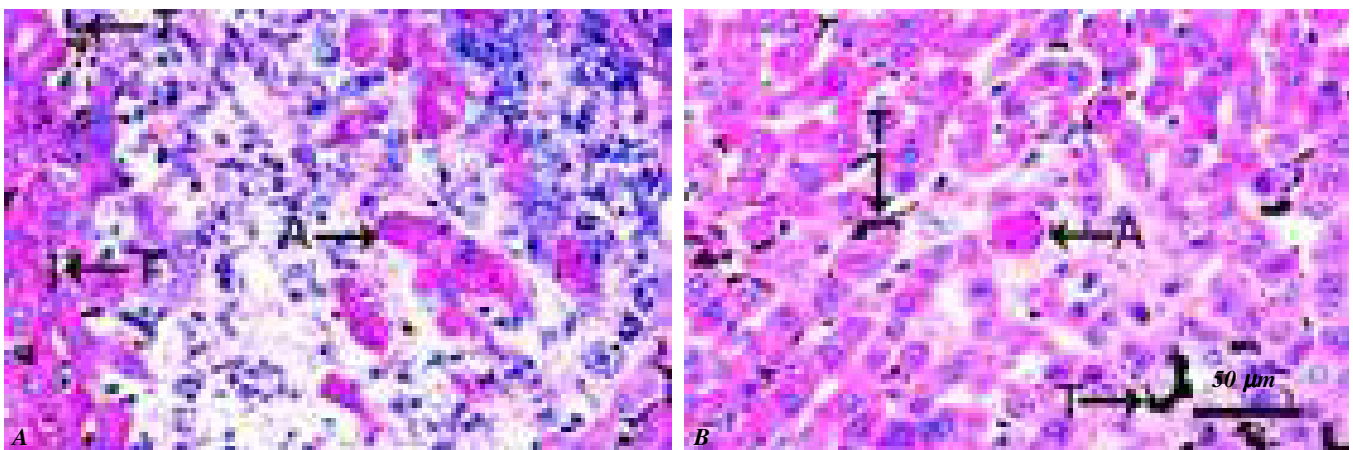


Figura 26. Efecto combinado de la leucopenia + hipocomplementemia en el desarrollo del AHAEH. **A)** Control hipocomplementémico 24 horas; se observan trofozoítos bien conservados (A) con infiltrado inflamatorio, necrosis e isquemia (demostrada por la ausencia de tinta china (T) en esta zona). **B)** leucopénico e hipocomplementémico 24 horas; se observa una amiba (A) bien conservada sin infiltrado inflamatorio, sin necrosis y sin isquemia (la tinta china (T) está en los sinusoides).

CUADRO 3
RESUMEN DE LOS EXPERIMENTOS QUE EXAMINAN EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN,
COMPLEMENTO E ISQUEMIA EN EL AHAEH

Tiempo de Sacrificio	Control	Radiados	Radiados con microsferas	Hipocomplementémicos	Hipocomplementémicos y radiados	Radiados*
30 min						
Amibas	+	+	ND	ND	ND	ND
Lesiones	-	-	ND	ND	ND	ND
3 horas						
Amibas	+	+	ND	ND	ND	ND
Lesiones	-	-	ND	ND	ND	ND
6 horas						
Amibas	+	+	+	+	+	ND
Lesiones	-	-	-	-	-	ND
1 día						
Amibas	+	-	-	+	+	+
Lesiones	+	-	-	+	-	+
2 días						
Amibas	+	-	-	+	-	ND
Lesiones	+	-	-	+	-	ND
3 días						
Amibas	+	-	-	+	-	ND
Lesiones	+	-	-	+	-	ND
6 días						
Amibas	+	ND	ND	ND	ND	-
Lesiones	+	ND	ND	ND	ND	-

* amibas inyectadas dos horas después de la radiación, ND no determinado, + presencia de amibas bien conservadas, - ausencia de amibas.

bianos, utilizando un anticuerpo policlonal anti-EhCP1 y afirman haber detectado tinción positiva fuera de los parásitos. En nuestros estudios inmunohistoquímicos en abscesos hepáticos amibianos experimentales, frecuentemente detectamos EhCP2 en la amibas y nunca hemos observado tinción positiva de EhCP2 fuera de la amiba. Tal resultado negativo podría explicarse por la no secreción de EhCP2 o por muy baja concentración de la enzima en el espacio extraamibiano, por debajo del límite de detección de las técnicas utilizadas. Hellberg, *et al.*¹⁴ inyectaron en hígados de gerbos, trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* que por transfección fueron diseñados para sobreexpresar 2.8 veces más EhCP2; siete días después, no observaron diferencias con respecto a los controles (*E. histolytica* y *E. dispar* sin transfectar), i.e., la virulencia de *E. histolytica* no aumentó y *E. dispar* permaneció no patógeno. Estos resultados podrían explicarse si la sobreexpresión no se acompañara de secreción de la enzima. El anticuerpo anti-EhCP2 no presentó reacción cruzada con EhCP5; sin embargo, no ha sido

probado con las otras EhCPs, pero resulta poco probable que éstas contribuyan al desarrollo de la extensa y rápida destrucción del tejido alrededor del parásito, ya que las lesiones amibianas no disminuyeron en los hámsters del grupo 3 (hámsters tratados con E-64 + amibas virulentas) en los que el inhibidor de EhCPs estuvo activo y en circulación durante todo el experimento. Esto último se demostró por la ausencia casi completa de actividad de proteasas de cisteína en los hepatocitos de los animales de este grupo (*Figura 18*). El trabajo de Hellberg, *et al.*¹⁴ y estos resultados comparten la sugerencia que EhCP2 no es secretada y no está directamente involucrada en la destrucción del tejido en la amibiasis hepática experimental en hámsters.

Inhibición de EhCPs con E-64

Los resultados de los experimentos *in vitro* con amibas crecidas por 72 horas en E-64 mostraron que la inhibición total de sus proteasas de cisteína (demostrada por

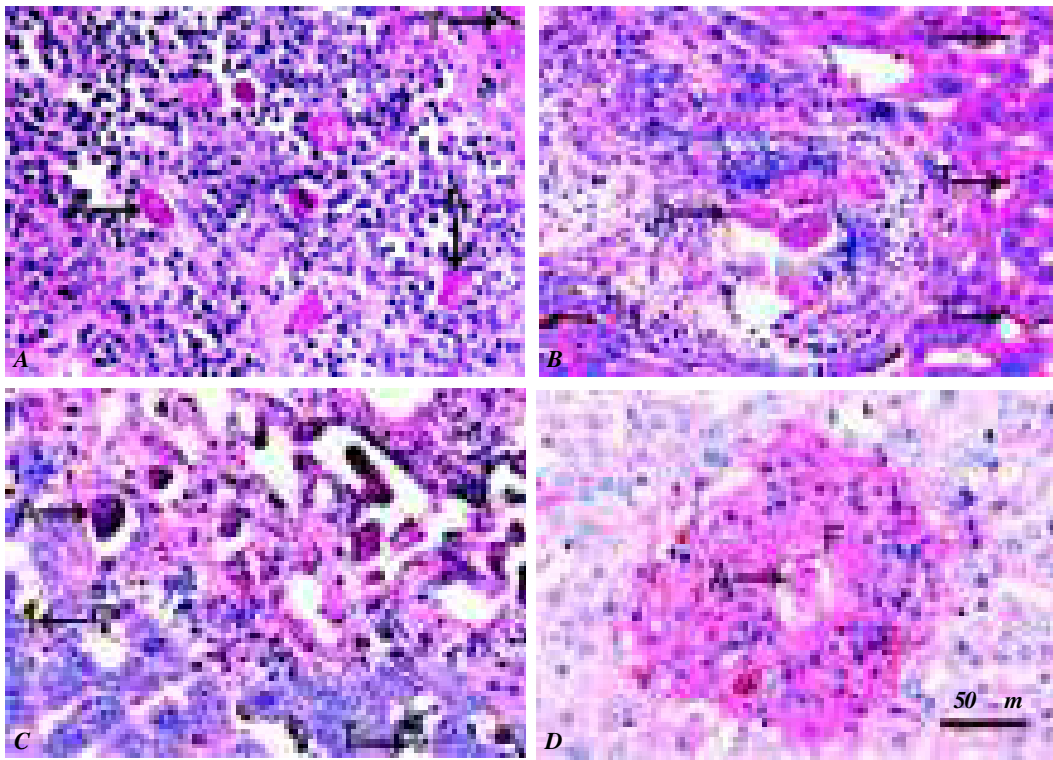


Figura 27. Histología de los hígados de los hamsters normales y de los inyectados con amibas, dos horas después de la radiación. **A)** Control 24 horas; muestra abundantes amibas (A), infiltrado inflamatorio, isquemia (sin tinta china (T)) y necrosis. **B)** Radiado 24 horas; se observan amibas bien conservadas (A) rodeadas de mínimo infiltrado inflamatorio y necrosis, la isquemia se demuestra por la ausencia de tinta china (T) en esta área. **C)** Control siete días; muestra amibas (A) en zonas de isquemia (sin tinta china (T)) y de necrosis con escaso infiltrado inflamatorio. **D)** Radiado siete días; se observan restos de amibas (A) inmersos en una malla de fibrina (F) y rodeadas por macrófagos.

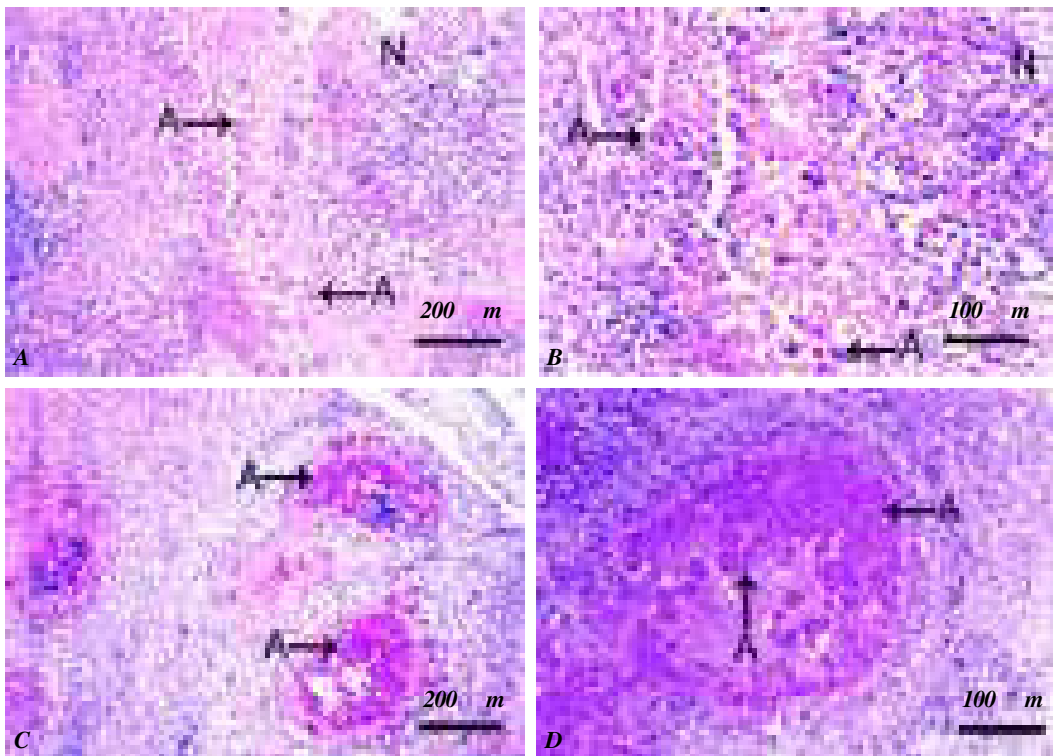


Figura 28. Efecto de la inmunosupresión con CsA sobre el desarrollo del AHAEH (siete días). **A)** Hígado de hámster control; se observa necrosis extensa (N) y a mayor aumento **B)**, se aprecian algunas amibas (A) bien conservadas, polvo nuclear y escaso infiltrado inflamatorio. **C)** Hígado de hámster inmunosuprimido con CsA; se observan dos cúmulos de amibas (A) y a mayor aumento **D)** se aprecian abundantes amibas (A) bien conservadas, con escaso infiltrado inflamatorio y sin necrosis.

tres técnicas diferentes), no tuvo efecto sobre su crecimiento, viabilidad, resistencia a complemento, capacidad hemolítica y efectos citotóxicos. En cambio, la

eritrofagocitosis y resistencia eléctrica transepitelial sobre monocapas de células MDCK sí se redujeron. La conservación de la viabilidad y otras propiedades de las

CUADRO 4
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T DE BAZO (ESTIMULADAS CON CON-A)
DE ANIMALES NORMALES E INMUNOSUPRIMIDOS, INYECTADOS CON AMIBAS (SIETE DÍAS)

	Incorporación de ^3H -timidina en células T (proliferación)
Hámster normal	76,094 \pm 19,468
Hámster con CsA	800 \pm 173

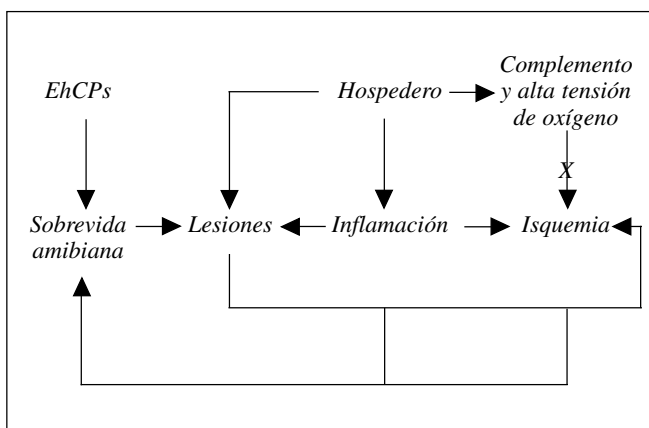


Figura 29. Absceso hepático amibiano agudo experimental en hámster.

amibas *in vitro* a pesar de la completa y prolongada ausencia de actividad de proteasa de cisteína, sugiere que el medio debe contener todos los elementos requeridos para su metabolismo. Por otra parte, la actividad de CPs parece ser un requerimiento esencial de las amibas para su sobrevivencia en condiciones *in vivo*, por lo menos en el modelo experimental AHAEH. La causa de la desaparición de las amibas se desconoce, pero se puede sospechar que ocurre pocas horas después de la inyección. Los animales del grupo 2 (hámsters normales + amibas crecidas en E-64), desarrollaron lesiones iguales al grupo 1 (control). En esta situación, la inyección de las amibas en la vena porta es equivalente a la eliminación del inhibidor del medio de cultivo, con la recuperación progresiva de la actividad de proteasa de cisteína por las amibas en las siguientes tres a 24 horas. Tal como fue observado *in vitro*, cuando las amibas crecieron en E-64 y posteriormente se incubaron en medio sin el inhibidor (actividad detectada con el sustrato AMNP (Figura 16)).

El grupo 3 (hámsters tratados continuamente con E-64 + amibas no tratadas) desarrolló lesiones similares a

las del grupo 1 (control). Este resultado requiere una explicación más elaborada que debe incluir por lo menos dos elementos: 1) la incapacidad del E-64 para afectar la capacidad citotóxica de las amibas cuando se adiciona al cultivo a tiempo 0 o durante las 72 horas del cultivo, demostrado en los experimentos *in vitro* de co-incubación con células blanco; 2) el rápido desarrollo de isquemia en pequeñas lesiones hepáticas amibianas experimentales podría prevenir el contacto de las amibas con el inhibidor de proteasas de cisteína presente en la sangre. Es probable que el efecto combinado de estos dos elementos pueda explicar la sobrevivencia de los parásitos y el desarrollo del daño tisular en el grupo 3.

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

Amibas en hígados de hámster leucopénico

Los dos principales resultados de los experimentos con hámsters leucopénicos son: 1) En ausencia de células inflamatorias, los trofozoítos de *E. histolytica* virulenta no causan daño en el hígado de hámster. Esta propuesta fue sugerida por primera vez por Tsutsumi, *et al.*²⁶ y por Tsutsumi y Martínez-Palomo⁴⁴ a partir de es-

tudios con el microscopio electrónico del AHAEH. Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que en otras condiciones experimentales, las amibas causan destrucción tisular en ausencia de PMNs.^{45,51} Lo anterior sugiere que los factores que contribuyen al daño celular y tisular en distintas especies y órganos, pueden ser diferentes. 2) *E. histolytica* desaparece del hígado de hámster en ausencia de una respuesta inflamatoria. Las amibas permanecieron bien conservadas en el hígado por seis horas; a las 24 horas disminuyeron en número y después de este tiempo se observaron destruidas. La sugerencia de que en estas condiciones, el complemento eliminó a las amibas debido a la ausencia de isquemia que la inflamación normalmente crea, no es apoyada por nuestros experimentos con el FHVC, ya que las amibas desaparecieron del hígado de hámsters leucopénicos + hipocomplementémicos, al mismo tiempo que de los animales leucopénicos que tienen niveles normales de complemento sérico. Capín, *et al.*⁵² informaron que las lesiones amibianas hepáticas (20 días) fueron más grandes en hámsters hechos hipocomplementémicos con el FHVC, pero estos animales no eran leucopénicos. Ellos interpretaron sus resultados como la consecuencia del incremento en la sobrevida de las amibas. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, hecho para explorar el mecanismo(s) de resistencia natural de la rata a la infección con la misma *E. histolytica* virulenta utilizada en el presente trabajo, se descartaron las células inflamatorias y el complemento pero no se analizó la causa de la rápida desaparición de las amibas de los hígados de los animales leucopénicos e hipocomplementémicos. El posible papel de la isquemia (generada por inflamación durante el AHAEH en los animales normales) como creadora de un microambiente anaeróbico local que debiera ser favorable para el parásito no es compatible con nuestros resultados de isquemia focal hepática inducida por la inyección intraportal de trofozoítos virulentos mezclados con microesferas de superdex. En ausencia de inflamación, la isquemia no preserva a las amibas más allá del tiempo en que los parásitos desaparecen del hígado de los animales leucopénicos o hipocomplementémicos + leucopénicos. Los dos puntos anteriormente discutidos pueden resumirse como sigue: en el AHAEH la inflamación es necesaria tanto para el daño del tejido como para la sobrevida amibiana. No es claro por qué las amibas son incapaces de sobrevivir en ausencia de células inflamatorias. La idea actual acerca de que las amibas sobreviven debido a que resisten y modulan los mecanismos citotóxicos de PMNs y macrófagos⁵³ es inadecuada para explicar nuestros resultados. En cambio,

por contradictorio que pueda parecer, es posible que las células inflamatorias proporcionen a las amibas nutrientes o algún tipo de estímulo necesario para sobrevivir y multiplicarse en el hígado. Es claro que el AHAEH es un proceso biológico complejo en el que hospedero y parásito desempeñan funciones cambiantes, pero antes de abordar este difícil tema debemos centrarnos en los problemas aparentemente simples presentados en el AHAEH como son, “los requerimientos básicos para la sobrevida de los trofozoítos una vez que entran en la vena porta”.

Amibas en hígado de hámster inmunosuprimido con CsA

La ciclosporina A es un compuesto que tiene acción inmunosupresora en el hombre y en algunos roedores, ya que se une a la ciclofilina de los linfocitos T, este complejo interrumpe la transcripción de algunos genes, como el de IL-2, involucrados en procesos como señalización y replicación celular.⁵⁴ En los hígados de los hámsters inyectados con CsA, la presencia del gran cúmulo de amibas viables rodeadas por mínimo infiltrado inflamatorio, apoya la idea de que las células inflamatorias son necesarias para la sobrevida de la amiba, ya que a diferencia de lo que ocurre con los hámsters leucopénicos, en los que las amibas mueren y desaparecen, esa cantidad de células inflamatorias son suficientes para proporcionar (directa o indirectamente) algún estímulo o nutriente que las amibas necesitan para sobrevivir. Además, la escasa destrucción tisular en presencia de grandes cúmulos de amibas viables observada en los animales tratados con CsA, apoya la idea de que la respuesta inmune del hospedero sea la principal responsable del daño al tejido en el AHAEH. El daño tisular ocasionado por el hospedero se observa durante el desarrollo de la tuberculosis, la leishmaniasis y la tripanosomiasis.⁵⁵⁻⁵⁷ Es probable que en el AHAEH las colagenasas, proteasas, citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, participen en el proceso de destrucción tisular y además favorezcan la sobrevida amibiana. Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de algunas funciones amibianas como eritrofagocitosis y actividad proteolítica, causan la disminución de los abscesos durante la amibiasis hepática experimental.^{7,18} Sin embargo, al final del experimento con CsA, las amibas fueron viables, cultivables, y su actividad proteolítica y de eritrofagocitosis no se modificaron, por lo que la interferencia de la CsA en estas funciones queda descartada.

CONCLUSIÓN

Durante el desarrollo del absceso hepático amibiano agudo experimental en hámsters, las proteasas de cisteína de *E. histolytica* son indispensables para su sobrevivencia. Por otra parte, las células inflamatorias del hospedero son las principales responsables de la destrucción tisular y al mismo tiempo son indispensables para la supervivencia del parásito y progresión de las lesiones (*Figura 29*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS se recuperaron de un absceso hepático amibiano experimental en hámster (siete días). El cultivo axénico se inició con una densidad de 7×10^5 trofozoítos en 50 mL de medio TYI-S-33⁵⁸ en cajas de plástico. Después de 72 horas de incubación a 37 °C, los trofozoítos se cosecharon y se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos 15 mM pH 7.2, NaCl 0.15 M (PBS). En algunos experimentos los trofozoítos amibianos se cultivaron por 72 horas en medio TYI-S-33, pero en presencia de E-64 (500 M). Al final del cultivo, las amibas se contaron con un hematocitómetro y se les determinó la viabilidad por exclusión de azul de Trypan.

Extractos amibianos

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

Purificación de proteasas de cisteína

La purificación se llevó a cabo en dos pasos:

1. Fracciones de 5 mL del extracto amibiano se pasaron por una columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, con dimensiones de 150.0 X 2.2 cm, equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5M, 1 mM de HgCl₂, con flujo de 0.4 mL/min. La proteína eluida se detectó a 280 nm y la actividad proteolítica con azocaseína.⁵⁹ Las fracciones con actividad proteolítica se mezclaron, se concentraron a 3 mL (con una membrana de amicon con corte de 3 kDa) y se dializaron con una membrana de 8 kDa de corte en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7.4, HgCl₂ 1 mM.
2. Se mezclaron 2.7 mL de la muestra dializada con 2.3 mL de amortiguador de muestra no desnaturizante (H₂O 5.4 mL, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 1 mL, glicerol 0.8 mL, azul de bromofenol al 0.5% 0.4 mL) y se electroeluyó en el sistema 491 Prep Cell (BIORAD), con tubo de gel de 37 mm, 7.2% de gel separador, 4% de gel concentrador, 12 watts, flujo de 0.75 mL/min y fracciones de 6 mL. Una de cada 10 fracciones se analizó en geles no desnaturizantes de acrilamida al 12%, teñidos con solución de plata. Además, también se les determinó actividad proteolítica en zimogramas de geles de acrilamida con gelatina incorporada.⁶⁰ Finalmente, una de cada tres fracciones de las dos zonas con actividad proteolítica se analizaron de la misma manera.

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

Zimogramas

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

Secuenciación

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

para la secuenciación de los 13 aminoácidos del extremo amino terminal de la enzima.

Punto isoelectrico

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

Anticuerpos policlonales anti-EhCP2

El procedimiento fue similar al descrito por Montfort, *et al.*¹² Se emulsificó 1 mL de EhCP2 hervida (200 g) con 1 mL de adyuvante completo de Freund y esto se inyectó en un conejo por vía intramuscular y subcutánea. Después de un mes, 100 g de la proteasa hervida se administró de la misma manera y siete días después 100 g de la proteasa hervida se inyectó por vía intraperitoneal. Otro conejo se inmunizó de la misma manera, pero con la proteasa inhibida con E-64 10 M y sin hervir. Ambos animales se sangraron una semana después del tratamiento, se obtuvo el suero y se determinó la presencia de anticuerpos mediante doble inmunodifusión en agar, contra un extracto amibiano de éter y EhCP2 purificada. La IgG se purificó por precipitación con sulfato de amonio al 50% y mediante cromatografía de afinidad (sepharosa-proteína A). La IgG nativa (control) se obtuvo de conejos normales mediante el mismo procedimiento.

Especificidad del anticuerpo anti-EhCP2

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

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

La IgG anti-EhCP2 (10 mg) se acopló a 1 g de sepharosa activada con bromuro de cianógeno, se empacó en una columna de 5 x 2 cm y se lavó con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M y HgCl₂ 1 mM. Se pasaron por la columna 3 mL del extracto amibiano

éter NaCl 0.5 M y ésta se lavó con 100 mL del mismo amortiguador. La proteína unida se eluyó con 2 mL de amortiguador glicina-HCl 10 mM pH 2.0 e inmediatamente se neutralizó con unas gotas de amortiguador Tris-HCl pH 8.8 y se concentró a 2 mL con una membrana YM-3. A esta muestra se le determinó concentración de proteína⁶¹ y actividad proteolítica sobre azocaseína; además, el patrón proteico se examinó mediante electroforesis no desnaturizante (sin SDS) en geles de acrilamida al 12% con sus correspondientes zimogramas en geles de acrilamida con gelatina incorporada. Este procedimiento (con las mismas cantidades) se realizó para la obtención de sepharosa-IgG de conejo no inmune (control).

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

Se determinó actividad proteolítica sobre azocaseína a 10 g de proteasas de cisterna purificadas por afinidad, en presencia de diferentes cantidades de IgG anti-EhCP2 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg) y EDTA 5 mM, en tres experimentos independientes. Paralelamente, duplicados de estas muestras se almacenaron a 4 °C por 24 horas. Los inmunoprecipitados se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 minutos, se lavaron dos veces con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M y se analizaron en electroforesis-SDS al 12%. Por otra parte, se incubaron 2.5 x 10⁵ trofozoitos de *E. histolytica* con 1 mg de IgG anti-EhCP2 durante una hora, se les determinó actividad proteolítica sobre azocaseína (1mg/0.6 mL, 37 °C, tres horas) y viabilidad por exclusión de azul de Trypan. En los experimentos control, se sustituyó la IgG anti-EhCP2 por IgG de conejo no inmune.

Inmunolocalización de EhCP2 en el absceso hepático amibiano de hámsters

Se inyectaron 2.5 x 10⁵ trofozoitos axénicos de *E. histolytica* por vía intraportal a hámsters anestesiados. Después de uno y cinco días los animales se sacrificaron con una sobredosis de éter, los hígados se extirparon, se fijaron con formol al 10% en PBS y mediante procesamiento histológico se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes seriados de estos hígados (4-6 m), se incubaron con IgG anti-EhCP2 (0.04 mg/0.2 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M preabsorbida con polvo cetónico de hígado de hámster) y se tiñeron mediante la técnica indirecta o "sándwich" usando como anticuer-

po secundario IgG de cabra anti-IgG de conejo, marcado con isotiocianato de fluoresceína o peroxidasa y diaminobenzidina como sustrato. Para aumentar la sensibilidad de la reacción, en algunos cortes de tejido el anticuerpo secundario fue reemplazado por un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con oro y revelado con solución de plata (silver enhancement kit, Molecular Probes Inc.).

Liberación de EhCP2 purificada en hígado de hámster

En la búsqueda de un vehículo para liberar la EhCP2 purificada en el hígado de hámster, en diferentes sitios y concentraciones; en un principio se prepararon microesferas de gelatina de acuerdo con Yoshioka *et al.*,⁶² pero experimentos preliminares revelaron que tales microesferas no son vehículos inertes. Sin embargo, cuando se inyectaron microesferas de la resina superdex 75 (Farmacia 24-44 de diámetro) en hámsters por vía intraportal, no se observó reacción inflamatoria ni daño en el tejido. Debido a que tales microesferas tienen tamaño semejante a trofozoítos amibianos, incorporan proteínas de peso molecular similar a EhCP2, con mínima interacción química entre ellas y liberan las proteínas al medio con agitación moderada, se pasaron 5 veces 60

L de EhCP2 purificada (5 mg/mL en PBS) a través de una microcolumna con 3.5×10^5 microesferas de superdex 75. Posteriormente 5×10^4 microesferas se inyectaron por vía intraportal en hámsters y éstos se sacrificaron a tres, 24 y 96 horas; al término de cada tiempo los hígados se procesaron mediante histología para examen inmunohistoquímico.

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

Resistencia a complemento

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

Citotoxicidad

La actividad citotóxica de los trofozoítos crecidos en presencia de E-64 se determinó *in vitro* con dos diferentes tipos de células blanco: células Jurkat y PMNs obtenidos de la cavidad peritoneal de hámsters, inyectados previamente (seis horas) con 1 mL de glucógeno al 1% en PBS. El experimento se realizó incubando 1×10^5 amibas con 5×10^5 células Jurkat y 1×10^5 amibas con 2.5×10^6 PMNs en medio TYI-S-33 con E-64 250 M por tres horas a 37 °C y determinando la viabilidad por exclusión de azul de Trypan. Las determinaciones se realizaron por duplicado en tres experimentos independientes y los resultados se compararon con los controles (amibas normales).

Eritrofagocitosis

Se incubaron 5×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* virulenta crecida 72 horas con E-64 (500 M), con 5×10^6 eritrocitos frescos de hámster durante 15 minutos en presencia de 250 M de E-64. Enseguida esta suspensión se centrifugó a 3,000 rpm., el precipitado se resuspendió en 0.2 mL de agua destilada e inmediatamente se le adicionó 1 mL de formaldehído al 4% en PBS. El mismo procedimiento se hizo con las amibas virulentas, pero en ausencia de E-64 (control). Después de dos horas los trofozoítos se lavaron con PBS y se contó el número de eritrocitos presente en cada amiba. Las determinaciones se hicieron en cien trofozoítos, por triplicado y en seis experimentos diferentes. Se consideró alta fagocitosis cuando los trofozoítos contenían cinco o más eritrocitos. Además, en ambos grupos se evaluó la eritrofagocitosis disolviendo los precipitados (amibas y eritrocitos) con 1 mL de ácido fórmico al 50% y determinando las absorbancias a 397 nm.⁶³

Actividad hemolítica de *E. histolytica*

Se incubaron eritrocitos frescos de hámster lavados con PBS con amibas cultivadas por 72 horas con E-64 y en presencia de 250 M de E-64 o con amibas sin E-64, en 1 mL de PBS. Después de la incubación por una hora a 37 °C (1:2000 eritrocito:amiba), los tubos se centrifugaron a 5,000 rpm durante cinco minutos y las absorbancias de los sobrenadantes se detectaron a 570 nm. Estas observaciones se hicieron por duplicado en tres experimentos independientes.¹³

Actividad proteolítica inhibible por E-64

La actividad proteolítica de 5×10^5 trofozoítos amibianos congelados en PBS, se determinó mediante la téc-

nica de azocaseína,⁵⁹ tanto en trofozoítos control como en trofozoítos cultivados 72 horas con E-64 y lavados cuatro veces con PBS.

Zimogramas de trofozoítos amibianos crecidos en E-64

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

Detección de actividad proteolítica intracelular en trofozoítos amibianos vivos

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

Resistencia eléctrica transepitelial

El daño a monocapas de células MDCK se evaluó con una cámara de "Ussing", determinando los cambios en la resistencia eléctrica transepitelial 30 min después de la adición de amibas cultivadas 72 horas con E-64 y en presencia del mismo inhibidor (500 μ M), con una relación de 5:1 célula: amiba, como lo ha descrito López-Vancell, *et al.*⁶⁵

Absceso hepático amibiano en hámsters

El absceso hepático amibiano se indujo en cuatro diferentes grupos de hámsters de ambos sexos de 100 g de peso (ocho animales por grupo). Se inyectaron trofozoítos axénicos de *E. histolytica* ($5 \times 10^5/0.2$ mL PBS) en la vena porta de hámsters anestesiados con pentobarbital (6.3 mg/100 g). Los animales se sacrificaron después de cinco días con una sobredosis de éter, el hígado se fragmentó en pequeños trozos, se fijó por 48 horas con for-

maldehído al 10% en PBS y se procesó para histología. Se hicieron cortes de 4-6 μ m de los bloques de parafina que contenían todos los lóbulos del hígado y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E), y mediante la reacción de Schiff (PAS). Además, dos de los grupos tratados se inyectaron cada 12 horas durante todo el experimento con 2 mg de E-64 por vía intraperitoneal, ya que se ha establecido que la vida media del E-64 activo inyectado en roedores es de 12 horas.⁶⁶

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

Obtención de hepatocitos

Los hepatocitos se obtuvieron mediante la perfusión portal del hígado de un hámster normal y otro del grupo 4 (tratado por cinco días) con 50 mL de EDTA 0.5 mM en solución de Hanks, seguido de 100 mL de medio Williams E sin suero y con 100 mg de colagenasa bacteriana. Después de la perfusión, el hígado colapsado se filtró a través de una gasa, con medio Williams E y los hepatocitos vivos se obtuvieron en un gradiente de Percoll.⁶⁷ Finalmente la actividad intracelular de proteasas de cisteína en los hepatocitos vivos se detectó con el sustrato AMNP como se describe arriba.

Inyección de *E. histolytica* en hámsters leucopénicos

Cuatro grupos de cuatro hámsters *c/u* se expusieron a 800 rads de radiación gamma en un irradiador de ⁶⁰Co, y se determinó el número de leucocitos circulantes a las seis, 12, 24 horas y dos, tres y siete días. Para esto, la sangre obtenida por punción cardiaca se diluyó 10 veces con una solución de ácido acético al 3% con violeta de genciana y los leucocitos (en azul) se contaron en un hematocitómetro. Después de 48 horas, a cada uno de ellos se le inyectó 1 mL de glucógeno al 1% en PBS por vía intraperitoneal (para secuestrar a los leucocitos circulantes residuales), y tres horas después recibieron 0.5×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* por vía intraportal. Posteriormente, estos grupos se sacrificaron a tres, seis, 24, 48 y 96 horas, los hígados se extirparon, se procesa-

ron para histología como se menciona arriba y se tiñeron con H y E y PAS. Paralelamente, otros animales sin irradiar se trataron de la misma forma (controles). En ambos grupos (controles y radiados) antes de ser sacrificados, se cuantificó el nivel de leucocitos en sangre periférica como se menciona arriba. Para demostrar la isquemia en el hígado, todos estos animales recibieron 0.2 mL de tinta china (dializada previamente con PBS) por vía intraportal antes de ser sacrificados.²⁷

Isquemia focal hepática inducida con microesferas de superdex

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

Hipocomplementemia inducida con FHVC

El factor hipocomplementémico del veneno de cobra (FHVC) se purificó a partir del veneno crudo de *Naja haje* (Sigma) de acuerdo al procedimiento de Sharma, *et al.*⁶⁸ que involucra cromatografía de filtración molecular e intercambio iónico. La eficiencia hipocomplementémica del FHVC se determinó por su capacidad para reducir los niveles del complemento del suero de hámster y por su actividad citolítica sobre las amibas *in vitro* (0.5×10^6 /mL durante dos horas). El suero de los animales se obtuvo 24, 48 y 72 horas después de la inyección de 40 μ g de FHVC por vía intraperitoneal.⁶⁹ El nivel de complemento se determinó en los sueros de los hámsters normales y en los que recibieron FHVC mediante la hemólisis de eritrocitos de carnero sensibilizados (UH50%) como lo describen Morrison y Kline.⁷⁰ El experimento se realizó inyectando 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* virulenta por vía intraportal en 12 grupos de hámsters (cuatro animales en c/u) normales, hipocomplementémicos y leucopénicos + hipocomplementémicos. Cada grupo de animales se sacrificó a seis, 24, 48 y 72 horas. Para localizar las zonas isquémicas en el hígado, a todos los animales se les inyectó 0.2 mL de tinta china por vía intraportal 5 minutos antes del sacrificio. Los hígados se fijaron con formol, se procesaron para histología y se tiñeron con PAS como arriba se menciona.

Inducción de inmunosupresión química en hámsters

La inmunosupresión en cuatro hámsters se indujo inyectando ciclosporina A (1 mg/100 g) diluida en aceite de olivo, por vía intraperitoneal cada 24 horas durante tres días.⁷¹ La inmunosupresión se verificó incubando las células de bazo en medio RPMI en placas de 96 pozos con 5×10^5 células y 0.1 μ g de Concanavalina A en cada pozo. La placa se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 48 horas. Enseguida se adicionó ³H-Timidina (1 Ci/pozo) y la placa se incubó nuevamente por 18 horas. Al final, las células se cosecharon y la incorporación de ³H-Timidina se determinó en un contador de centelleo. Trofozoítos de *E. histolytica* virulenta (1×10^6) se inyectaron en un grupo de hámsters normales (cuatro) y en el grupo inyectado con CsA (tres días antes y durante la infección). Todos los animales se sacrificaron siete días después de la inyección de los parásitos, los hígados se procesaron por histología y los cortes se tiñeron con PAS.

REFERENCIAS

1. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases* 1986; 8: 228-38.
2. World Health Organization. Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiologic Record* 1997; 72: 97-100.
3. Huston CD, Haque R, Petri WA. Molecular-based diagnosis of Entamoeba histolytica infection. *Exp Rev Mol Med* 1999; 22. March, <http://www.expertreviews.org/99000599h.htm>
4. Pérez-Tamayo R. Pathology of amebiasis. In: Amebiasis. Martínez-Palomo A (ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1986, p. 45-9.
5. Pérez-Tamayo R, Becker I, Montfort I, Pérez-Montfort R. Pathobiology of amebiasis. In: Amebiasis. Infection and disease by Entamoeba histolytica. Kretschmer R (ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press; 1990, p. 123-57.
6. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Reviews* 2000; 13: 318-31.
7. Tsutsumi V, Ramirez-Rosales A, Lanz-Mendoza H, Shibayama M, Chavez B, Rangel-López E, Martínez-Palomo A. Entamoeba histolytica: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 86(2): 170-2.
8. Stanley SL, Reed SL. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions VI. Entamoeba histolytica: parasite-host interactions. *Am J Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001; 280: 1049-54.
9. Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell* 2003; 2: 501-9.
10. Lushbaugh WB, Hofbauer F, Pittman FE. Entamoeba histolytica: purification of cathepsin B. *Experimental Parasitology* 1985; 59: 328-36.
11. Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. *J Experimental Medicine* 1986; 163: 536-49.

12. Montfort I, Pérez-Tamayo R, Pérez-Montfort R, González A, Olivos A. Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 1994; 80: 607-13.
13. Ankrí S, Stolarsky T, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular Microbiology* 1998; 28(4): 777-85.
14. Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cellular Microbiology* 2001; 3: 13-20.
15. Stanley SL, Shang T, Rubin D, Li E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity* 1995; 63(4): 1587-90.
16. Li E, Yang WG, Zhang T, Stanley SL. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infection and Immunity* 1995; 63(10): 4150-3.
17. Navarro-García F, Chávez-Dueñas L, Tsutsumi V, Posadas del Río F, López-Revilla R. *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Experimental Parasitology* 1995; 80: 361-72.
18. Ankrí S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infection and Immunity* 1999; 67(1): 421-2.
19. Zhang Z, Ya L, Wang L, Seyde KB, Li E, Ankrí S, Mirelman D, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Molecular Microbiology* 2000; 37(3): 542-8.
20. Molinari JL, Mejia H, White AC, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. *Taenia solium*: A cysteine protease secreted by metacystodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Experimental Parasitology* 2000; 94: 133-42.
21. Denis M, Chadee K. In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amoebiasis. *Infection and Immunity* 1988; 56(12): 3126-31.
22. De Meester F, Shaw E, Scholze H, Stolarsky T, Mirelman D. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 1990; 58(5): 1396-401.
23. North MJ, Mottramand JC, Coombs GH. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 1990; 6(8): 270-5.
24. Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2002; 120: 1-21.
25. Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors alter golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Science* 1998; 111: 597-606.
26. Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathology* 1984; 117: 81-90.
27. Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *International J Parasitology* 1992; 22(1): 125-9.
28. Wostmann C, Tannich E, Bakker-Grunwald T. Ubiquitin of *Entamoeba histolytica* deviates in six amino acid residues from the consensus of all other known ubiquitins. *FEBS Letters* 1992; 308(1): 54-8.
29. Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Molecular Microbiology* 1996; 22(2): 255-63.
30. Avila E, Calderón J. *Entamoeba histolytica* Trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Experimental Parasitology* 1993; 76: 232-41.
31. Luaces AL, Barrett AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Biochemistry* 1988; 250: 903-9.
32. McLaughlin J, Faubert G. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Canadian J Microbiology* 1976; 23: 420-5.
33. López-Revilla R, Canto-Ortiz L, Jiménez-Delgado B, Chávez-Dueñas L. Proteinases resistant to sodium dodecyl sulfate-induced autolysis of *Entamoeba histolytica* HK-9 trophozoites. *Parasitology Research* 1993; 79: 168-71.
34. Hellberg A, Leippe M, Bruchhaus I. Two major higher molecular mass proteinases of *Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999; 105: 305-9.
35. Jafri F, Husain S, Saleemuddin M. Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1993; 18: 401-8.
36. Khan SA, Iqbal J. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2000; 32: 89-94.
37. Cheng X, Tachibana H, Kaneda Y. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 2000; 85: 78-80.
38. Marinets A, Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL, Duchene M. Protection against invasive amoebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on a surface of *Entamoeba histolytica*. *J Experimental Medicine* 1997; 186(9): 1557-65.
39. Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infection and Immunity* 1994; 62(4): 1166-70.
40. Gupta S, Naik S, Naik SR. Vaccine potential of 56-66 kDa protease secreted by *Entamoeba histolytica*. *Indian Journal of Medical Research* 1999; 109: 141-6.
41. Reed SL, Keene W, McKerrow J. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(12): 2772-7.
42. Guerrero-Manríquez G, Sánchez-Ibarra F, Avila E. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 1998; 106: 1088-94.
43. Reed SL, Gigli I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J Clin Investigation* 1990; 86: 1815-22.
44. Tsutsumi V. Pathology of experimental amoebiasis. In: *Amoebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin JI (ed.). New York: John Wiley & Sons; 1988, p. 147-65.
45. Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsutsumi V, Calderón J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunology* 1998; 20: 255-62.
46. Gadasi H, Kobiler D. *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Experimental Parasitology* 2000; 55: 105-110.
47. Montfort I, Olivos A, Pérez-Tamayo R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 1992; 23(2): 177-9.
48. Leippe M, Sievertsen J, Tannich E, Hortsman D. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* 1995; 111: 569-574.
49. Serrano JJ, De la Garza M, Reyes M, León G, Tovar R, Muñoz ML. *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitology Research* 1996; 82: 200-5.
50. Ventura-Juárez J, Campos-Rodríguez R, Ramírez-Rosales A, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. Early in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with hepatic parenchymal and inflammatory cells of hamster. *Archives of Medical Research* 1997; 28: 211-13.
51. Rivero-Nava L, Aguirre-García J, Shibayama-Salas M, Hernández-Pando R, Tsutsumi V, Calderón J. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-deleted mice. *Experimental Parasitology* 2002; 101: 183-92.

52. Capín R, Capín NR, Carmona M, Ortiz-Ortíz L. Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. *Archivos de Investigación Médica (México)* 1980; 11: S1, 173-80.
53. Campbell D, Chadee K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitology Today* 1997; 13(5): 184-90.
54. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357: 695-7.
55. Soares MB, Santos RR. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Suppl. 1): 257-62.
56. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology* 2004; 20(11): 524-30.
57. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO, Apt AS. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infection and Immunity* 2005; 73(3): 1744-53.
58. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 1978; 72: 431-432.
59. Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1987; 26: 87-98.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
61. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-54.
62. Yoshioka T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano-and microspherical carriers of gelatin. *International J Pharmacology* 1981; 81: 131-41.
63. Keller F, Walter C, Lohden U, Hanke W, Bakker-Grunwald T, Trissl D. Pathogenic and non pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *J Protozoology* 1988; 35: 359-65.
64. Scholze H, Tannich E. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods in Enzymology* 1994; 244: 512-3.
65. López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Galactose-specific adhesion and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 2000; 86: 226-31.
66. Katunuma N, Kominami E. Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods in Enzymology* 1995; 251: 382-97.
67. Meredith M. Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. *Cell Biology and Toxicology* 1988; 4: 405-25.
68. Sharma S, Jabeen T, Singh RK, Bredhorst R, Vogel CW, Betzel C, Singh TP. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. *Acta Crystallographic Section D. Biol Crystallographic* 2001; 57: 596-8.
69. Van den Berg CW, Aerts PC, Van Dijk H. In vivo anti-complementary activities of the cobra venom factors from *Naja naja* and *Naja haje*. *J Immunology Methods* 1991; 136: 287-94.
70. Morrison D, Kline LL. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunology* 1977; 118: 362-8.
71. Carrero JC, Petrosian P, Olivos A, Sánchez-Zerpa M, Ostoa-Soloma P, Laclette JP. Effect of cyclosporine A on *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 2000; 31: S8-S9.
72. Montfort I, Pérez-Tamayo R, González CA, García de León MC, Olivos A, Tello E 1993. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the citopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. *Journal of Parasitology* 79(1), 98-105
73. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathology* 1988; 130: 112-19.