

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



# **Casa abierta al tiempo**

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

## **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA AMIBOPORO EN SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta

M. en C. Augusto José González Canto

Comité Tutoral

Codirectora: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Codirector: Dr. Ruy Pérez Tamayo

Asesora: Dra. María del Rosario López Vancell

Agosto 2017

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA AMIBOPORO EN SUERO DE PACIENTES CON ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO", que presentó.

**M. en C. Augusto José González Canto**

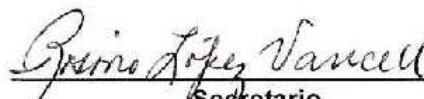
El día 31 de agosto del año 2017.

Sinodales



**Presidente**

Dra. Leticia Bucio Ortiz  
Lab. Fisiología Celular  
Depto. Ciencias de la Salud  
DCBS. UAM-Iztapalapa.



**Secretario**

Dra. María del Rosario López Vancell  
Unidad de Investigación en Medicina  
Experimental. Facultad de Medicina.  
UNAM.



**Vocal**

Dra. Laila Gutiérrez Kobeh  
Unidad de Investigación en Medicina  
Experimental. Facultad de Medicina.  
UNAM.



**Vocal**

Dr. Luis Fernando Olguin Contreras  
Departamento de Físicoquímica.  
Facultad de Química. UNAM.

## **Miembros del Comité Tutoral**

**Codirectora:** Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340. Ciudad de México.

**Codirector:** Dr. Ruy Pérez Tamayo

Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, *campus* Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, Dr. Balmis 148 Col. Doctores, C.P. 06726. Ciudad de México.

**Asesora:** Dra. María del Rosario López Vancell

Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, *campus* Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, Dr. Balmis 148 Col. Doctores, C.P. 06726. Ciudad de México.

**Dedicatoria:**

Martha

Augusto

Sacnicte

Dolores

Los quiero mucho.

## **Agradecimientos**

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz; Dra. María del Rosario López Vancell y

Dr. Ruy Pérez Tamayo, por apoyarme en consolidar mi formación académica.

A los miembros del Jurado:

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Dra. Laila Gutiérrez Kobeh

Dra. María del Rosario López Vancell

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Por el tiempo y espacio dedicado a la lectura de la tesis, como también sus  
acertados comentarios.

### **Agradecimientos a Título Personal:**

Dra. Alma Reyna Escalona Montaña

por su apoyo Técnico Académico en el proyecto de investigación.

M. en C. Adriana Ruiz Remigio, en el apoyo técnico de las ELISAs.

Dra. Cecilia Ximénez, por las críticas constructivas al trabajo de investigación.

Dra. Diana Del Callejo Canal, por su cooperación en el análisis estadístico.

Biol. Mario Nequiz, por proveer las amibas, la Dra. Patricia Moran por el suministro de los sueros de los pacientes con AHA y AHP, Dr. Jorge Ramírez, Q.F.B. Adriana Rodríguez, Dra. Pamela Gómez, I.B.T. Ruth Jiménez, Dr. Jesús Pérez por el apoyo en el laboratorio, y a la Ing. Angélica Serrano por la digitalización y edición de imágenes.

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT-DGAPA IN-219210

## Resumen

En México la amibiasis es una enfermedad endémica, forma parte de las principales enfermedades gastrointestinales y es considerada un problema de salud pública. La amibiasis es una infección causada por *Entamoeba histolytica*, un protozoo parásito que tiene como hábitat el intestino grueso; sin embargo, puede dar complicaciones fatales como la amibiasis hepática. En los últimos años los estudios de investigación se han enfocado en los factores de virulencia del parásito (principalmente lectinas, proteasas y amiboporos), así como en los métodos de diagnóstico de laboratorio. Si bien se han propuesto métodos de diagnóstico en el pasado, estos no han sido adecuados para la detección temprana del absceso hepático amibiano (AHA) en el humano.

El objetivo del estudio fue establecer la presencia de anticuerpos anti-amiboporo mediante inmunoensayo enzimático ligado a una enzima (ELISA) y el Western Blot (WB) en pacientes con sugerencia clínica de AHA. Para ello, se evaluaron 25 muestras de suero de pacientes del Hospital General de México que presentaron el diagnóstico clínico positivo para AHA y se consideraron las muestras obtenidas de otros 22 individuos para formar los 4 grupos control que se mencionan a continuación: 9 pacientes con absceso hepático piógeno (AHP), 3 pacientes con leishmaniasis, 3 pacientes con tripanosomiasis y 7 individuos sanos.

De los 25 pacientes previamente diagnosticados con AHA, el resultado mediante ELISA fue del 60% de la población y se obtuvo el mismo resultado en el ensayo de Western Blot (WB). El análisis estadístico con la Curva de Característica



Operativa del Receptor (ROC) mostró valores del 100% de sensibilidad y 100% de especificidad en la técnica de ELISA utilizando amiboporo puro como antígeno, donde esta prueba estadística representa la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo en la prueba. Por lo tanto, el ELISA es una buena opción para el diagnóstico sérico de AHA en pacientes con enfermedades hepáticas utilizando como antígeno al amiboporo.

## **Abstract**

In Mexico, amoebiasis is an endemic disease that belongs to the principal gastrointestinal diseases and is considered a public health problem. Amoebiasis is an infection caused by *Entamoeba histolytica*, a protozoan parasite which resides in the large intestine; although it can cause fatal complications such as hepatic amoebiasis. In the last years research has focused in the factors of virulence of the parasite (mainly lectins, proteases and amoebapore), as well as diagnostic methods. Although different diagnostic methods have been proposed in the past, they have not resulted fully suitable to detect early amoebic liver abscess (ALA) in human.

The objective of this study was to establish the presence of antibodies anti-amoebapore through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot (WB) in patients with clinical suggestion of ALA. For this, we were evaluated 25 samples of serum of patients of the Hospital General de México, which presented the positive clinical diagnosis for ALA and were considered the samples of other 22 patients so we could shape (array) 4 test sets: 9 patients with pyogenic liver abscess (PLA), 3 patients with leishmaniasis, 3 patients with trypanosomiasis and 7 healthy patients.

Of the previously 25 patients diagnosed with ALA, the ELISA result was 60% of the population and the same result was obtained in the Western Blot (WB) assay. The statistic results with a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve show values of 100 % of sensitivity and 100 % of specificity with the ELISA assay using

pure amoebapore as antigen, this statistic analysis represents the probability of a healthy patient to obtain a negative result in the assay. Therefore, the ELISA assay is a suitable option for the serum diagnosis of ALA in patients with hepatic disease using amoebapore as antigen.

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AHA</b>	Absceso hepático amibiano
<b>AHP</b>	Absceso hepático piógeno
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Blast</b>	The basic local alignment search tool
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CA</b>	Clan CA
<b>CHO</b>	Ovario del hámster chino
<b>CIEF</b>	Contrainmunolectroforesis
<b>CRD</b>	Sitio de reconocimiento del azúcar
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCR</b>	Sitio de reconocimiento del carbohidrato
<b>DID</b>	Dobleinmunodifusión
<b>E</b>	Entamoeba
<b>E-64</b>	<i>trans</i> -epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-guanidino)butane / <i>trans</i> -epoxisuccinil-L-Leucilamido-(4-guanidino)butano
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EhPCs</b>	Proteasas de cisteína de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático ligado a una enzima
<b>EMS</b>	Servicio médico experimental
<b>FCH</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>GalNAc</b>	N-acetil-D-Galactosamina

<b>Gal/GalNAc</b>	Galactosa/N-acetil-D-Galactosamina
<b>GPI</b>	Acil-glicosil-fosfatidilinositol
<b>GRASP</b>	Programa de análisis gráfico rápido de estructuras
<b>HAI</b>	Hemaglutinación indirecta
<b>EF</b>	Inmunoelectroforesis
<b>IFF</b>	Inmunofluorescencia
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de potasio
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MAPK</b>	Protein-cinasas activadas por mitógenos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mg</b>	Miligramos
<b>µg</b>	Microgramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µm</b>	Micrometro
<b>NK</b>	Natural killer / Asesinas naturales
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis / Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS-A</b>	Phosphate buffered saline / Amortiguador de fosfato salino amibiano
<b>PCs</b>	Proteasas de cisteína
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa

<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PGM</b>	Fosfoglucomutasa
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride / Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPDK</b>	Dicinasa fosfato piruvato
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rPPDK</b>	Dicinasa fosfato piruvato recombinante
<b>ROC</b>	Receiver operating characteristics curves / Curva de característica operativa del receptor
<b>s</b>	Segundos
<b>SAPLIP</b>	Proteínas de saposina
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate / Dodecil sulfato sódico
<b>SH</b>	Sueros de humanos
<b>SREHP</b>	Proteína recombinante de proteína rica en serina
<b>TAC</b>	Tomografía computarizada
<b>TCD4+</b>	Linfocitos T CD4+
<b>Th2</b>	Linfocitos T de ayuda, perfil de citosinas 2
<b>Tris</b>	2-Amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol
<b>TMB</b>	Peroxidase substrate / Sustrato de tetrametilbenzidina para peroxidasa
<b>TYSGM-9</b>	Trypticase-yeast extract-serum-gastric-mucin / Tripticaseina-extracto de levadura, suero-gástrico-mucina
<b>TYI-S-33</b>	Trypticasein, yeast, iron serum / Tripticaseina, levadura, hierro, suero y ensayo # 33
<b>VSG</b>	Velocidad de sedimentación globular

## **Índice**

### Páginas

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Amibiasis.....	3
2.2. Epidemiología de la amibiasis.....	3
2.3. Biología de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	5
2.3.1 El ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	5
2.3.2 Quistes.....	7
2.3.3 Trofozoitos.....	7
2.4. Patología de la amibiasis.....	9
2.4.1. Lectinas.....	10
2.4.2. Proteasas de cisteína.....	12
2.4.3. Amiboporos.....	16
2.5. Amibiasis hepática.....	22
2.6. Respuesta inmune humoral a la amibiasis.....	24
2.7. Métodos de diagnóstico de laboratorio para <i>Entamoeba</i> .....	26
2.7.1. Métodos microscópicos (fotónico).....	28
2.7.2. Métodos bioquímicos: cultivos y zimogramas.....	29
2.7.2.1 Cultivos.....	29
2.7.2.2 Zimogramas.....	30
2.7.3. Detección por anticuerpos.....	30
2.7.4. Detección por antígenos amibianos.....	33

2.7.5. Ensayo de diagnóstico con base en biología molecular.....	33
2.7.5.1 Prueba de biología molecular por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	35
3. Justificación.....	37
4. Hipótesis.....	37
5. Objetivo General.....	37
6. Objetivos Particulares.....	38
7. Material y Métodos.....	39
7.1. Diagrama de flujo.....	39
7.2. Cultivo amibiano axénico cepa HM-1:IMSS virulenta.....	40
7.3. Cosecha de trofozoítos.....	40
7.4. Proteínas a partir de trofozoítos.....	40
7.5. Determinación de concentración de proteína.....	41
7.6. Determinación de la actividad de porina amibiana.....	41
7.7. Purificación del amiboporo.....	42
7.8. Cromatografía.....	42
7.9. Electroelución.....	43
7.10. Secuenciación aminoacídica del amiboporo.....	43
7.11. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra amiboporo A.....	44
7.12. Purificación de IgG's anti-amiboporo del suero de los conejos.....	44
7.13. Ensayo de especificidad de las IgG's anti-amiboporo sobre extractos de <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Leishmania mexicana</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	45



7.14. Sueros humanos (SH).....	45
7.15. ELISA.....	46
7.16. Western Blot (WB) del amiboporo y los sueros humanos.....	47
7.17. Análisis estadísticos.....	47
8. Resultados.....	<b>48</b>
9. Discusión.....	<b>65</b>
10. Conclusiones.....	<b>71</b>
11. Perspectivas.....	<b>72</b>
12. Bibliografía.....	<b>73</b>
13. Anexos.....	<b>100</b>

## Figuras

Fig 1.	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	6
Fig 2.	Estructura de amiboporo A.....	17
Fig 3.	Modelo dimérico y hexamérico de amiboporo A.....	18
Fig 4.	Aspecto macroscópico de absceso hepático amibiano en humano.....	23
Fig 5.	Diagrama de flujo.....	39
Fig 6.	Cromatografía de las fracciones obtenidas por filtración molecular	48
Fig 7.	Curso temporal de la despolarización de liposomas por el lote 47-52 .....	49
Fig 8.	Columna de intercambio iónico por gradiente discontinuo.....	50
Fig 9.	Curso temporal de la despolarización de liposomas con amiboporo al 0.1 M de NaCl.....	51
Fig 10.	Inmunoelctrotransferencia del amiboporo.....	52
Fig 11.	Perfil electroforético del amiboporo purificado.....	53
Fig 12.	Curso temporal de la despolarización de los liposomas por amiboporo A.....	54
Fig 13.	Perfil de inmunoelctrotransferencia de lisado total de muestras parasitarias.....	57
Fig 14.	“Western Blot” que muestra identificación de amiboporo por anticuerpos específicos presentes en pacientes.....	62
Fig 15.	Curva ROC para los dos métodos de ELISAs.....	65

## Tablas

Tabla 1.	Características morfológicas de <i>E. histolytica</i> .....	8
Tabla 2.	Proteasas de cisteína de <i>E. histolytica</i> .....	15
Tabla 3.	Principales factores de virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	21
Tabla 4.	Comparación de métodos de diagnóstico de la amibiasis.....	36
Tabla 5.	Rendimiento obtenido en los diferentes pasos de la purificación del amiboporo.....	55
Tabla 6.	Resultados del análisis de la secuencia del amiboporo.....	56
Tabla 7.	Ensayo de ELISA utilizando como antígeno el extracto rico en membranas de trofozoítos amibianos.....	58
Tabla 8.	Identificación de antígeno por anti-amiboporo en 47 sueros analizados.....	61
Tabla 9.	Porcentajes de la población de sueros en el presente estudio.....	63
Tabla 10.	Matriz de decisión: ensayo ELISA (extracto proteico rico en membranas).....	64
Tabla 11.	Matriz de decisión: ensayo ELISA (amiboporo).....	64

## 1. Introducción

En 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) aceptó la existencia de amibas capaces de infectar al humano llamadas por su género y especie *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) potencialmente patógena, con capacidad para invadir el intestino humano, así como otros órganos (1,2) con características bioquímicas, inmunológicas y genéticas que la identifican.

Así también la OMS, define a la amibiasis como la infección ocasionada por *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas (1). Aproximadamente el 10% de los individuos infectados con *E. histolytica* desarrollaron síntomas clínicos asociados con patología intestinal y/o extraintestinal (3).

La infección por *E. histolytica* tiene un amplio espectro de modalidades clínicas en el hospedero humano, las que van desde la infección luminal del intestino que cursa totalmente asintomática, hasta las formas de infección invasora intestinal y extraintestinal. Un gran número de individuos colonizados por *E. histolytica* eliminan espontáneamente la infección en períodos relativamente cortos, algunos pueden ser portadores persistentes del parásito y permanecer infectados por largo tiempo, excretando quistes en las heces hasta por dos años (4).

En México la amibiasis es una enfermedad endémica, esto se pudo saber en una encuesta seroepidemiológica a nivel nacional que señalan alrededor del 8.41 % de la población posee anticuerpos séricos anti-amibianos, lo cual se relaciona con el alto grado de exposición de la población mexicana a *E. histolytica* (5,6).

La amibiasis forma parte de las 20 causas más frecuentes de enfermedad en nuestro país ocupando anualmente entre el 5° y el 7° sitio en dicha lista, considerándose un problema de salud pública (7). El grupo de personas más frecuentemente afectado por la enfermedad extraintestinal, como es el absceso hepático amibiano (AHA), es el hombre hacia la tercera y cuarta décadas de la vida, siendo hasta 10 veces más común en individuos de sexo masculino que en mujeres y rara vez se presenta en niños (8,9).

Esta infección, generalmente es el producto de factores interrelacionados que incluyen aspectos sociales, económicos, culturales, políticos e históricos. Por lo consiguiente la amibiasis afecta a miles de individuos y en el caso de no darle la importancia a un método de diagnóstico de laboratorio y aún más a un tratamiento temprano oportuno, dará lugar a complicaciones como el absceso hepático amibiano entre otras. Las principales moléculas amibianas con las que se ha correlacionado la virulencia de la amiba son: las adhesinas, los amiboporos y las proteasas de cisteína.

El objetivo de esta tesis es ensayar mediante 2 técnicas inmunológicas: Western Blot y ELISA, la presencia de anticuerpos anti-amiboporo en el suero de pacientes con AHA; de tal manera que se pudiera proponer como método de diagnóstico de dicha patología el uso del amiboporo en técnicas inmunológicas como las antes mencionadas.

Para llevar a cabo el objetivo se purificó el amiboporo y se generaron anticuerpos anti-amiboporo en conejos para la realización de las pruebas antes citadas.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Amibiasis**

Actualmente se reconoce que *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis humana y responsable de miles de muertes cada año a nivel mundial (10). La amibiasis es una de las infecciones parasitarias con una amplia distribución cosmopolita, que predomina en países en vías de desarrollo y en algunas regiones tropicales de América Latina, África y Asia. Se le considera a esta infección parasitaria, como la tercera o cuarta causa de mortalidad a nivel mundial, y como la tercera causa de morbilidad (9,11).

En países de América Latina, como México, la infección es atribuida a diversos factores como son: los hábitos culturales, los diferentes niveles de sanidad, así como las inadecuadas prácticas higiénicas de la población (10,12).

La amibiasis es transmitida por contaminación fecal en agua y alimentos, por contacto directo con manos sucias u objetos, contacto sexual anal y por higiene deficiente(13). De manera que su acción patógena puede producir desde infecciones intestinales asintomáticas, hasta disentería grave o aún más amibiasis invasora.

### **2.2. Epidemiología de la amibiasis**

La amibiasis es la causa de morbi-mortalidad en personas de muchos países en vías de desarrollo y continúa siendo un problema de salud pública. Esta infección, es el resultado de factores interrelacionados, como previamente se ha mencionado. Se tiene un reporte del año de 1986 de Walsh (2), donde

señala que aproximadamente el 10% de la población, a nivel mundial, se encuentra infectada por *E. histolytica* y se estima que va de 40,000 a 100,000 enfermos que mueren a consecuencia de complicaciones (9,11). Las cifras anteriormente mencionadas probablemente sobrevalúan la prevalencia de infección de *E. histolytica* ya que fueron obtenidas antes de la discriminación entre *E. histolytica* patógena y *E. dispar* no patógena, respectivamente. En México, la amibiasis está dentro de las 20 principales causas de enfermedad en la población (14).

Los estados de la República Mexicana que muestran el mayor número de casos nuevos de amibiasis son: Estado de México, Morelos, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, Tabasco, Yucatán y Chiapas (15).

Un estudio seroepidemiológico realizado en nuestro país reportó que el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amibianos, lo que demuestra la alta frecuencia de infección por este parásito en nuestro medio (5). La tasa de morbilidad en México por amibiasis intestinal en el periodo de 1995 a 2000 se ubicó entre 1,000 y 5,000 casos /100,000 habitantes con pocas variaciones anuales en la distribución por edad y género (6). Los valores de incidencia en el periodo 2002 a 2006 se encuentra entre 1,128.8 y 615.84 /100,000 habitantes.

En el periodo de 1995-2000 se alcanzaron valores de incidencia del AHA hasta de 39 casos /100,000 habitantes (1997) con tasas promedio de 10 /100,000 habitantes (14), en cuanto a la distribución por rango de edad, podemos señalar que las tasas más altas correspondientes a niños menores de 5 años, muestran valores muy cercanos a las tasas obtenidas en adultos entre 20-60 años de edad.

Desafortunadamente los datos sobre las tasas de incidencia por absceso hepático amibiano en el país no van más allá del 2002, año en el cual se alcanzaron valores de 3.8 casos/100,000 habitantes, para la forma de absceso hepático amibiano.

En los casos de los viajeros de corto plazo, puede ocurrir la enfermedad de absceso hepático amibiano, en un lapso de cuatro días y también existen reportes de dicha enfermedad en un tiempo de seis semanas, en zona endémica (16).

### **2.3. Biología de *Entamoeba histolytica***

Para el protozooario patógeno *E. histolytica* podemos demarcar principalmente dos etapas bien establecidas: como quiste, que es la forma infecciosa, no móvil y resistente; y como trofozoíto, que es la forma invasiva y móvil (17).

#### **2.3.1 El ciclo de vida de *E. histolytica***

Se distribuye por vía oral-fecal, la infección amibiana es iniciada por la ingesta de quistes maduros, que pueden provenir de alimentos o líquidos contaminados con heces, las paredes de los quistes son reblandecidas por los jugos gástricos, donde puede vivir y dividirse celularmente de manera indefinida, en ocasiones los trofozoítos entran al torrente sanguíneo y se diseminan a otros órganos, más comúnmente al hígado. Los quistes y trofozoítos pueden ser expulsados con las heces y pueden permanecer viables, según las condiciones ambientales, aunque el quiste tiene una mayor posibilidad de sobrevivencia (9,18) (Figura 1).



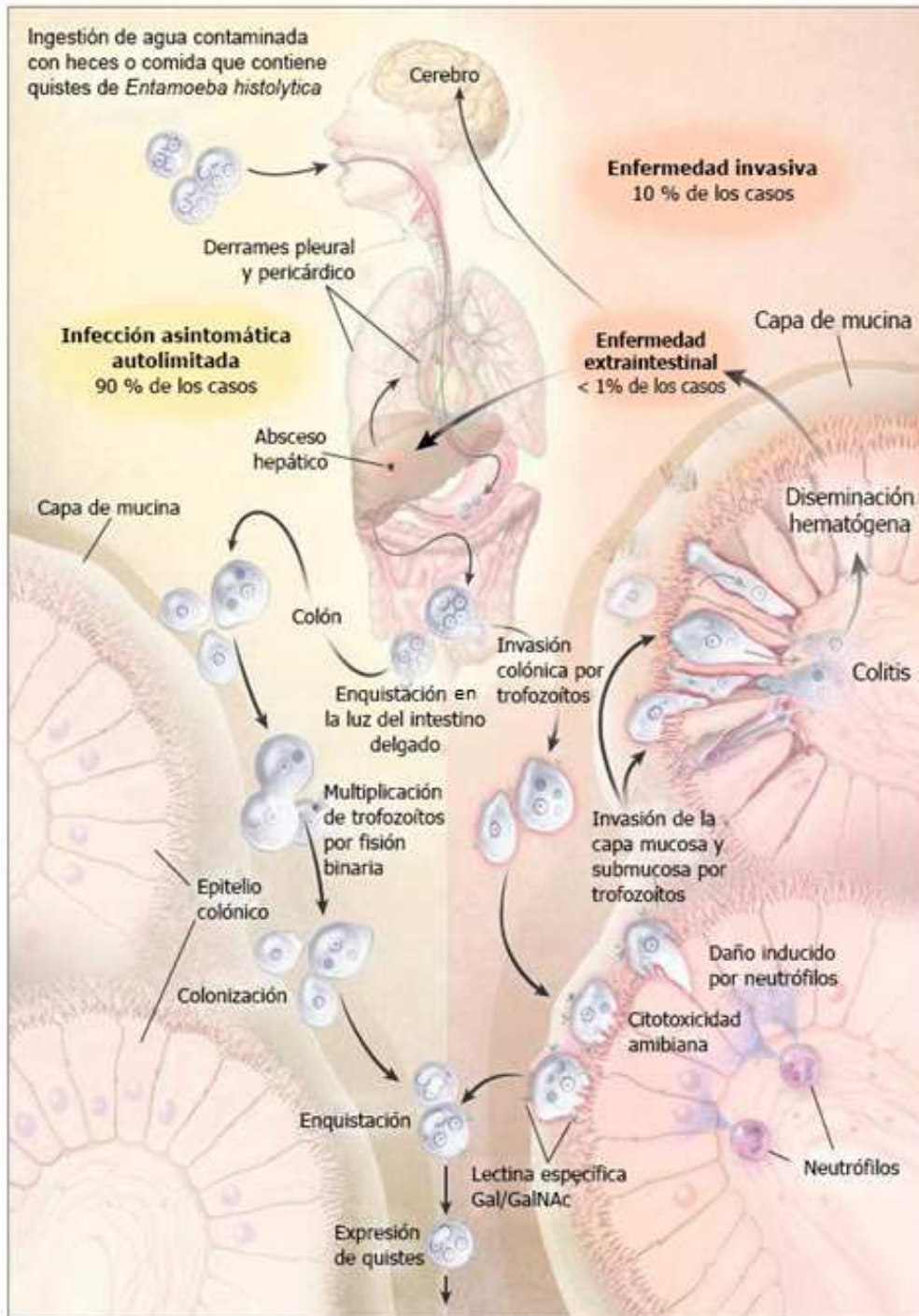


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. Haque R y col. (2003).

### **2.3.2 Quistes**

Son de estructura reducida de 5-10 $\mu$ m, se recubre de una pared de quitina lisa de 0.6  $\mu$ m sumamente resistente al jugo gástrico (9,19); en el citoplasma pueden presentarse cuerpos cromatoidales alargados (18  $\mu$ m) y de bordes curvos (menos de diez) solamente hay vacuolas de glucógeno.

Presentan, según su estado de madurez, de uno a cuatro núcleos, el cariosoma es pequeño, concentrado y usualmente con localización central. Los quistes pueden tener una viabilidad de semanas, mueren por ebullición, desecación, por exposición a la luz solar, calor y exposición al yodo. Cuando los quistes llegan al intestino comienza la división celular para dar como resultado la generación de trofozoítos (20).

### **2.3.3 Trofozoítos**

Son pleomórficos, de dimensión variable, fluctúan entre 10 a 60  $\mu$ m con movimientos típicos de la amiba, la emisión de manera rápida de pseudópodos digitiformes, alargados y anchos (lobópodos) (21,22).

El trofozoíto presenta una marcada diferencia entre el ectoplasma, que es periférico y hialino, transparente, retráctil; los lobópodos son prolongaciones del ectoplasma, que proporcionan movilidad (22), mientras que el endoplasma contiene una cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso. Se observa el núcleo redondo, vesiculoso, sin posición fija del endoplasma, de 5 a 7  $\mu$ m de diámetro, con la cromatina regularmente distribuida. También se presentan abundantes vesículas, vacuolas y lisosomas. No poseen mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, centriolos y citoesqueleto de microtúbulos (22).

Los trofozoítos de las lesiones intestinales son grandes con undiámetro entre 20 a 40  $\mu\text{m}$ , a diferencia de los que se encuentran en heces no disentéricas que tienen de 10 a 30  $\mu\text{m}$ ., esta forma móvil habita en el colon y sobrevive poco tiempo fuera del organismo, mueren rápidamente con el ácido clorhídrico y enzimas digestivas, y por estas razones no son importantes en la transmisión de la enfermedad.El trofozoíto se reproduce por división binaria, tanto en el intestino y otros órganos del hospedero, como *in vitro*.

Finalmente se mencionan las principales características de *E. histolytica* en la tabla 1.

**Tabla 1. Características morfológicas de *E. histolytica*. Robert G.L. (2008).**

Nombre	Trofozoíto	Quiste	Observaciones
Tamaño:	12-60 $\mu\text{m}$ (15-30)	+10-20 $\mu\text{m}$ (12-15)	Especie patógena
Citoplasmas:	Ectoplasma transparente, seudópodos "digitiformes" de emisión rápida.	Redondeado	En preparaciones directas
Movilidad:	Progresiva y direccional. Endoplasma finamente granuloso. Inclusiones, contiene eritrocitos.	Vacuolas de glucógeno y barras cromatoidales con extremos rombos.	los trofozoítos puede confundirse con macrófagos.
Núcleo:	Pequeño, cariosoma central puntiforme y cromatina periférica fina de distribución uniforme.	1-4 núcleos con las mismas características que el trofozoíto. Quiste maduro: 4 núcleos.	

## **2.4. Patología de la amibiasis**

Dentro de las primeras narraciones médicas de la patología de la amibiasis tenemos a S. Kartulis (1886), W. Osler (1980), T. Councilam y H. Lafleur (1891) y muchos más que extendieron los estudios anatopatológicos; y hasta inicios del siglo XXI por H. Brandt y R. Pérez Tamayo (22).

Por otro lado, no podemos dejar de mencionar los modelos experimentales de la amibiasis, que han contribuido con los avances fundamentales para el entendimiento de las enfermedades inducidas por las amibas.

La amibiasis puede ser sintomática y asintomática, la amibiasis sintomática es primariamente una enfermedad intestinal, y cuando se vuelve extraintestinal generalmente afecta el hígado.

De acuerdo con su sintomatología variable, la amibiasis intestinal puede producir una amplia variedad de alteraciones anatómicas. Las correspondientes a cuadros clínicos bien definidos se conocen como colitis ulcerativa amibiana, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano, y apendicitis amibiana. En cambio, la amibiasis hepática se caracteriza por la presencia de una o más áreas grandes de necrosis y/o "abscesos". Además, la amibiasis extraintestinal puede afectar a casi todos los órganos del cuerpo; las localizaciones distintas al intestino y al hígado son muy raras y generalmente ocurren en sujetos gravemente parasitados (23).

Actualmente la enfermedad amibiana se considera como un proceso de comportamiento multifactorial, en donde la patogénesis implica varios

mecanismos, como son: a) flora de microorganismos, b) adherencia, c) muerte dependiente de contacto, d) actividad enzimática, e) fagocitosis.

En la patogenia de la amibiasis producida por *E. histolytica* se identifican varios elementos a nivel molecular tales como las lectinas presentes en la superficie del trofozoíto; una familia de proteínas formadoras de poros; así como un conjunto múltiple de enzimas con actividad proteolítica, entre otros. Estos son los factores mayores de la virulencia, causales de la lisis, la muerte, la destrucción de diferentes células y tejidos del hospedero

#### **2.4.1. Lectinas**

El primer evento de la invasión del tejido intestinal o hepático por *E. histolytica* es su contacto y adhesión a las células del hospedero. En la adhesión participan moléculas específicas del parásito llamadas adhesinas o lectinas, que tienen funciones importantes dentro de la patogénesis amibiana. Una de las moléculas ampliamente caracterizadas es la lectina Galactosa/N-acetil-D-Galactosamina (Gal/GalNAc) (24). La lectina Gal/GalNAc se compone de un heterodímero de 260 kDa; que está unido por puentes disulfuro y que cuando se reduce con  $\beta$ -mercaptoetanol, se disocia para dar lugar a dos subunidades: una pesada de 170 kDa y una ligera 35/31 kDa (25), éste está asociada no covalentemente con una subunidad intermedia de 150 kDa (26).

La subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc se secuenció (27) y está constituida por 1,291 residuos aminoacídicos, de los cuales 26 corresponden al dominio transmembranal, 41 al dominio citoplásmico y el resto corresponde a la región extracelular, rica en residuos de cisteína, en la que se encuentra el dominio de reconocimiento del carbohidrato (DRC). La familia de genes de la

subunidad pesada está conformada por cinco genes, cuyos productos muestran una homología del 89-95% (28).

La subunidad ligera está representada por 6-7 genes que codifican isoformas con diferentes modificaciones postraduccionales y que muestran un 79-85% de homología entre ellos. Las principales isoformas de la subunidad 35 y 31 kDa tienen prácticamente la misma composición aminoacídica (29,30) aunque la isoforma de 35 kDa carece de la terminación de acil-glicosil-fosfatidilinositol (GPI), presente en la isoforma de 31 kDa. Dicha terminación permite la asociación de esta subunidad a la membrana plasmática y su presencia parece ser indispensable para la formación del heterodímero (31), así como para la adherencia y virulencia del parásito (32,33).

Varios investigadores demostraron la inhibición de la adherencia de los trofozoítos amibianos a las células del ovario del hámster chino (CHO), empleando galactosa o GalNAc, pero no con otros monosacáridos, como N-acetilglucosamina, manosa o ácido sialico (32). La adherencia amibiana también fue inhibida para otros tipos celulares, como células epiteliales, eritrocitos y neutrófilos, entre otros (34,35).

Se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación, utilizando diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epitopes de las diferentes subunidades, ensayos de inhibición con galactosa o N-acetil-galactosamina, así como estudios de manipulación genética y otros ensayos más, que han sugerido que la lectina, induce citotoxicidad y participa en el evento citolítico además, se ha referido que en el dominio de reconocimiento de carbohidratos

(DRC) hay una secuencia de identidad con la secuencia del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) (36-48).

Por otra parte, se ha demostrado que esta lectina amibiana se une al complemento 8 y 9, interrumpiendo el ensamble del complejo sobre la membrana de los trofozoítos *E. histolytica*(33,49). Se han descrito otras lectinas en las amibas que están implicadas en la adherencia y que también son importantes;entre ellas están la lectina de superficie celular de 220 kDa (50)que se caracteriza por su inhibición de la adhesión en presencia de polímeros de N-acetil-glucosamina (51), y la adhesina de 112 kDa que fue descubierta mediante el uso de mutantes deficientes en adherencia (52). Esta última posee actividad enzimática de proteinasa de cisteína, por lo que podría también participar en la degradación de moléculas durante la invasión de los tejidos (53).

#### **2.4.2. Proteasas de cisteína**

Hasta ahora se conoce una gran variedad de proteasas que son producidas y secretadas en el entorno del tejido que invade *E. histolytica*.

Los estudios de proteinasas de *E. histolytica* se han realizado principalmente en la cepa HM-1:IMSS de trofozoítos en cultivos axénicos. La mayoría de los estudios celulares y moleculares de *E. histolytica*, incluyendo la secuencia genómica, se han realizado con esta cepa en todo el mundo. Han sido cultivadas durante años y se pasan a través del hígado de hámster, para mantener la virulencia (54).

Las proteasas de cisteína (PCs) son responsables de la actividad proteolítica, predominantemente asociada con la patogenicidad en *E. histolytica*, esto

basado en muchos estudios en los que se han investigado la degradación de los diferentes sustratos, incluyendo las proteínas purificadas de la matriz extracelular (MEC), inmunoglobulinas, complemento y mucina (tabla 2). Los estudios en modelos animales han confirmado que las PCs tienen un papel importante en la virulencia; los mutantes de *E. histolytica* con deficiencia en genes que codifican PCs tienen una capacidad disminuida para producir abscesos hepáticos (44,55). *EhPCs* se encuentran tanto intracelularmente, como secretadas al medio y se denominan enzimas de catepsina porque su estructura es similar a la de catepsina B (56-59). Algunas proteasas se encuentran asociadas a membrana(59).

Varios genes que codifican para PCs de *E. histolytica* han sido clonados, en específico se identificaron seis genes que codifican PCs (*EhPC1-EhPC6*). Las secuencias de nucleótidos de estos genes difieren en 40 al 85%, y tres de ellos (*EhPC1, EhPC2 y EhPC5*) mostraron los niveles más altos de expresión y son las principales proteasas que representan aproximadamente el 90% de la expresión de PCs. Un grupo de investigación analizó 79, de 86 genes que codifican proteasas, mediante hibridación de microarreglos (60) y sólo cerca de 50 genes PCs codifican para varias familias, de las cuales pertenecen al clan de CA, y en condiciones de cultivo, solo se observa, consistentemente, la expresión de solo 20 genes.

Todos estos genes codifican para proteasas de cisteína con pesos moleculares calculados principalmente entre 30 y 65 kDa (60).

De las *EhPCs* más estudiadas, sólo PC5 y PC112 están asociadas a la membrana y PC5 tiene un papel en la destrucción tisular (61,62). Se ha



sugerido que la capacidad de las proteasas de cisteína de degradar IgA, IgG, así como anafilatoxinas del complemento (C3, C3a y C5a), constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que exhibe el hospedero contra el parásito (63).

Las proteasas de cisteína han sido consideradas, en gran medida, las moléculas responsables del daño celular y tisular producido por la amiba, tanto en infecciones humanas como experimentales (57,63,64). Las actividades *in vitro*, reportadas de estas proteinasas purificadas son la degradación de colágena, elastina, fibrinógeno y laminina, los niveles de su expresión han sido correlacionados con la virulencia (65).

Por otro lado, se describió la destrucción de colágena humana, presentando mayor especificidad por la colágena tipo I (66). La colagenasa amibiana fue localizada en los gránulos electro-densos y mostró ser secretada activamente en el contacto con su sustrato (67). Con respecto a la respuesta inflamatoria inducida por la amiba, ésta se vincula con la expresión de IL1 $\beta$  e IL-8 y la afluencia de neutrófilos (68). Se ha reportado que cuando la actividad de PCs disminuye, el resultado es la no producción de citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  y IL-8 y por consiguiente hay menor inflamación intestinal y menor daño a la barrera de permeabilidad intestinal (69).

Las PCs pueden tener funciones importantes dentro del parásito, tales como digestión de las bacterias y glóbulos rojos; activación de otras enzimas ya que su inhibición puede impactar en la virulencia. Los trofozoítos deficientes de PC fueron menos virulentos utilizando el modelo del hámster en la inducción del absceso hepático amibiano y además, mostraron defectos en la fagocitosis

(44,70). Por último, un inhibidor específico e irreversible de las PCs, es el E-64, el tratamiento sostenido de los trofozoítos con éste disminuye la formación del absceso hepático (71).

**Tabla 2. Proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* que degradan proteínas del hospedero y sus implicaciones en la virulencia.** Serrano-Luna J. y col. (2003). Journal of Tropical Medicine.

Tejido o proteína blanco	Purificado	Nombre	Mr(kDa)	Comentario, Localización
<b>Colagena</b>	Si	EhCP1	27	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	EhCP2	26	<i>In vitro</i> , asociado a la membrana
	Si	EhCP112	35.5	<i>In vitro</i> (zimograma), superficie
	SI	EhCP5	30	<i>In vitro</i> (zimograma), y es esencial <i>in vivo</i> para la escisión de la red de colágeno, superficie
	Si	---	56	superficie
	No	---	72	<i>In vitro</i> , secretado
	Si	---	27-29	<i>In vitro</i> (zimograma) y extracto crudo
<b>Laminina</b>	Si	EhCP4	26	<i>In vitro</i>
	Si	---	56	<i>In vitro</i> , secretado y nuclear
	Si	---	27-29	<i>In vitro</i> , secretado
<b>Fibronectina</b>	Si	EhCP112	35.5	<i>In vitro</i>
	Si	---	56	<i>In vitro</i> (zimograma), superficie
<b>Gelatina</b>	Si	---	27-29	<i>In vitro</i> , secretado
	No	---	110, 68, 56 y 22	<i>In vitro</i> Inducido por colágeno, medio acondicionado
<b>Inmunoglobulinas</b>				
<b>IgA</b>	Si	EhCP4	26	<i>In vitro</i> , secretado y nuclear
	Si	---	70	<i>In vitro</i>
	Si	EhCP5	30	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	EhCP4	26	<i>In vitro</i> , secretado y nuclear

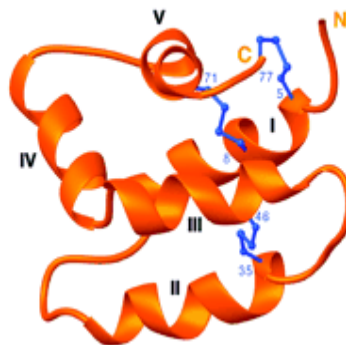
<b>IgG</b>	SI	EhCP1	27	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	---	56	<i>In vitro</i> , secretado
<b>Complemento</b>				
<b>C3</b>	Si	EhCP4	26	<i>In vitro</i> , secretado y nuclear
	Si	EhCP1	27	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	---	56	<i>In vitro</i>
<b>C3a y C5a</b>	Si	---	56	<i>In vitro</i>
<b>Citocina</b>				
<b>ProIL-18</b>	Si	EhCP4	26	<i>In vitro</i> , secretado y nuclear
	Si	EhCP5	30	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	EhCP1	27	<i>In vitro</i> , superficie
	Si	EhCP1	27	<i>In vitro</i> , superficie
<b>proIL-1<math>\beta</math></b>		EhCP2	26	<i>In vitro</i> , asociado a la membrana

### 2.4.3. Amiboporos

Los amiboporos son una familia de péptidos formadores de poros en la membrana de la célula blanco y se les atribuye un efecto citolítico.

La estructura tridimensional de alta resolución de un amiboporo natural purificado de una amiba patógena, fue esclarecida por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), los resultados revelaron que contenían 77 residuos de aminoácidos, con tres enlaces disulfuro intramolecular (72), similar a las proteínas como la saposina; un arreglo de 5 hélices (figura 2) que difieren marcadamente de la familia de proteínas, como las saposinas. El amiboporo presenta una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice (73). La estructura terciaria nativa del amiboporo revela un plegamiento de cinco hélices interconectadas por tres puentes disulfuro (74).

La actividad permeabilizante de los amiboporos es fuertemente dependiente del pH y depende en la protonación de un residuo de histidina. A un pH entre 4 y 6, el residuo de histidina favorece la dimerización de la proteína (figura 3a). La protonación del único residuo de histidina y el proceso de dimerización parece ser indispensable para la actividad, y además puede ser prolongada por tres dímeros, llevando a una estructura como de anillo con una superficie exterior hidrofóbica y un interior predominantemente hidrofílico; de ahí que se ha propuesto un modelo en donde el amiboporo actúa perforando a la membrana de la célula blanco (74), y que consiste en un poro hexamérico (figura 3b) que tiene un diámetro de 2 nm, de acuerdo con la información derivada de las mediciones biofísicas en bicapas lipídicas (75).



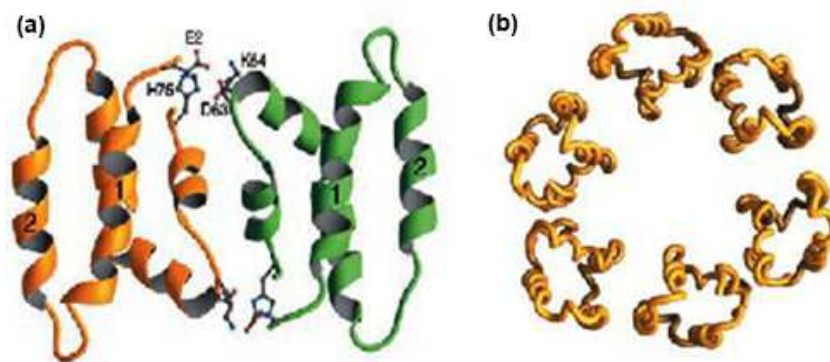
**Figura 2. Estructura de amiboporo A.** Una representación de la cinta de una estructura media-minimizada de energía. Los enlaces disulfuro se representan en azul y el extremo N terminal y C se etiquetan. Las hélices están numeradas por números romanos. Las figuras se generaron usando el programa GRASP.

Hecht, O y col (2004). The Journal of Biochemical Chemistry.

Las vesículas granulares, como lisosomas de *E. histolytica*, contienen una familia de tres miembros de amiboporos: A, B, y C, con un peso molecular de 8 kDa; los cuales causan formación de poros en membranas artificiales,

exhibición de actividad bacterial y citolítica hacia células nucleadas de humanos (72,75,76); las características esenciales estructurales se conservan en las tres isoformas que comparten entre 35 a 57 % de homología y se encuentran en una proporción de 35:10:1 en la cepa HM-1:IMSS (72).

En el colon de humanos hay una muy estrecha relación con la amiba no patógena, llamada *E. dispar*. *In vitro* *E. dispar* es también capaz de matar células huésped y ellas poseen ortólogos de amiboporo llamados porosdispar. Mientras que las isoformas menores de poro dispar B y C son apenas detectadas al nivel proteína, la isoforma principal poro dispar A, puede encontrarse en cantidades comparables con el amiboporo A de *E. histolytica*(77). La virulencia de un parásito puede ser resultado de múltiples factores, pero es notable en este caso, que haya sustancialmente menos actividad formadora de poro (56%) demostrado por el poro dispar A, cuando se compara con el amiboporo A.



**Figura 3. Modelos dimérico y hexamérico de amiboporo A.** (a) Una representación de la cinta de la proteína dimérica. Se representan cadenas laterales de aminoácidos responsables de interacciones electrostáticas intermoleculares. Hélice 1 y 2 forman la superficie hidrófoba (izquierda). (b) Representación columna vertebral de la proteína hexamérica para la formación de un poro. Estructura similar a un anillo modelado se

ve desde arriba. Las figuras se generaron usando el programa GRASP.

Leippe, M y col (2005). Trends in Parasitology.

De los 77 residuos, hay cuatro que difieren en las estructuras primarias entre el amiboporo A y en el poro *dispar* A. Observando a la estructura terciaria del amiboporo A, hay solamente un residuo diferente que parece ser significativo. El reemplazo del residuo de ácido glutámico, en posición dos, por prolina en poro *dispar* A, elimina una de las dos interacciones intermoleculares representadas en el modelo del dímero del amiboporo A. Este intercambio puede resultar de un dímero menos estable y por lo tanto puede afectar la eficiencia en la formación de poro por el poro *dispar* A.

Mediante técnicas de biología molecular utilizando ARN de interferencia se logró inhibir hasta un 60% la expresión del amiboporo A; los trofozoítos genéticamente manipulados causaron menor daño a células procariontes y eucariontes (78).

Por otra parte, se demostró que los trofozoítos de *E. histolytica* que carecen de amiboporo A, debido al silenciamiento transcripcional del gen codificador, se volvieron avirulentos (79), demostrando que esta proteína es un factor clave de patogenicidad del parásito. No obstante, el amiboporo no parece ser indispensable para la inducción de inflamación en un modelo experimental de colitis amibiana (80).

Por similitud de secuencia los amiboporos se han agrupado en la familia de las proteínas tipo saposina (SAPLIP)(81). Aunque los miembros de la familia SAPLIP tienen diferentes funciones biológicas, todos son capaces de interactuar con los lípidos. Con una excepción, todos ellos poseen seis

residuos de cisteína conservados, que están implicados en la formación del patrón de enlace disulfuro, característico de esta familia de proteínas (82). A pesar de la enorme distancia evolutiva, los amiboporos revelan una similitud de secuenciación sustancial con las moléculas efectoras permeabilizadoras de membrana de linfocitos de mamíferos, tales como la NK-lisina porcina y la granulicina humana. Al igual que los amiboporos son capaces de lisar bacterias y células eucariotas (80,83,84). Basados en información estructural y datos bioquímicos, se han sugerido varios mecanismos para explicar cómo las proteínas tipo saposina pueden formar poros de la membrana (85,86). Tanto para la NK-lisina como para la granulicina, se ha sugerido que la unión de las proteínas monoméricas a la membrana a través de sus epítomos cargados da como resultado la desestabilización de la bicapa lipídica (87,88), mientras que el mecanismo formador de poros el amiboporo A parece no ser el mismo (89). En cuanto al modo de acción de los amiboporos, éstos son fácilmente solubles en disolución, pero son capaces de cambiar a un estado insertivo en la membrana, por lo que tienen que enterrar extensas áreas de superficie hidrófoba, mientras exponen al mismo tiempo las cadenas laterales polares al agua. Sobre la unión a la membrana y a la inserción, los amiboporos tienden a oligomerizarse a entidades de mayor masa molecular; un proceso impulsado por la interacción péptido-péptido, como un entrecruzamiento químico (90). Hasta la conformación de tres pares de dímeros y formar el modelo de “varilla de barril” y permitir el mecanismo de inserción en la membrana y la difusión lateral para formar un canal lleno de agua a través del cual los iones y otras moléculas pequeñas, puedan pasar, de manera que el medio interno de la célula se altere totalmente, lo que finalmente resulta en su lisis (91).

Se agruparon las características principales de los tres factores de virulencia de *E. histolytica* en la tabla 3.

**Tabla 3. Principales factores de virulencia de *E. histolytica***

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Características</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<b>Gal/GalNAc-lectina de unión</b>	Adhesión celular, citotoxicidad dependiente del contacto, resistencia al complemento, citolisis y endocitosis, polimerización de actina.	Este factor de virulencia multifuncional desempeña papeles críticos e importantes en la patogenicidad del parásito y es un candidato particular para uso en el diagnóstico.	28,65,92,93
<b>Proteasas de cisteína</b>	Degradar las proteínas del hospedero, proporcionan uniones degradando el moco y estimulando las cascadas proteolíticas de las células blanco.	Son moléculas con posible papel en la promoción de la invasión.	65,94,95
<b>Amiboporo</b>	Almacenado en gránulos citoplásmicos y liberado después del contacto celular, forma canales de iones en las membranas tanto de células eucariotas como de bacterias fagocitadas.	Moléculas con función de citolisis de la célula blanco.	73,95



## 2.5. Amibiasis hepática

En general, los abscesos hepáticos amibianos humanos son únicos y se localizan principalmente en el lóbulo derecho, debido al flujo sanguíneosecundario de la vena porta, al hecho de que el lóbulo derecho también recibe su irrigación por la vena mesentérica superior. Y además, de que la mayoría del volumen hepático se encuentra en el lóbulo derecho.

La invasión del tejido es favorecida por la motilidad del parásito. El parásito cuenta con citoesqueleto dinámico de actomiosina y con moléculas de adhesinas en la superficie que facilitan su diseminación en los tejidos.

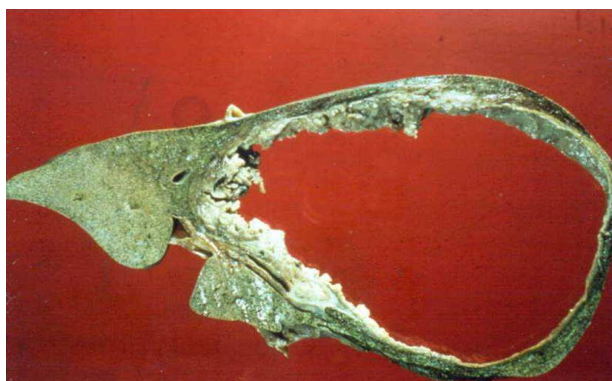
La miosina II es esencial para la motilidad de la *E. histolytica* a través de las células intestinales y hepáticas, mientras que las lectinas unidas a galactosa principalmente la lectina Gal/GalNAc, modula la distribución de trofozoítos en el hígado y su capacidad para migrar en el tejido hepático (96). Dicha lectina actúa como un antígeno de superficie que activa a las células endoteliales desencadenando la patología y la supervivencia del parásito. Las células estimuladas con lectina muestran un aumento inmediato en el  $Ca^{2+}$ , lo cual activa nucleótidos cíclicos y otras protein-quinasas llevando a la activación de la cascada de las protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la activación de esta vía está implicada en los eventos de apoptosis, proliferación, rearrreglos del citoesqueleto y cambios en la permeabilidad (47).

Los pasos iniciales en la invasión tisular incluyen la liberación de proteasas por los trofozoítos, los cuales son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular. La *E. histolytica* es un protozooario citotóxico con una extraordinaria capacidad para lisar a las células que lo rodean. La respuesta

inflamatoria (principalmente neutrófilos y macrófagos), iniciada por la invasión del parásito contribuye al daño tisular (97). Cuando la amiba es inoculada en el hígado se generan áreas de apoptosis dentro del absceso.

El absceso hepático amibiano se encuentra con mayor frecuencia en hombres de 20 a 40 años; sin embargo, puede presentarse a cualquier edad. Se ha descrito que los hombres tienen una susceptibilidad 10 veces mayor para desarrollar absceso hepático amibiano o disentería amibiana por *E. histolytica*, se ha encontrado que el suero de las mujeres es significativamente más efectivo para eliminar trofozoítos de *E. histolytica*, y que este proceso es dependiente del complemento (98).

El paciente con AHA presenta malestar general, anorexia, astenia, adinamia, fiebre de 39 a 40°C, escalofríos, sudoración profusa, hepatomegalia dolorosa y pérdida de peso. Los datos de laboratorio muestran anemia, leucocitosis y neutrofilia. Los métodos de imagenología; tomografía, gammagrafía, ecografía, resonancia magnética, etc., tienen gran utilidad en el diagnóstico de absceso hepático (99). En la figura 4 un corte transversal de un absceso de hígado amibiano de un paciente masculino.



**Figura 4. Aspecto macroscópico del absceso hepático amibiano en humano.**

Cortesía del Dr. Ruy Pérez Tamayo.

## 2.6. Respuesta inmune humoral en la amibiasis

Todavía se desconoce el lapso que transcurre entre la infección con *E. histolytica* virulenta y la aparición de anticuerpos locales (100). Sin embargo, los estudios de la inmunología humoral y celular de la amibiasis han avanzado significativamente, debido al desarrollo de los cultivos axénicos de *E. histolytica*(101), como también a la producción de diferentes clases de antígenos a partir de los mismos (102).

Es probable que la respuesta inmune contra *E. histolytica* ocurra cuando el trofozoíto invade los tejidos del hospedero. Tal vez en la primera fase participen las células inflamatorias aisladas en el lugar de la invasión, y en forma particular las que se encuentran en el margen de las úlceras amibianas, en donde interactúan de manera inevitable los antígenos amibianos y el sistema inmunológico.

Es ahí, donde se lleva a cabo el primer contacto con *E. histolytica*, cuando han actuado los neutrófilos, el complejo mayor de histocompatibilidad mediante el HLAII activando los linfocitos TCD4+, que a su vez inducen el contacto para los linfocitos B; y que previamente a esto hay secreción de citocinas por los fagocitos mononucleares, los linfocitos granulares grandes pero principalmente por los linfocitos TCD4+. Para el caso de *E. histolytica*, las citocinas secretadas es la IL-4 que a su vez activa la vía Th2 (Respuesta humoral) secretando IL-5 que estimula a los eosinófilos, IL-9 que activa a los mastocitos, IL-6, IL-13, IL-4 que activan a los linfocitos B que se diferencian en: a) células plasmáticas productoras de anticuerpos locales tipo IgA que se activan en las mucosas

digestivas y los anticuerpos sistémicos; como son IgM e IgG; b) células de memoria (103-105). Aun cuando la mayoría de los anticuerpos antiambianos parecen pertenecer a la clase IgG y en particular a la subclase IgG<sub>2</sub>(106).

Del 85 al 100% de sujetos con amibiasis invasora desarrollan anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA contra componentes de *E. histolytica*, en especial a aquellos que están expuestos en la membrana de la amiba o a diversos productos secretados por la *E. histolytica* que intervienen en su virulencia (107).

La lectina Gal/GalNAc induce la formación de anticuerpos de clase IgA y los que se encuentran en las secreciones tienen un papel protector, pero los de clase IgM, IgG e IgA del suero no ofrecen protección contra la reinfección por *E. histolytica*(107,108). A nivel experimental la administración de anticuerpos anti-*E. histolytica* de clase IgG no protege a los animales infectados con trofozoítos de *E. histolytica* (109). Los anticuerpos en suero pueden estar presentes por 3 y hasta 10 años, debido en parte a la persistencia de antígenos amibianos en el sistema fagocítico mononuclear y en las zonas endémicas por el contacto reiterado con las amibas, o sus antígenos (107,108,110).

La presencia de anticuerpo anti-*E. histolytica* indica un contacto con el parásito, pero no se puede establecer si la infección es reciente, o se presentó meses o años atrás (111). La concentración de IgGs anti-*E. histolytica* no se correlaciona con la gravedad de la enfermedad invasora intestinal, o hepática (109).

La IgA secretora anti-amibiana se encuentra en la saliva, en la leche materna y en las heces y esta IgA parece tener un efecto preventivo, en especial cuando

el antígeno amibiano es la lectina Gal/GalNAc, que al usarse como inmunógeno experimental da protección, pero el emplear péptidos inmunogénicos de la lectina la capacidad defensiva es menor. También la proteína rica en serina de *E. histolytica* contiene inmunoprotección (63,108,110).

La vía oral para introducir los inmunógenos de *E. histolytica* es más efectiva que la parenteral en la vacunación contra *E. histolytica*. En cultivos de *E. histolytica* al añadir las IgG anti-amiba se disminuye su proliferación y la eritrofagocitosis de *E. histolytica* y al agregar suero fresco (complemento) las amibas se destruyen (63,108), *E. histolytica* que permanece viva tiene el poder de unir los anticuerpos y el C3 (complemento) en la superficie de la membrana, movilizarlos a un polo de la célula y desprender fragmentos de la membrana con los anticuerpos y C3, evadiendo de esta manera la acción lítica de los anticuerpos y el complemento.

La respuesta humoral posterior a la invasión por *E. histolytica*, aparentemente ni cura ni previene la reinfección subsecuente (112-114) que puede ocurrir en presencia de títulos altos de anticuerpos.

## **2.7 Métodos de diagnóstico de laboratorio para *Entamoeba***

Durante varios años, los investigadores han estado buscando métodos que permitan una evaluación precisa y confiable de la amibiasis. Para el diagnóstico de la amibiasis intestinal se pueden realizar exámenes con microscopía fotónica que se basa en la identificación de los estadios del parásito (quiste y trofozoíto) del complejo *E. histolytica/E. dispar* en heces (115). Además, la especie patógena puede visualizarse en tejidos invadidos por

el proceso infeccioso. También a partir del cultivo *in vitro* se identifican por isoenzimas cepas patógenas y no patógenas, determinación de componentes antigénicos (por ejemplo, adhesina, amiboporo, proteasas) y con pruebas de biología molecular se diferencian el complejo *E. histolytica/E. dispar*, o bien a las diferentes especies.

Para el diagnóstico de la amibiasis extraintestinal hay diversas alternativas: los estudios imagenológicos como la radiología de tórax, ecografía hepática y de vías biliares, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM). Así mismo, mediante las pruebas de ELISA y WB se logra la determinación de anticuerpos en diferentes fluidos corporales como suero o saliva, y de antígeno en el fluido del drenaje percutáneo del absceso hepático.. Adicionalmente, a todo paciente con cuadro clínico sugestivo de amibiasis extraintestinal se debe solicitar pruebas hemáticas que pueden revelar leucocitosis con neutrofilia y elevación de velocidad de sedimentación globular (VSG); las enzimas hepáticas (alanina-aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y tiempo de protrombina) pueden estar aumentados, con disminución de la albúmina sérica, pero no permiten discriminar la etiología (116).

Por otro lado, hemos de recordar que el género de *Entamoeba* contiene varias especies, seis de las cuales (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. coli* y *E. hartmanni*) residen en el lumen intestinal humano. *E. histolytica* es la única especie que se encuentra asociada en forma definitiva y que causa secuelas patológicas en los seres humanos. Las otras amibas son consideradas no patógenas (117).

A continuación, se mencionan algunas pruebas de diagnóstico clínico, como son:

### **2.7.1. Métodos microscópicos (fotónico)**

Las técnicas de microscopía empleadas en el diagnóstico clínico convencional, incluyen preparaciones líquidas, técnicas por concentración y frotis teñidos permanentemente para la identificación de trofozoítos y quistes de *E. histolytica*/*E. dispar* / *E. moshkovskii* en materia fecal.

De los diversos métodos disponibles en los laboratorios de análisis clínicos, los de concentración por sedimentación están considerados como más sensibles que los de concentración por flotación. Sin embargo, ambos métodos son técnicamente complejos y consumen tiempo, además de que tienen la desventaja de utilizar reactivos volátiles e inflamables. Actualmente se implementó un método simple y rápido que consiste básicamente en la utilización de un detergente no-iónico llamado Brij-35 en heces humanas, los autores encontraron alta sensibilidad, además de que en la misma muestra se pueden encontrar tanto trofozoítos como quistes, a diferencia de los otros métodos convencionales en donde en general sólo se observan quistes amibianos (118).

Cualquiera que sea la técnica copararasitoscópica que se utilice, es de gran importancia la participación de personal de laboratorio altamente calificado y con amplia experiencia, para la adecuada manipulación y observación de las muestras, así como el de contar con microscopios fotónicos que tengan buena resolución. A pesar de que se tenga prácticamente todos los requisitos anteriores, el diagnóstico clínico por microscopía es el método menos confiable

para la identificación de las especies de *Entamoeba*. La sensibilidad por microscopía puede ser tan sólo del 60% y puede haber resultados falsos positivos debido a que no se pueden diferenciar las especies de *Entamoeba* por lo que la sensibilidad y especificidad de la microscopía convencional resulta muy baja (2,119).

## **2.7.2. Métodos bioquímicos: cultivos y zimogramas**

### **2.7.2.1. Cultivos**

Boeck y Drbohlav(120) realizaron los primeros cultivos de *E. histolytica* en un medio inclinado de huevo bifásico. Sin embargo, el medio Robinson (121) y TYSGM-9 de Diamond (101) se utilizan con mayor frecuencia para el cultivo del proceso de *E. histolytica*. El cultivo axénico, propuesto por Diamond, TYI-S-33 (122), es uno de los medios axénicos más utilizados, recordando que el cultivo axénico implica, el cultivo de parásitos en la ausencia de otras células metabolizadoras (123), el mantenimiento del cultivo no es fácil y requiere esfuerzo de mano de obra en el laboratorio de diagnóstico, se debe entender que los cultivos de *Entamoeba* son principalmente herramientas de investigación y no para lugares de diagnóstico (124). Otro problema es la eliminación de organismos no deseados en el proceso de cultivo. El cultivo de *E. histolytica* en un laboratorio de diagnóstico clínico no es factible como procedimiento de rutina y es menos sensible que el de microscopía fotónica como método de detección (123). Los cultivos de parásitos son difíciles, costosos y de trabajo intenso, como método de diagnóstico en un laboratorio de gabinete (123). El crecimiento excesivo de bacterias, hongos u otros protozoos durante el cultivo es el principal problema encontrado, y por lo tanto



el cultivo no se recomienda como una rutina de procedimiento de diagnóstico para la detección de especies de *Entamoeba* (123). EL medio de cultivo TYI-S-33 fue revisado en detalle por Clark y Diamond (124) y por Jensen (125).

#### **2.7.2.2. Zimogramas**

El análisis por zimograma o isoenzimático de las amibas en cultivo sirve para diferenciar entre diferentes especies de *Entamoeba* (123). Un zimodemo se define como un grupo de diferentes cepas de amibas que comparten un mismo patrón y movilidad electroforética para varias enzimas: enzima málica, hexoquinasa, glucosa fosfato isomerasa y fosfoglucomutasa (126,127). Se han descrito un total de 24 zimodemos diferentes, de los cuales 21 provienen de aislados humanos (9 de *E. histolytica* y 12 de *E. dispar*). La presencia de almidón en el medio influye en forma variable en la mayoría de los patrones de zimodemos (128). Otra dificultad intrínseca de los zimodemos es que para realizarlos se necesita mucho tiempo: primero cultivar a las amibas, que esta actividad sea realizada por personal de laboratorio especializado, aunada a sus altos costos y a la infraestructura que se requiere para los ensayos. En consecuencia, no se emplean en la práctica clínica cotidiana (129), en realidad los análisis isoenzimáticos son en su mayoría insatisfactorios.

#### **2.7.3. Detección por anticuerpos**

Actualmente las pruebas serológicas pueden ser útiles en la identificación de infecciones por *E. histolytica*, a través del diagnóstico de laboratorio en países industriales (130-132), pero no así en áreas endémicas, en donde se tiene un mayor número de exposición al parásito y en donde esta situación dificulta el diagnóstico definitivo por detección de anticuerpos, debido a la incapacidad de distinguir la infección pasada de la actual (4,5). Los anticuerpos séricos

encontrados de *E. histolytica* pueden ser detectados en un rango de un 75 a 85%. La detección de anticuerpos puede ser útil en el caso de AHA en los pacientes que no se les pueden identificar parásitos en las heces. La sensibilidad para la detección de anticuerpos contra *E. histolytica* se ha descrito que es del 100 % (133).

Se han desarrollado muchos ensayos diferentes para la detección de anticuerpos, incluyendo hemaglutinación indirecta (HAI), látex aglutinación, inmunolectroforesis (IEF), contraelectroforesis (CIEF), la prueba de difusión de gel amibiano, inmunodifusión (DID), fijación del complemento, ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA)(134-136). Existe una variedad de ensayos para la detección de anticuerpos de *E. histolytica* en humanos; en particular en este trabajo se utilizaron dos métodos que fueron: a) el ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA) y el segundo b) el método de Western Blot (WB).

a) El ensayo de ELISA es el más popular en los laboratorios de diagnóstico en todo el mundo y se ha utilizado para estudiar la epidemiología de la amibiasis asintomática (137). Es ampliamente considerado suficiente para fines clínicos, para el diagnóstico de pacientes con AHA, y puede ser fácilmente realizado en un laboratorio clínico. También puede ser útil en la evaluación de infecciones intestinales y extraintestinales de amibas, cuando los protozoarios no pueden detectarse en heces (138).

La prueba de ELISA con IgG contra *E. histolytica* para el diagnóstico de AHA es la prueba de referencia hasta el momento, de fácil ejecución, bajo costo y disponible en algunas capitales y centros de referencia de algunos países y para tal fin se consideran valores positivos de absorbancia mayores o iguales a

0.34 obteniéndose en los ensayos sensibilidad del 95.7% y especificidad del 100% (139).

Los anticuerpos IgG séricos de *E. histolytica* persisten durante años, mientras que los anticuerpos IgG no séricos son de corta duración. Se han realizado ensayos por ELISA para la detección de anticuerpos IgM contra LC3 (una porción recombinante rica en cisteínas de la subunidad de la lectina de 170 kDa de *E. histolytica*) que han resultado ser muy útiles en pacientes que sufren de colitis aguda de al menos una semana de evolución, ya que 45% de estos pacientes tienen anticuerpos IgM contra esta lectina de adhesión (140). De las pruebas serológicas recomendadas, las técnicas de ELISA que pueden detectar la presencia de anticuerpos anti-lectina a nivel sérico son las más utilizadas para el diagnóstico de pacientes con AHA (141).

Sin embargo, los hallazgos y limitaciones de las pruebas serológicas en nuestro medio continúan en discusión.

b) En cuanto al segundo ensayo con WB no es un método tan popular como el ELISA, en los laboratorios de diagnóstico puede ser útil en los exámenes de infecciones intestinales y extraintestinales de amibiasis.

Ravdin y colaboradores (142) identificaron y caracterizaron proteínas específicas de amibas, reconocidas más frecuentemente en suero de humano con AHA; las IgG identifican más frecuentemente tres moléculas de diferentes pesos moleculares. Singh y colaboradores (143), en suero de pacientes con amibiasis intestinal aguda, encuentran que existe una frecuencia de reconocimiento entre un 60-65% para algunas moléculas diferentes. (144)

Existen en la literatura varios reportes en los que se ensaya la seropositividad, de pacientes con distintos cuadros clínicos de amibiasis, a diversas moléculas

de *E. histolytica*. En resumen: el suero de pacientes con AHA resultó positivo al péptido recombinante de la SREHP, al péptido recombinante de la cadena pesada de la lectina Gal/GalNAc (145), así como a un péptido amibiano purificado a partir de *E. histolytica*, con un peso molecular de 36 kDa (143), a la dicinasa fosfato piruvato (ppDK), que es una proteína secretada por *E. histolytica* (146) ya la fosfoglucomutasa (PGM) (147). El suero de paciente con colitis amibiana fue positivo a la misma proteína de 36 kDa (143), por otra parte, la presencia de IgA anti-amiba en saliva de paciente en amibiasis intestinal también fue reportada (148,149).

#### **2.7.4. Detección por antígenos amibianos**

Se han desarrollado pruebas de ELISA con el fin de detectar en dicha prueba, antígenos amibianos en saliva, suero, pus hepática y en muestras fecales. Los ensayos de detección de antígeno tienen una sensibilidad aceptable y son rápidos de realizar.

Los ensayos de ELISA basados en antígenos específicos para *E. histolytica* utilizan anticuerpos monoclonales contra la lectina Gal/GalNAc proteína rica en serina, lipofosfoglicano (150) la desventaja en ocasiones han sido que los antígenos detectados son desnaturalizados por fijación de la muestra de heces, lo que ha limitado a la prueba a una buena resolución.

#### **2.7.5. Ensayo de diagnóstico con base en biología molecular**

Los ensayos basados en el ADN están limitados a laboratorios clínicos en los países industrializados, debido a que es caro y no se puede realizar como un examen de rutina.

Recientemente se han elaborado métodos de aislamiento del ADN de los parásitos en las heces, que son simples y efectivos, y son capaces de

aumentar la detección así como la sensibilidad cuando los ensayos se hacen de forma directa de las muestras clínicas. El “kit” de detección en heces QIAam-ADN (QUIAGEN. Hilden, German) ha probado ser un método muy bueno y confiable para la recuperación de ADN de la materia fecal (151).

Sin embargo, existen algunas limitaciones, dado que las muestras fecales son consideradas entre las más complejas para hacer mediciones directas de PCR a causa de la presencia de sustancias inhibidoras del PCR como: grupo hemo, bilirrubina, sales biliares y complejos de carbohidratos, los cuales se co-extraen con el ADN de las muestras de los patógenos. Por lo tanto, la optimización de la extracción del ADN de las muestras es un paso crítico para que el ensayo de PCR sea exitoso.

Otro problema que dificulta un buen diagnóstico es el transporte de las muestras fecales, ya que generalmente es a temperatura ambiente, dado que el ADN del parásito puede presentar degradación acelerada, sobre todo con los trofozoítos que son las formas más lábiles. Para evitar estas deficiencias en el transporte se recomienda que sea refrigerada o fijada con formalina (152,153).

Es importante señalar que el uso de muestras refrigeradas o fijadas puede resultar en una disminución porcentual de la sensibilidad. Se ha observado que el etanol es un método simple de transporte y adecuado que preserva en buenas condiciones el ADN de las heces. Hasta el día de hoy la mejor forma de conservar las muestras es la congelación a -20 °C antes de la extracción de ADN, este procedimiento en general no altera la sensibilidad de los ensayos moleculares.

### **2.7.5.1. Prueba de biología molecular por reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Por último, las pruebas de biología molecular como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se han usado esencialmente para estudios clínicos y epidemiológicos (154-156).

El método que por el momento nos ocupa tiene suficiente apoyo por la OMS. En el caso de *E. histolytica*, ésta puede diferenciarse de *E. dispar* en varios tipos de muestras incluyendo heces, tejidos y aspirados de abscesos hepáticos (157). La PCR que se realiza a partir de la subunidad pequeña del gen rARN (18S rADN) se ha reportado que es aproximadamente 100 veces más sensible que el método de ELISA utilizado (158,159).

Los primeros estudios en base a PCR fueron realizados por Tannich y Bruchard (160) en donde utilizaron ADN extraído de aislados de *E. histolytica* mantenida en cultivo. La PCR fue usada posteriormente en estudios epidemiológicos en infecciones producidas por *E. histolytica* y *E. dispar*, utilizando ADN purificado de cultivos de trofozoítos que provenían de materia fecal, probando oligonucleótidos iniciadores específicos para secuencias que son altamente repetidas y que están presentes en las especies de *E. histolytica* y *E. dispar*.

En un intento por aumentar la sensibilidad del ensayo de PCR, se ha demostrado un PCR “anidado” multiplex que sirve para la detección simultánea y la diferenciación genética *E. histolytica* y *E. dispar* en muestras de heces. Utilizando esta técnica, la sensibilidad y la especificidad fueron incrementadas de un 94 % a un 100 % respectivamente (161).

En el caso de la utilización del PCR para la detección de *E. histolytica* en muestras de AHA se empleó esta técnica para la detección del producto del gen que codifica para una proteína de 30 kDa y se reportó un 100 % de sensibilidad (162). Aunque los métodos de PCR han sido utilizados con éxito para la detección de las especies de *Entamoeba* (163), su aplicación en el diagnóstico de rutina se encuentra muy limitada ya que la amplificación y la detección del ADN consumen tiempo y en países en vías de desarrollo resultan ser procedimientos costosos.

A través del tiempo se han utilizado distintas herramientas para el diagnóstico de amibiasis, arrojando para cada caso un porcentaje de sensibilidad y especificidad (tabla 4).

**Tabla 4. Comparación de métodos de diagnóstico de la amibiasis.**

Modificado de: Tayukselm et al (164), Pinilla et al (165); \* Dependiendo de tiempo transcurrido después del tratamiento. Gómez et al (166).

Prueba	Colitis		Absceso hepático amibiano	¿Diferencia a <i>E. histolytica</i> ?
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	
<b>Microscopia (heces)</b>	<60%	10-50%	<10%	No
<b>Cultivo y determinación de isoenzimas</b>	Menor que detección de antígenos y PCR	“Estándar de oro”	<25%	Si
<b>ELISA detección de antígenos (heces)</b>	>95%	>95%	Usualmente negativo	Si
<b>ELISA detección de antígenos (suero)</b>	65% tempranamente	>90%	Tardío ±75% Primeros 3 días 100%	Si
<b>PCR (heces)</b>	>70%	>90%	No disponible	Si
<b>ELISA detección de</b>	>90%	>85%	Presente Infección 70-	Si

anticuerpos (suero)			80%	
			Tratado dependiendo del tiempo* >90%	

### 3. Justificación

Hoy en día los métodos de diagnóstico de laboratorio se encuentran en algunos casos en experimentación; además de ser costosos y en la mayoría de los casos requieren de equipos especiales para su realización y aún más si no están validados. Hasta el momento la prueba de ELISA ha sido considerada por varios grupos de investigadores como un método de fácil estandarización, bajo costo y disponible en determinados centros de referencia. Por lo que se requieren métodos que consoliden los ensayos inmunológicos con la perspectiva de usar moléculas diferentes a las ya propuestas, como sería el amiboporo.

### 4. Hipótesis

Dentro de los factores de virulencia están considerados los amiboporos y mediante técnicas de Western Blot (WB) y Ensayo enzimático ligado a una enzima (ELISA) se detectan los anticuerpos anti-amiboporo en suero de pacientes diagnosticados clínicamente con absceso hepático amibiano.

### 5. Objetivo General

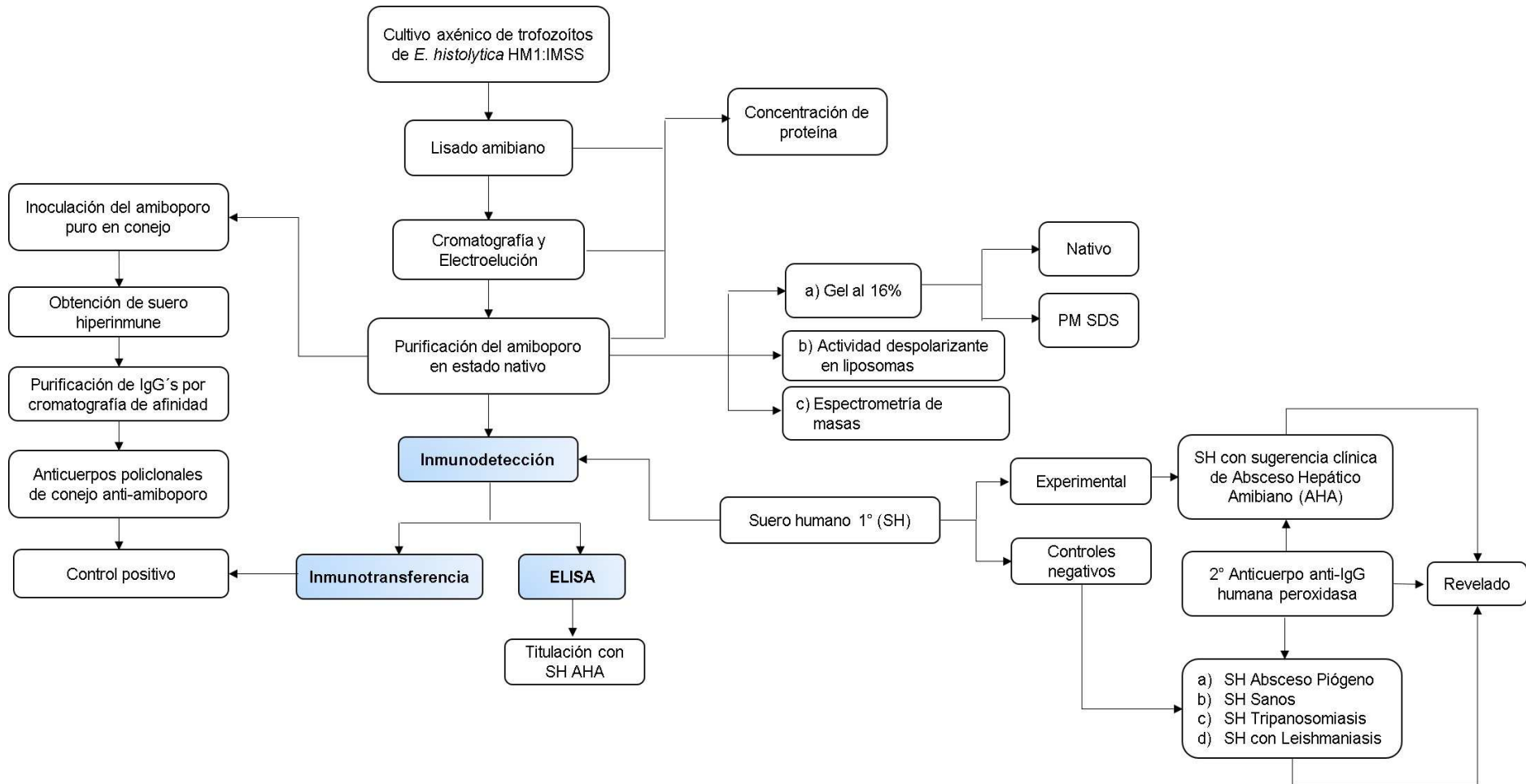
Ensayar mediante 2 técnicas inmunológicas: Western Blot y ELISA, la presencia de anticuerpos anti-amiboporo en el suero de pacientes con AHA.



## 6. Objetivos Particulares

- Purificar el amiboporo con el fin de utilizarlo como antígeno en los ensayos inmunológicos: WB y ELISA.
- Obtener anticuerpos policlonales de conejo, utilizando la molécula pura de amiboporo.
- Llevar a cabo los ensayos de WB y ELISA con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano.
- Comparar nuestros resultados de ELISA, utilizando el antígeno puro de amiboporo, con los resultados obtenidos usando extracto proteico en membranas de *E. histolytica*.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS



7.1. Diagrama de Flujo (Figura 5)

## **7.2. Cultivo amibiano axénico cepa HM1:IMSS virulenta**

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS se cultivaron axénicamente en medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino y 3% de mezcla multivitamínica en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 72 horas (122).

## **7.3. Cosecha de trofozoítos**

Después de 72 horas de cultivo las amibas contenidas en botellas fueron tratadas durante 10 minutos sobre hielo. Las amibas se sedimentaron a 1,200 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el medio de cultivo y el botón amibiano se lavó dos veces en una solución amortiguadora de fosfatos de sodio, más cloruro de sodio a pH 7.2 (PBS-A). el número y la viabilidad de los trofozoítos se determina por azul tripano al 0.4 %. Finalmente, las amibas cosechadas y alcanzado un botón de  $4 \times 10^9$ , fueron mantenidas congeladas a -70°C (95).

## **7.4. Proteínas a partir de trofozoítos**

Se descongeló el botón de trofozoítos ( $4 \times 10^9$ ) y se resuspendió en 80 mL de solución amortiguadora de tris 20 mM, pH 7.8 en presencia de inhibidores de proteasas: E-64 10  $\mu$ M, benzamidina 6.4 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM. La suspensión fue sometida a tres ciclos de congelación a -70 °C y descongelación a 37 °C. La suspensión se centrifugó a 18,000 r.p.m. durante 60 minutos a 4 °C. El sobrenadante se fracciona en 8 mL en un total de 10 tubos y se congelo a -70 °C (95).

## **7.5. Determinación de concentración de proteína**

La determinación de la concentración de proteína, de las diferentes fracciones de las técnicas utilizadas en la purificación, se hizo utilizando el método de Lowry (167). Utilizando como curva de referencia albumina sérica bovina en un rango de 20-100  $\mu\text{g}$  de proteína, y obteniendo las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de absorbanza de 590 nm.

## **7.6. Determinación de la actividad de porina amibiana**

El ensayo de la actividad de porina se sustentó principalmente por la propuesta realizada de Loew y colaboradores (168), para este ensayo se requirió del uso de muestras de liposomas y se prepararon, siguiendo la descripción de Pick, U. (169), utilizando fosfatilcolina a una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en una solución amortiguadora de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  50mM / EDTA 0.5 mM / maleato tris 50 mM, pH 5.2 para el momento del ensayo se diluyeron los liposomas a 1:4,000 en solución amortiguadora antes mencionada.

Para verificar el funcionamiento del sistema de liposomas se utilizó la adición de un ionóforo de valinomicina a 1  $\mu\text{M}$  y se monitoreó mediante la fluorescencia del colorante de yoduro de 3,3'-dietiltiodicarbocianina (1 $\mu\text{M}$ ). El comportamiento de la fluorescencia se obtuvo mediante el espectrofotómetro de fluorescencia usando longitud de onda de excitación y emisión de 620 nm y 670 nm respectivamente (170,171); por otro lado, las diferentes muestras obtenidas en los diferentes pasos de la purificación, fueron sometidas a evaluación en el ensayo de actividad en presencia de los liposomas y con los amortiguadores correspondientes para obtener el perfil de actividad

despolarizante por dicho sistema. Se analizó el curso temporal de la actividad de porina (Figura 7).

### **7.7. Purificación del amiboporo**

La purificación del amiboporo se realizó en 3 etapas consecutivas: 1) cromatografía de filtración molecular; 2) cromatografía de intercambio iónico; y 3) mediante electroelución. Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C y las diferentes muestras del proceso de purificación se mantuvieron en hielo, también en cada una de las fases de purificación, las muestras de interés se sometieron a electroforesis (172) desnaturalizante y a la medición fluorométrica de la disipación del potencial en liposomas, previamente a la determinación de la concentración de proteína.

### **7.8. Cromatografía**

Se pasaron diez lotes de 8 mL de sobrenadante amibiano (22 mg/mL) por la columna de superdex 200 (filtración) usando amortiguador de tris 20 mM pH 7.8 con E-64 10 µM en el cromatógrafo de alta resolución. Las fracciones que contenían una mayor cantidad de amiboporo fueron (F47-F52) seleccionadas y reunidas en un solo lote (95) y que a su vez fue ultrafiltrado 10X en una membrana de 3,000 kDa. Se centrifugó a 18,000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C y se dializó en tris 20 mM pH 7.8 + E-64 10 µM. Se continuó con la cromatografía de intercambio aniónico con 10 mL de muestra (4 mg/mL) con actividad de porina y utilizando dos amortiguadores; siendo el primero de tris 20 mM pH 7.8 más E-64 10 µM y el segundo, el mismo amortiguador con NaCl 1 M, se aplicó en el cromatógrafo un gradiente discontinuo y se desprendió el amiboporo con una fuerza iónica de NaCl 0.1 M, se realizaron tres corridas iguales, la muestra

con porina amibiana se ultrafiltró con una membrana de retención de 3,000 kDa, hasta un volumen de un mililitro y medio, finalmente se dializó en amortiguador de tris 0.025 M, glicina 0.192 M.

### **7.9. Electroelución**

A la muestra que contenía el péptido de porina en 1.5 mL (12 mg/mL) se le adicionó 1 mL de amortiguador nativo con azul de bromofenol. La muestra fue inyectada en el sistema de electroelución (Prep-Cell de Bio-Rad). El gel no desnaturizante se montó en el tubo de 37 mm. La electroelución se llevó a cabo con la solución de corrida de tris-glicina a una potencia constante de 10 watts, con un flujo de elución de 0.75 mL/min (173). Las fracciones electroeluidas (de la 1 a la 80) fueron analizadas mediante PAGE nativo y desnaturizante; los geles al 16 % fueron teñidos con solución de nitrato de plata y se midió la actividad fluorométrica de las fracciones, las que presentaron actividad despolarizante, se reunieron para constituir una muestra única, la cual fue analizada nuevamente mediante SDS PAGE y por espectrofotometría de fluorescencia.

### **7.10. Secuenciación aminoacídica del amiboporo**

La secuenciación de la muestra de interés fue llevada a cabo por el Dr. Guillermo Mendoza<sup>†</sup>, en la Facultad de Medicina de la UNAM; para ello, se corrió un gel al 16 % en condición nativa, se recortó la banda del péptido amibiano y se trituró el gel que contenía la banda y posteriormente se llevó a cabo el método convencional de degradación de Edman (174) en un secuenciador de proteína complementado con un cromatógrafo líquido de alta resolución y la masa molecular fue determinada por espectrometría de masa.

### **7.11. Obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra amiboporo A**

La muestra pura y con actividad se utilizó como antígeno para inmunizar dos conejos; para ello se mezcló en proporciones iguales la muestra (40µg/200µl) y de adyuvante incompleto de Freund, cada inmunizada fue en dos vías (intramuscular y subcutánea) por dos ocasiones con un intervalo de 15 días entre una y otra inmunización, en el tercer y cuarto estímulo no se utilizó adyuvante. Los animales fueron sangrados, el suero pre inmune fue obtenido antes de la inmunización.

La inmunoreactividad de cada uno de los sueros se ensayó por inmunodifusión en agarosa al 1 % (175).

### **7.12. Purificación de IgG's anti-amiboporo del suero de los conejos**

El suero de cada conejo fue precipitado lentamente con sulfato de amonio saturado en una relación 1:2 a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C durante la noche. El suero precipitado se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 30 minutos, el botón obtenido se resuspendió en 15 mL de amortiguador tris 10 mM pH 7.4, se dializó en una bolsa de retención de peso molecular de 12,000-14,000 Da contra 4 L de amortiguador tris 10 mM, pH 7.4, repitiendo esta operación dos veces más. Las gamaglobulinas fueron sometidas a cromatografía de afinidad a través de una columna de sefarosa-proteína A, previamente equilibrada con un amortiguador tris 10 mM. Se hizo pasar por la columna la suspensión de gamaglobulina, que se une a la proteína A, se eluyó con 2 mL de glicina 0.1 M pH 2.2 y fue neutralizada con ~1.0 mL de tris 1.5 M, pH 8.0 y el volumen total de las IgG's colectadas se dializó nuevamente contra

tris 0.01 M pH 7.4 para finalmente ultrafiltrarlo en un amiconde 50 mL con una membrana diaflo PM-10 hasta una concentración de 1.0 mg/mL. Las IgG's puras de los conejos se almacenaron en alícuotas de 1 mL a 0 °C (176).

### **7.13. Ensayo de especificidad de las IgG's anti-amiboporo sobre extractos de *Entamoeba histolytica*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi***

La especificidad de las IgG's anti-amiboporo fue corroborada por el análisis de Western Blot de acuerdo a Towbin y col. (177), contra un lisado total de un botón de células de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS, de células de *L. mexicana* y *T. cruzi*, cada una de las muestras tratadas con EDTA 10 mM, iodoacetamida 100 µM y E-64 0.2 µM. Se incluyó como control positivo un lisado de amibas tratado de la misma manera y muestra pura de amiboporo (3.2 µg). Todas las muestras fueron ajustadas a 10 µg de proteína y tratadas con agente reductor (10% β-mercaptoetanol). La transferencia se llevó a cabo en papel de nitrocelulosa y se utilizaron 1.25 µg/mL de IgG's de conejo anti-amiboporo, finalmente se trató con una dilución 1:120,000 del anticuerpo secundario proveniente de cabra anti-IgG's de conejo peroxidado. Las tiras fueron reveladas por quimioluminiscencia (178).

### **7.14. Sueros humanos (SH)**

Los 47 sueros humanos examinados fueron obtenidos de pacientes de los servicios de Infectología, Gastroenterología y Medicina Interna del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", éstos fueron clasificados en cuatro grupos. El grupo A incluye 25 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano (AHA); en el grupo B se incluyeron 7 sueros obtenidos de individuos sanos; el grupo C estuvo constituido por los sueros de



9 pacientes con absceso hepático piogéno (AHP), y finalmente el grupo D consistió en 6 sueros, 3 provenientes de pacientes con leishmaniasis y 3 con tripanosomiasis.

Los sueros se obtuvieron a partir de 5 mL de sangre venosa de cada paciente previa autorización de cada uno para realizar los estudios en la investigación biomédica.

### **7.15. ELISA**

Para la realización del ensayo de ELISA se utilizó 0.6 µg de antígeno de amiboporo puro, fue fijado por pozo (por triplicado para cada suero a analizar) en una placa de 96 pozos.

Se agregaron por pozo 100 µl de una dilución 1:100 de cada uno de los sueros pertenecientes a cada uno de los cuatro grupos descritos previamente. Se agregaron por pozo 100 µl de una dilución 1:12,000 del anticuerpo secundario peroxidado, hecho en conejo anti-IgA, IgG e IgM's de humano; y se reveló con "TMB peroxidase substrate" (sustrato de tetrametilbenzidina para peroxidasa) y solución B para peroxidasa. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1 M.

Se realizó la lectura de las muestras a una longitud de onda de 450 nm (179) y se calculó el punto de corte de cada muestra analizada, considerando igualmente la desviación estándar y aplicando la siguiente fórmula:  $[3 \times D.s. (Desviación estándar) + \text{el promedio de control negativo}]$ ; posteriormente se restó el punto de corte al valor promedio de cada muestra y cuando el resultado

fue mayor al punto de corte se consideró positivo; de lo contrario, si el resultado fue menor o igual al punto de corte se consideró negativo.

#### **7.16. Western Blot (WB) del amiboporo y los sueros humanos**

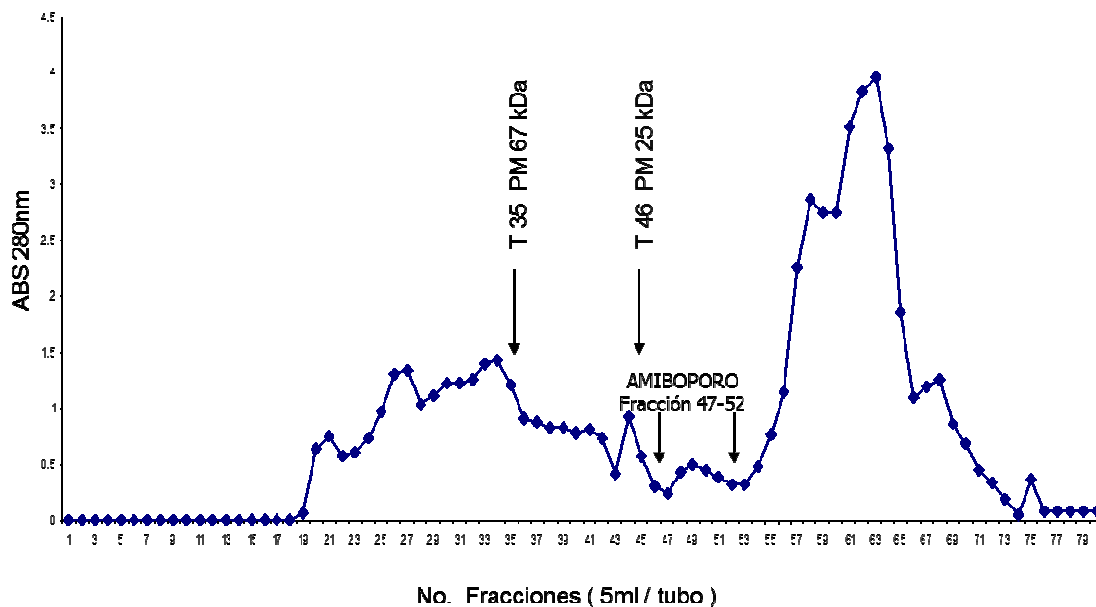
Se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante al 16 % de poliacrilamida con 40 µg de muestra de amiboporo puro dispuesto en el carril único formado por el peine de un solo diente. La corrida se detuvo al llegar el frente de avance justo al final del gel. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo a Towbin y colaboradores (177) y fue bloqueada con leche al 5 % en un amortiguador TBST por una hora, a temperatura ambiente; posteriormente la membrana se cortó en tiras para poder incubar con cada uno de los sueros. Cada tira fue incubada durante toda la noche con una dilución 1:200 del suero correspondiente. Se analizaron los 47 sueros. Se utilizó una dilución 1:5,000 de un anticuerpo secundario de conejo peroxidado anti-IgA, IgG e IgM's de humano. Las tiras se revelaron con quimioluminiscencia.

#### **7.17. Análisis estadísticos**

El análisis estadístico se realizó con una curva ROC (Receiver Operating Characteristics Curves). Se decidió evaluar el desempeño de calidad de dos pruebas de diagnóstico: ELISA usando el extracto rico en membranas de trofozoítos amibianos como antígeno (Tabla 10) y el ensayo de ELISA utilizando amiboporo puro (Tabla 11). Por esta razón, los valores de sensibilidad y especificidad de estos dos ensayos se calcularon con el resultado de WB (método corroborativo) como estado de condición verdadera.

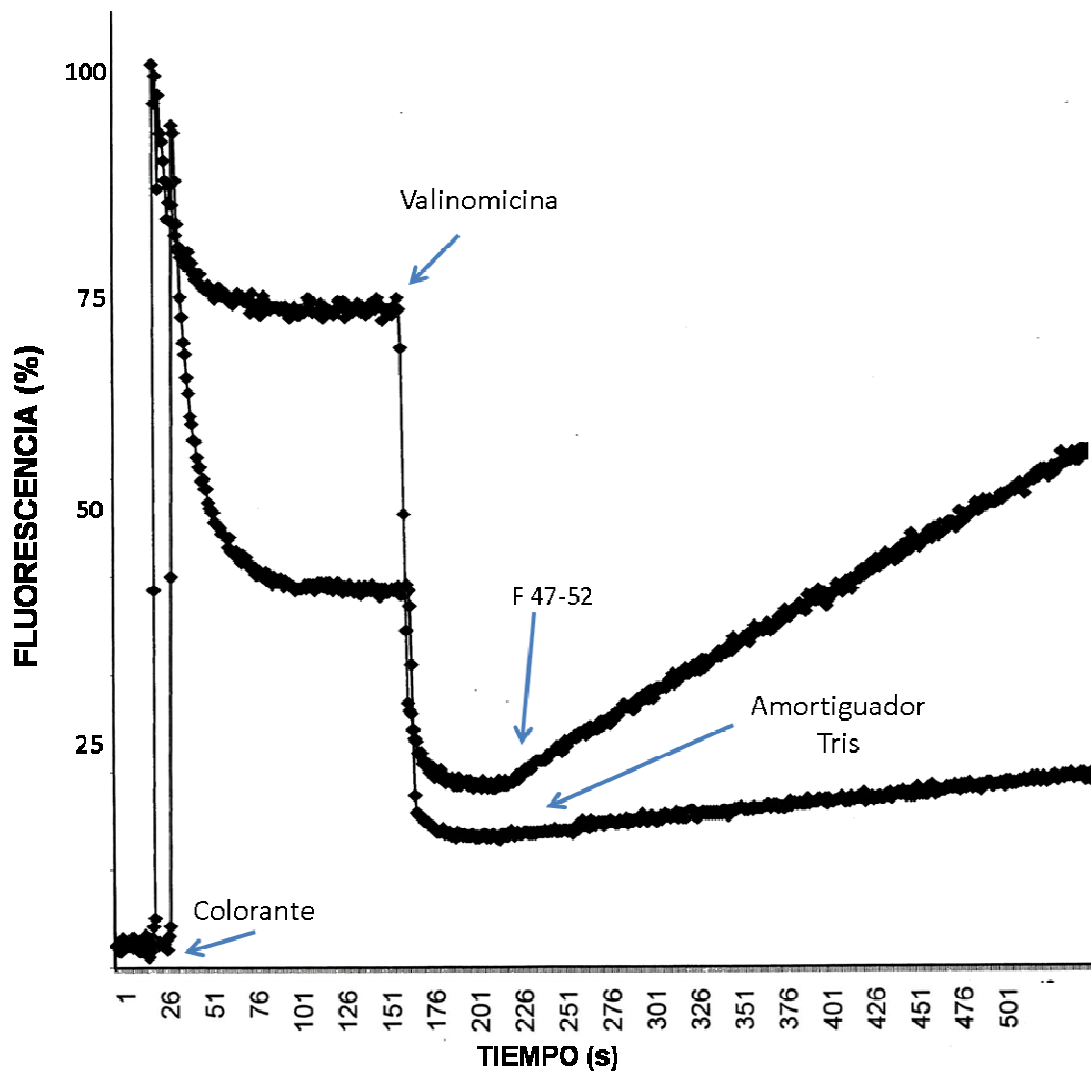
## 8. Resultados

Una vez realizado el cultivo masivo de trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS virulenta y obtenido un botón celular de  $4 \times 10^9$  se obtuvo una concentración total de proteína del sobrenadante amibiano de 1,760 mg; se realizaron diez corridas cromatográficas en la columna de superdex 200 con la propiedad de filtración, en el cromatógrafo de alta resolución de las diez corridas realizadas se presentó un perfil cromatográfico de uno de ellos. (Figura 6)



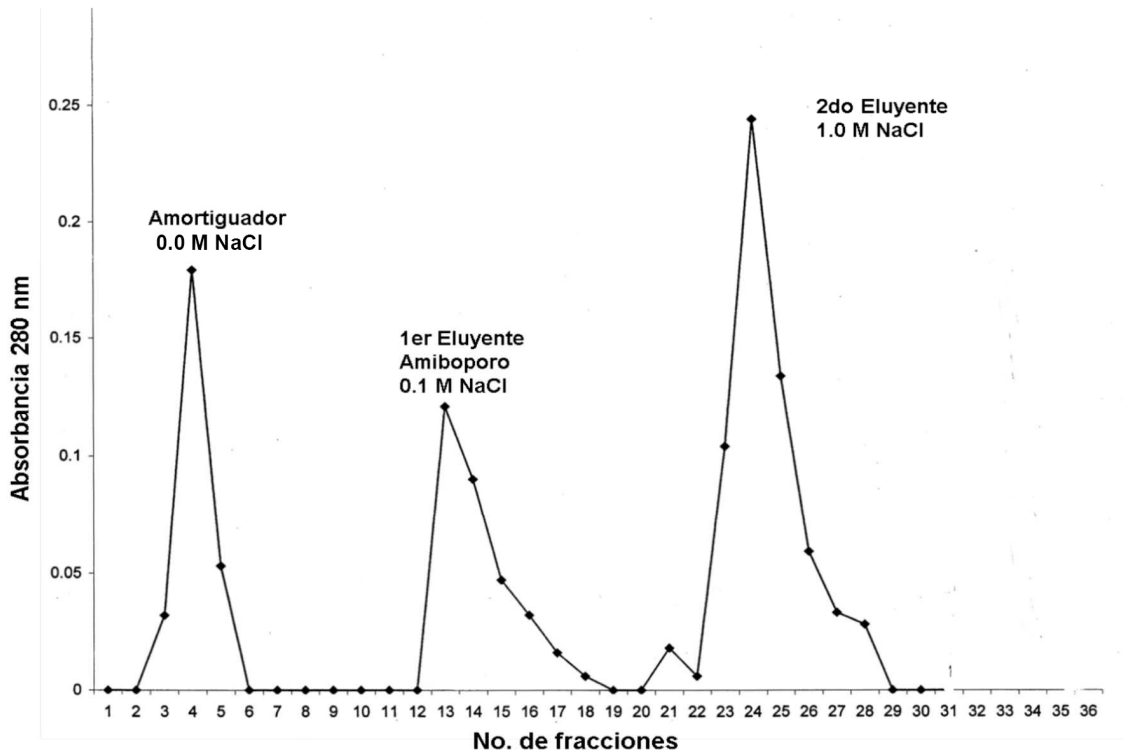
**Figura 6. Cromatograma de las fracciones obtenidas por filtración molecular.** Se muestra el perfil de las lecturas de la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración del sobrenadante amibiano (columna superdex 200). De todas las fracciones, solamente la zona (47-52) mostraron mayor actividad formadora de poros.

En cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía de filtración, la actividad de amiboporo fue monitoreada fluorométricamente por la disipación del potencial de difusión, inducido por un ionóforo de valinomicina en liposomas. Se identificó una mayor actividad de porina en la zona 47-52 de las fracciones. Se muestra la actividad de ese lote en la siguiente figura espectrofluorométrica (Figura 7).



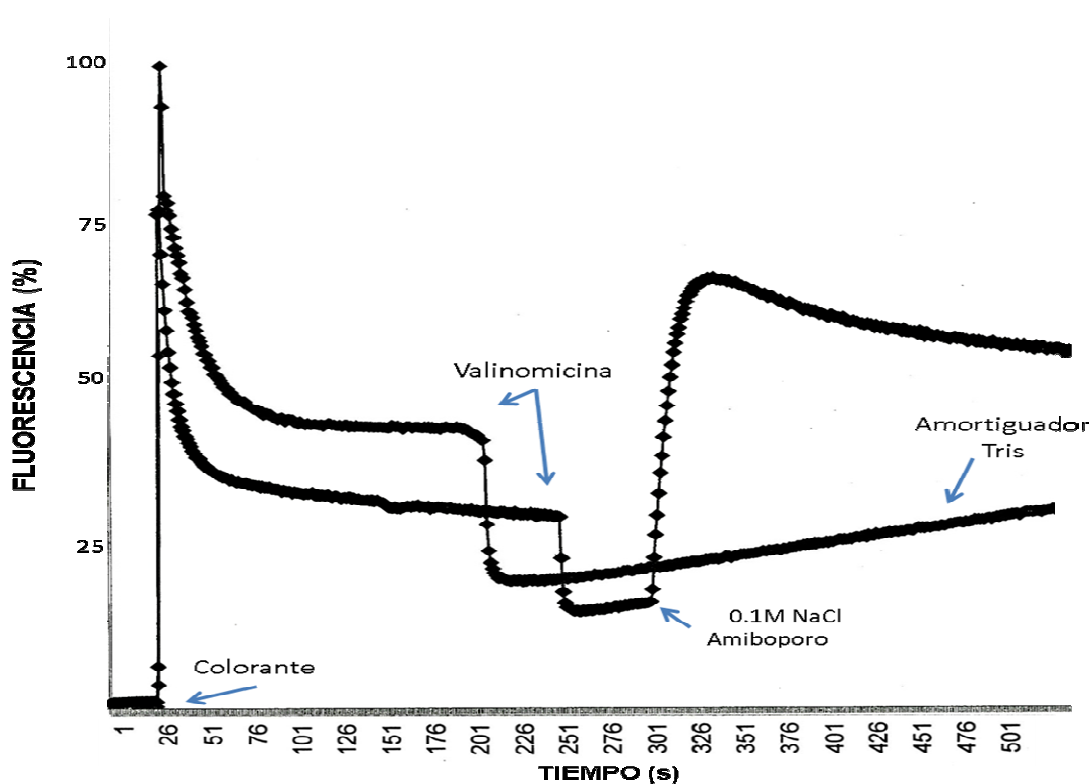
**Figura 7. Curso temporal de la despolimerización de liposomas por el lote 47-52.** La actividad del amiboporo se monitoreó fluorométricamente en liposomas de fosfatidil colina. Utilizando como control amortiguador de tris 0.02 M pH 7.8 y en otro momento se utilizó el lote 47-52 que contenía amiboporo.

Como se mencionó previamente, en la segunda etapa de la purificación se llevó a cabo la cromatografía de intercambio iónico (aniónico), se realizaron tres corridas y se presenta el perfil cromatográfico de una de ellas (Figura 8); proceso realizado también con el cromatógrafo de alta resolución en condiciones de temperatura de 4°C.



**Figura 8. Columna de intercambio iónico por gradiente discontinuo.** Perfil cromatográfico de intercambio aniónico, obtenido a una absorbancia a 280 nm. Utilizando como eluyente el amortiguador de tris 20 mM pH 7.8 + E-64 y como eluyente: NaCl 0.1 M y enseguida NaCl 1.0 M.

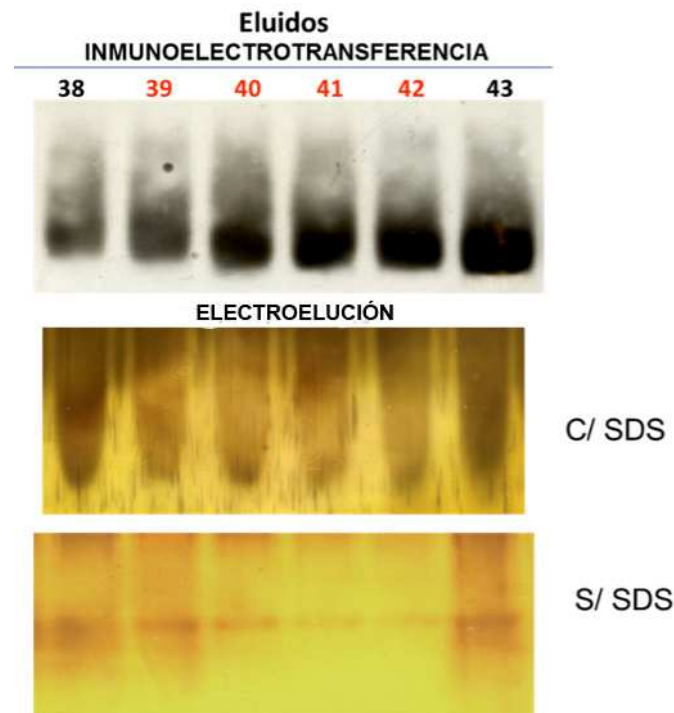
La actividad formadora de poros en liposomas se detectó en el primer pico eluído con NaCl 0.1 M. La figura 9 nos muestra dicho resultado.



**Figura 9. Curso temporal de la despolarización de liposomas del pico eluído con NaCl 0.1 M, correspondiente al amiboporo.** Identificando la actividad de amiboporo en una de las tres fracciones obtenidas en la cromatografía iónica, correspondiendo únicamente a la fracción que se desprendió con una fuerza iónica de 0.1 M de NaCl.

Los resultados obtenidos en la purificación de las dos cromatografías, como fueron de filtración e intercambio iónico, redujeron el número de contaminantes moleculares en la muestra, sin embargo, se decidió emplear el sistema de electroelución, y de dichas fracciones obtenidas, se llevó a cabo un análisis electroforético tanto desnaturalizante, como nativo en geles al 16%, mismos

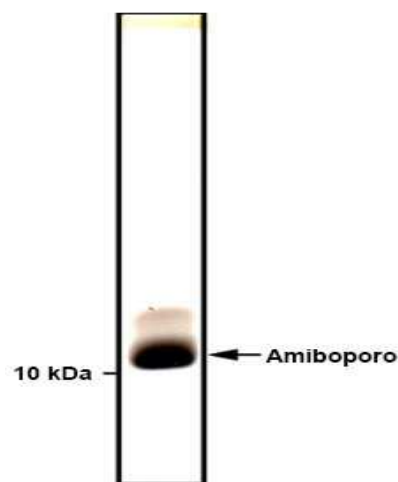
que se revelaron con plata (Figura 10). Y también se realizó el ensayo de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales de conejo.



**Figura 10. Inmunoelectrotransferencia y análisis electroforético desnaturizante (c/SDS) y nativo (s/SDS) de las fracciones donde estaba presente el amiboporo.** Fracciones recuperadas mediante electroelución nativa que fueron analizadas por electroforesis desnaturizante y nativa. Se muestra el patrón electroforético de las fracciones 38-43, ya que fueron las que mostraron actividad formadora de poros; sin embargo, el lote final fue de la 40-42 como muestra de amiboporo puro.

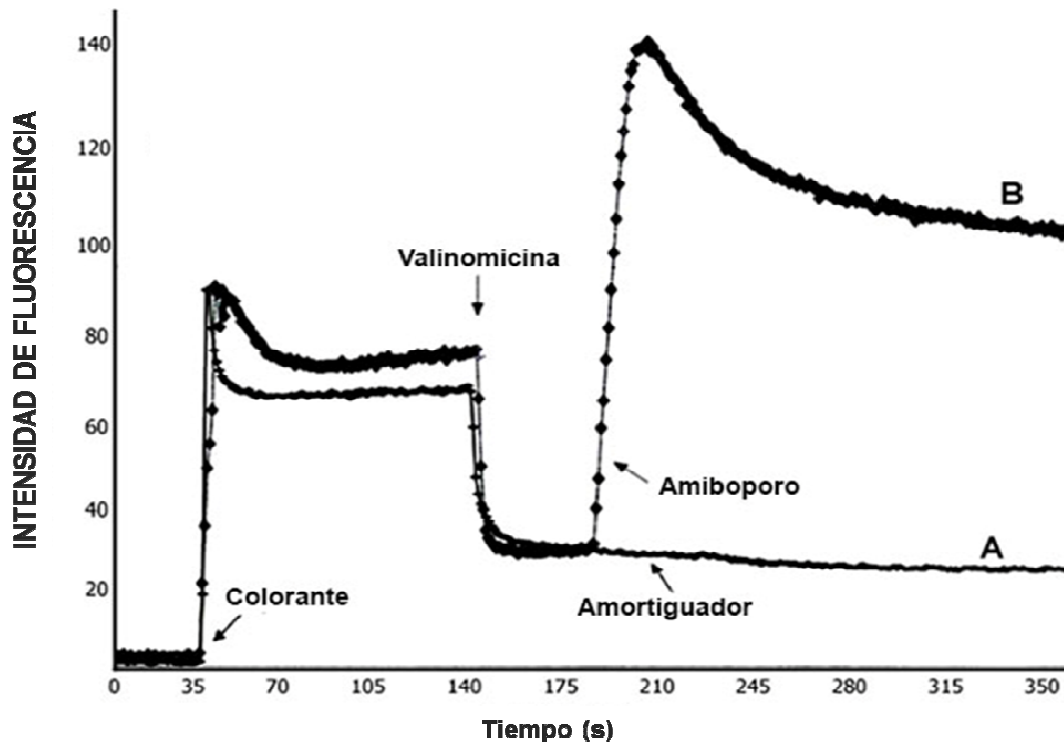
Aunque el amiboporo se purificó en otro proyecto de investigación a partir de trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS virulenta como se describió en González A. y cols. (180), fue necesario obtener nuevamente la muestra pura para el presente proyecto. La muestra pura fue analizada

electroforéticamente en geles al 16% de poliacrilamida, teñidos con solución de nitrato de plata (Figura 11). Se obtuvo una banda con un peso molecular de alrededor de 10 kDa. La secuenciación por espectrometría de masas de 8 residuos aminoacídicos: KLIQIEKV alineó en el Blastp en un 100% con “el péptido precursor del amiboporo A” de *E. histolytica* HM1:IMSS, con número de acceso: XP\_653265.1 (ver tabla 6). En lo que respecta a la comprobación de su actividad, el resultado del ensayo despolarizante en membranas de liposomas (Figura 12) indicó actividad de porina.



**Figura 11. Perfil electroforético del amiboporo purificado de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS.** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 16% para la determinación del grado de pureza de la molécula de amiboporo.





**Figura 12. Curso temporal de la despolarización de los liposomas por amiboporo A.** A) medición de la fluorescencia al añadir una suspensión tris (20 mM, pH 7.8) a liposomas. B) en este caso, la molécula de amiboporo se añadió a la celda con liposomas. Se observa un cambio radical en la medida de fluorescencia causada por la difusión del colorante de cianina en los liposomas en el medio, lo que implica que la molécula muestra actividad.

En la tabla 5 se resumen las cantidades de proteína inicial, y recuperadas en las distintas etapas de la purificación del amiboporo utilizado en este trabajo de investigación.

**Tabla 5. Rendimiento obtenido en los diferentes pasos de la purificación del amiboporo.**

Se indica la concentración proteica, determinada por el método de Lowry de cada una de las técnicas empleadas en la purificación del amiboporo.

Fases de purificación	Proteína total (mg)	% de recuperación de proteína con actividad	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL) por "corrida"	Número de corrida
Extracto amibiano	176	100	22.0	8.0	---
Columna de filtración	120	6.8	4.00	30.0	10
Columna de intercambio iónico (aniónico)	12.0	0.68	8.00	1.5	3
Sistema de electroelución	0.65	0.03	0.217	3.0	1

A continuación, se muestran los datos de confirmación con la secuenciación de aminoácidos, obtenida de la muestra pura de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS virulenta (Tabla 6).

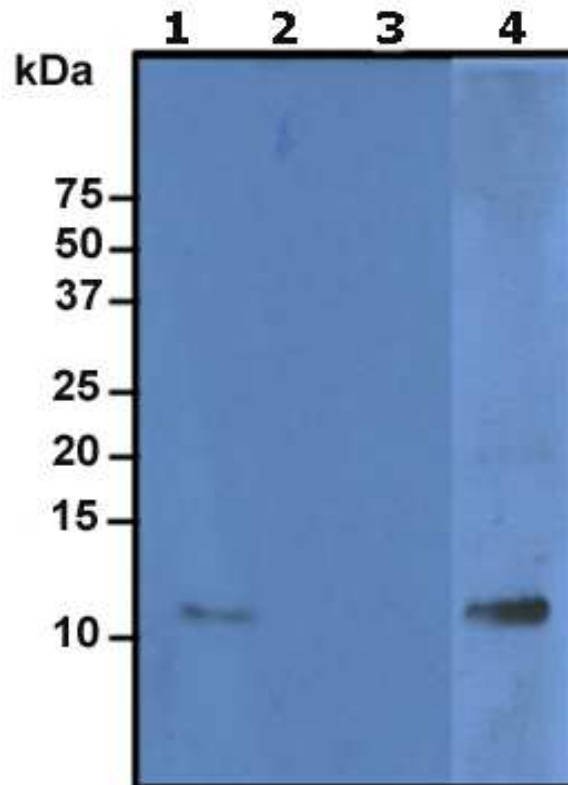
**Tabla 6. Resultado del análisis de la secuenciación del amiboporo.** Es la secuenciación por espectrometría de masas de 8 residuos aminoacídicos, que alineó en el Blastp en un 100% con el péptido precursor del amiboporo A de *E. histolytica*.

1. [gi|46015023](#) Mass: 8239 Score: 410 Matches: 15(7) Sequences: 6(6) eM<sub>PAI</sub>: 11.10  
 Chain A, Solution Structure Of The Pore Forming Toxin Of Entamoeba Histolytica (Amoebapore A)  
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">175</a>	452.7260	903.4374	903.4484	-0.0109	0	(48)	0.047	1	U	K.VDANAICAK.I	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">177</a>	453.7458	905.4770	905.4858	-0.0088	0	(46)	0.071	1	U	K.VLDFGIDK.L	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">178</a>	453.7461	905.4776	905.4858	-0.0082	0	47	0.054	1	U	K.VLDFGIDK.L	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">195</a>	468.7152	935.4158	935.4205	-0.0046	0	51		1	U	K.VDANAICAK.I + [+31.9721 at C7]	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">212</a>	486.2847	970.5548	970.5699	-0.0150	0	50	0.033	1	U	K.LIQLIEDK.V	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">213</a>	486.2866	970.5586	970.5699	-0.0112	0	(24)		12	2	U	K.LIQLIEDK.V
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">219</a>	488.2451	974.4756	974.4855	-0.0098	0	(50)		1	U	K.VDANAICAK.I + [+71.0371 at C-term K]	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">312</a>	556.2929	1110.5712	1110.5743	-0.0031	0	(73)	0.00017	1	U	K.ASGFIATLCTK.V	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">334</a>	572.2758	1142.5370	1142.5464	-0.0094	0	105		1	U	K.ASGFIATLCTK.V + [+31.9721 at C9]	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">358</a>	588.2709	1174.5272	1174.5635	-0.0363	0	(50)		1	U	K.ASGFIATLCTK.V + Phospho (ST); [-15.9772 at C9]	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">373</a>	596.2683	1190.5220	1190.5406	-0.0186	0	(53)	0.015	1	U	K.ASGFIATLCTK.V + Phospho (ST)	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">424</a>	635.3219	1268.6292	1268.6434	-0.0142	1	84	1.1e-05	1	U	K.VKDYISLCK.A	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">483</a>	675.3003	1348.5860	1348.6098	-0.0237	1	(27)	6.2	1	U	K.VKDYISLCK.A + Phospho (ST)	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">626</a>	929.0023	1855.9900	1856.0077	-0.0176	1	108	4.2e-08	1	U	K.LIQLIEDKVDANAICAK.I	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">634</a>	952.9945	1903.9744	1903.9924	-0.0180	1	(52)		1	U	K.LIQLIEDKVDANAICAK.I + [+47.9847 at C15]	

**Proteins matching the same set of peptides:**  
[gi|67475078](#) Mass: 10498 Score: 410 Matches: 15(7) Sequences: 6(6)  
 pore-forming peptide amoebapore A precursor [Entamoeba histolytica HM-1:IMSS]

Los resultados de la especificidad de los anticuerpos anti-amiboporo para los diferentes lisados totales de *E. histolytica*, *Leishmania*, *Trypanosoma* y amiboporo se presentan a continuación y no existe reactividad cruzada para los extractos de *Leishmania* y *Trypanosoma* (Figura 13).



**Figura 13. Inmunoelctrotransferencia de lisado total de muestras parasitarias.** Especificidad del anticuerpo anti-amiboporo (policlonal de conejo) en diferentes extractos de parásitos protozoarios mediante WB. 1) *E. histolytica*, 2) *L. mexicana*, 3) *T. cruzi*, 4) Amiboporo.

Los ensayos cuantitativos de los sueros humanos por ELISA, utilizando como antígeno un extracto proteico rico en membranas de amibas donde previamente se realizó un diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano y absceso hepático piógeno (daño inducido por bacterias), se presentan en la siguiente tabla 7:

**Tabla 7. Ensayo de ELISA utilizando como antígeno el extracto proteico rico en membranas de trofozoítos amibianos con sueros de pacientes.** A: diagnóstico clínico de absceso hepático amibiano. B: sugerencia clínica de absceso hepático piógeno (N); >pc mayor al punto de corte → positivo: <pc menor al punto de corte → negativo. Los números corresponden a una clave interna de cada paciente.

<b>Suero</b>	<b>Promedio 490 nm</b>	<b>Punto de corte</b>	<b>Resultados</b>	<b>Interpretación</b>
A81	0.90	0.52	>pc	+
A82	0.83	0.52	>pc	+
A83	0.54	0.52	>pc	+
A84	1.20	0.52	>pc	+
A89	0.73	0.52	>pc	+
A101	1.40	0.52	>pc	+
A119	1.20	0.52	>pc	+
A121	0.65	0.52	>pc	+
A123	1.30	0.52	>pc	+
A126	1.14	0.52	>pc	+
A129	1.10	0.52	>pc	+
A131	0.71	0.52	>pc	+
A133	0.65	0.52	>pc	+
A138	0.63	0.52	>pc	+
A139	0.90	0.52	>pc	+
A140	0.80	0.52	>pc	+
A141	0.59	0.52	>pc	+
A148	1.30	0.52	>pc	+
A149	1.00	0.52	>pc	+
A150	0.73	0.52	>pc	+
A154	0.90	0.52	>pc	+
A155	0.90	0.52	>pc	+
A158	0.90	0.52	>pc	+

A160	0.73	0.52	>pc	+
A162	0.60	0.52	>pc	+
N129	0.40	0.52	<pc	-
N131	0.30	0.52	<pc	-
N132	0.18	0.52	<pc	-
N134	0.45	0.52	<pc	-
N136	0.50	0.52	<pc	-
N137	0.20	0.52	<pc	-
N138	0.10	0.52	<pc	-
N139	0.10	0.52	<pc	-
N152	0.34	0.52	<pc	-

A continuación se presentan los resultados obtenidos por el ensayo de ELISA con los 47 sueros de pacientes de las cuales se usaron 25 sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano y 9 sueros de pacientes con absceso hepático piógeno, en donde se agruparon en 4 grupos y se utilizó como antígeno el amiboporo puro de *E. histolytica* virulenta (Tabla 8).

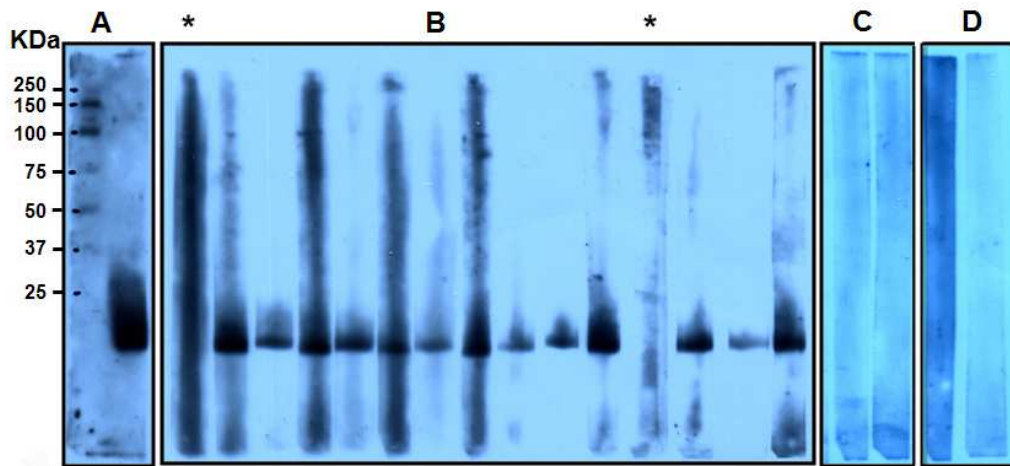
**Tabla 8. Ensayo de ELISA utilizando el antígeno puro de amiboporo (0.6 µg) con los diferentes grupos de sueros: Grupo A, pacientes con sugerencia clínica de Absceso Hepático Amibiano (AHA SC), mismos sueros A de la tabla 7; Grupo B, sueros de sujetos sanos (S); Grupo C, pacientes con Absceso Hepático Piógeno (AHP); Grupo D, pacientes con Leishmaniasis (L) y Tripanosomiasis (T). Resultados: negativo (-) y positivo (+).**

Grupos	Sueros	Promedio 450 nm	Punto de corte	Resultados	Interpretación
	A81	0.213	0.264	0	-
	A82	0.990	0.329	0.669	+
	A83	0.164	0.251	0	-
	A85	1.164	0.386	0.777	+
	A89	0.273	0.395	0	-
	A101	0.674	0.268	0.405	+
	A119	1.634	0.366	1.267	+
	A121	1.944	0.348	1.595	+
	A123	1.173	0.306	0.866	+
	A126	0.618	0.405	0.212	-
A	A129	1.585	0.271	1.313	+
AHA	A131	1.439	0.256	1.182	+
(SC)	A133	2.450	0.280	2.169	+
	A138	0.434	0.253	0.180	-
	A139	1.421	0.272	1.148	+
	A140	1.124	0.364	0.759	+
	A141	0.961	0.265	0.695	+
	A148	0.681	0.279	0.401	+
	A149	1.322	0.304	1.017	+
	A150	1.145	0.240	0.904	+
	A154	0.280	0.263	0.016	-
	A155	0.249	0.172	0.076	-
	A158	0.524	0.320	0.204	-

	A160	0.238	0.286	0	-
	A162	0.254	0.322	0	-
	H1	0.163	0.190	0	-
	H2	0.376	0.199	0.176	-
B	H3	0.192	0.230	0	-
(S)	H4	0.227	0.198	0.028	-
	H5	0.219	0.212	0.006	-
	H6	0.352	0.181	0.17	-
	H7	0.264	0.184	0.079	-
	N129	0.509	0.666	0.057	-
	N131	0.338	0.194	0.143	-
	N132	0.188	0.426	0	-
C	N134	0.649	0.742	0	-
(AHP)	N136	1.295	0.355	0.939	+
	N137	0.264	0.179	0.084	-
	N138	0.747	0.407	0.339	-
	N139	0.558	0.339	0.218	-
	N152	0.373	0.426	0	-
	T1	0.098	0.273	0	-
D	T2	0.299	0.336	0	-
(T)	T3	0.269	0.261	0.007	-
	L1	0.130	0.270	0	-
(L)	L2	0.141	0.188	0.3	-
	L3	0.298	0.263	0.37	-



Con respecto a los resultados de los ensayos cualitativos del amiboporo de *E. histolytica* y los diferentes grupos (A-D) de suero de pacientes y las IgG's de conejo en el WB se presentan algunos resultados en la figura 14.



**Figura 14. Western Blot que muestra identificación de amiboporo por anticuerpos específicos presentes en pacientes con SC-AHA.** A) Anti-amiboporo IgG's (conejo); B) los sueros de SC-AHA resultaron positivos; C) sueros de sujetos sanos; D) sueros de pacientes con leishmaniasis y con asterisco. (\*) los sueros SC-AHA resultaron negativos. (SC) Sugerencia clínica.

Los resultados obtenidos en las pruebas de WB y ELISA usando amiboporo se resumen en la siguiente tabla, en términos de porcentaje (Tabla 9).

**Tabla 9. Porcentajes de la población de sueros en el presente estudio. A) AHA-Absceso Hepático Amibiano; SC-Sugerencia Clínica; B) Sanos- sueros de sujetos sanos; C) AHP- Absceso Hepático Piógeno; D) Leishmaniasis; Tripanosomiasis; (-) negativo; (+) positivo.**

Grupos de Sueros Humanos				Resultados			
Grupo	Suero	ELISA	WB	ELISA		WB	
		No. Muestras		%	%		
A	AHA (SC)	25	25	(+)15	60	(+)15	60
				(-)10	40	(-)10	40
B	Sanos	7	7	(+)0	0	(+)0	0
				(-)7	100	(-)7	100
C	AHP	9	9	(+)1	11.1	(+)1	11.1
				(-)8	88.8	(-)8	88.8
D	Leishmaniasis	3	3	(+)0	0	(+)0	0
				(-)3	100	(-)3	100
	Tripanosomiasis	3	3	(+)0	0	(+)0	0
				(-)3	100	(-)3	100

Se realizó el análisis estadístico con la curva de característica operativa del receptor (ROC), a partir de los resultados obtenidos del ensayo de ELISA con el extracto rico en membranas de trofozoitos amibianos como antígeno y también el ensayo de ELISA utilizando como antígeno el amiboporo puro y teniendo la referencia de los resultados de WB con los sueros de AHA y AHP.

**Tabla 10. Matriz de decisión: ensayo de ELISA.** Utilizando extracto proteico rico en membranas de trofozoítos de *E. histolytica*.

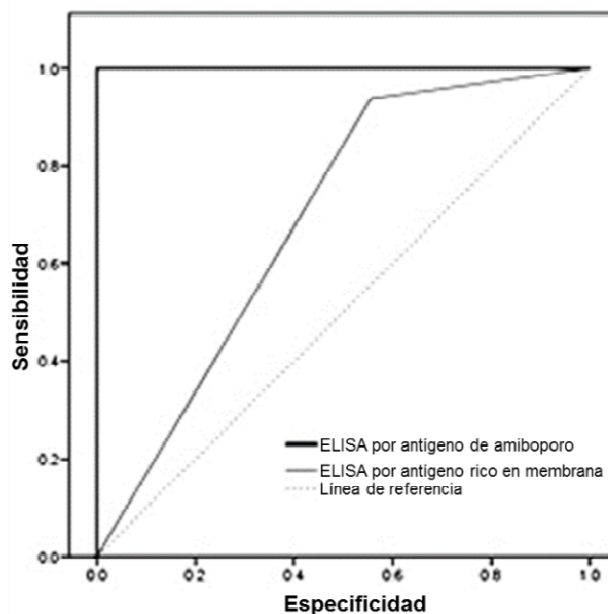
		Estatus de condición verdadera (WB)			
		Positivo	Negativo	Total	Porcentaje (%)
Resultados	Positivo	15	10	25	---
	Negativo	1	8	9	---
	Total	16	18	34	---
	Sensibilidad	---	---	---	93.75
	Especificidad	---	---	---	44.44

**Tabla 11. Matriz de decision: ensayo de ELISA.** Usando amiboporo puro, detectando anticuerpos anti-amiboporo.

		Estatus de condición verdadera (WB)			
		Positivo	Negativo	Total	Porcentaje (%)
Resultados	Positivo	16	0	16	---
	Negativo	0	18	18	---
	Total	16	18	34	---
	Sensibilidad	---	---	---	100
	Especificidad	---	---	---	100

El análisis estadístico de los datos obtenidos de lastablas 10 y 11 se muestran en la figura 15, que nos señala el 100% de sensibilidad y también el 100% de

especificidad para el ensayo de ELISA con amiboporo puro tomando como referencia los valores de WB y no así, el antígeno rico en membranas.



**Figura 15.** Curva ROC para los dos métodos ELISA. Utilización de SPSS 23.0. La gráfica muestra los resultados obtenidos de los ensayos de ambas ELISAs y se toma como referencia el resultado de WB donde se utiliza el amiboporo puro.

## 9. Discusión

Hasta hoy se cuenta con evidencias de estudios *in vitro* (36,44,48,78,80,181,182) y modelos animales (183-186) que indican que la *E. histolytica* tiene una amplia gama de factores de patogenicidad, entre ellos el amiboporo (72,187) con la capacidad de dañar a la membrana de la célula blanco. Con base en ello se purificó el amiboporo siguiendo el método descrito por Leippe y colaboradores (95) y que se reprodujo en las fracciones obtenidas de la columna de filtración (Figura 6), incluyendo la ubicación de la zona de

actividad del amiboporo. Lo que se destaca en la figura 6 es la zona restringida de las fracciones con actividad que mostraron un pico, con una absorbancia mínima con respecto al cromatograma total; indicando que desde un inicio la cantidad de proteína de interés en la purificación es poca.

Por la propiedad de la columna de filtración que es preparativa y por otro lado se utilizó un sobrenadante amibiano, por lo consiguiente era de esperar que la fracción obtenida no estuviera pura, por lo cual se empleó otra columna de cromatográfica de intercambio iónico.

El resultado observado en el cromatograma de la segunda columna cromatográfica indicó tres picos al emplear un gradiente discontinuo donde se destaca que el pico con 0.1 M NaCl con el amortiguador de tris presentó actividad de porina. Si comparamos la figura 7 con la figura 9 se interpreta que al ser la fracción con menos componentes proteicos contaminantes, la actividad de porina es mayor en la curva de la figura 9 y con un valor más alto de fluorescencia, como en su momento lo señaló el trabajo de Rosenberg y colaboradores (170).

Con el último paso de la purificación que se introdujo y que fue la electroelución se eliminaron las bandas proteicas más tenues observadas en la electroforesis desnaturizante. Para poder identificar al amiboporo en las distintas fracciones obtenidas (5 mL por tubo) en el colector de fracciones, que fueron 80 tubos; se empleó el ensayo de despolarización de liposomas para cada una de las fracciones, determinando actividad en las fracciones 38 a la 43 y cotejando el grado de pureza por electroforesis desnaturizante y nativa al 16 % se determinó que de esas, solamente tres fracciones realmente estaban puras y

con actividad, de tal manera que se hizo un lote donde se concentró y se cuantificó, y nuevamente se verificó la actividad del amiboporo y su pureza como se muestra en la figura 12, donde se aprecia que tanto la pendiente de la curva es perpendicular y el porcentaje de fluorescencia son mayores a las evaluaciones anteriores. También se presentó en la figura 11 el perfil de la pureza del amiboporo; por otro lado, se verificó por espectrometría de masas que la molécula purificada fue el amiboporo A de *E. histolytica* virulenta de la cepa HM-1:IMSS como se muestra en la tabla 6, y también se verifica en los trabajos realizados por Leippe y colaboradores (171) y Zang y colaboradores (80). Para tener una integración de las magnitudes de las cantidades de proteína en cada una de las distintas fases de la purificación del amiboporo A; en donde se demarca que el porcentaje de recuperación fue de 0.03% de lo anterior, se puede señalar que la cantidad de amiboporo que producen la amiba es poco o bien que el método propuesto por Leippe no es el adecuado para purificar dicha molécula.

Una vez identificadas las moléculas purificadas como por ejemplo el amiboporo, se utilizó como antígeno en conejos para estimularlos y producir en ellos anticuerpos policlonales anti-amiboporo A. Se visualizó que era necesario tener para el ensayo de WB un control positivo en el sistema de los sueros humanos como también en el WB de los extractos totales de otros parásitos, como podemos observar en la figura 13, no hay reacción cruzada con los anticuerpos anti-amiboporo, cuando menos en dos especies parasitarias apoyando la posibilidad de utilizar el amiboporo en pruebas de diagnóstico de laboratorio para el absceso hepático amibiano.

El absceso hepático es con mucho la manifestación más común de la amibiasis extraintestinal. Como se mencionó en los antecedentes, el aumento de anticuerpos circulantes en pacientes con AHA puede detectarse poco después de que aparezcan los síntomas. Dicha enfermedad es una complicación que pone en peligro la vida de los pacientes, su diagnóstico rápido y preciso es crucial, por lo que el serodiagnóstico de los pacientes con AHA puede ser de gran ayuda en la decisión clínica y el ahorro de costos para evitar otros tratamientos y la hospitalización prolongada innecesaria. Aunque la búsqueda de antígenos de *E. histolytica* reconocidos por los sueros inmunes de pacientes con absceso hepático amibiano fue referida por primera vez por Joyce y col. en 1988 (188) existen trabajos recientes (189,190) estableciendo condiciones diferentes para los ensayos serológicos en el diagnóstico de AHA. Lo anterior refleja que todavía existe la necesidad de un método de diagnóstico fiable para AHA. El empleo del método de ELISA, y utilización de una mezcla indefinida de antígenos de *Entamoeba histolytica*, es uno de los métodos serológicos más utilizado por los laboratorios de diagnóstico que es altamente sensible y específico; aparte de ser cuantitativo.

En el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", los pacientes son diagnosticados al principio en el Servicio Médico sobre la base de los síntomas clínicos y otras pruebas como el ultrasonido. A partir de entonces, en el Servicio de Medicina Experimental (EMS) en el mismo Hospital, se realiza un ELISA indirecto con las muestras de suero de pacientes para lograr un diagnóstico diferencial con absceso hepático piogénico (AHP). El ELISA indirecto se realiza con un extracto rico en membranas (191) como antígeno, a partir de trofozoítos de *E. histolytica* HM-1:IMSS axénicamente cultivada. La

cepa HM-1:IMSS se considera como un cepa virulenta de referencia y se utiliza comúnmente en la investigación y clínica de amibiasis.

Un grupo de 34 muestras de suero de pacientes del Hospital General, fue diagnosticado (por ultrasonido) con absceso hepático; de ellos, 25 fueron confirmados en el EMS con AHA por su resultado positivo con el ELISA indirecto utilizando extracto proteico rico en membranas como antígeno, y los restantes 9 con AHP (192). Hemos informado previamente la purificación del amiboporo en su conformación nativa y con la actividad de formación de poro de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS (180); en este estudio, hemos analizado lo mismo con las 34 muestras de sueros de pacientes mencionadas, un ELISA indirecto y Western Blot utilizando como antígeno el amiboporo purificado. Los resultados obtenidos por ELISA indirecto y Western Blot utilizando amiboporo purificado fueron idénticos: los sueros positivos o negativos por ELISA dieron el mismo resultado por WB. Se evaluó la sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto utilizando el extracto rico en membranas como antígeno o el amiboporo purificado. Por ello, consideramos el resultado del WB como un estado de condición verdadera o certera.

La sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto con el amiboporo fue de 100%, e indicó que 10 muestras de suero que se consideraron positivas con el ELISA indirecto utilizando el extracto rico en membranas fueron “falsos positivos”, por lo que estos pacientes habrían sido tratados innecesariamente. Por otra parte, una de las muestras de suero detectadas originalmente como AHP, resultó positiva para AHA (falso negativo), aunque no tenemos una explicación razonable para este resultado. Existen en la literatura estudios serológicos para el diagnóstico de AHA en los que se utilizan proteínas



recombinantes; por ejemplo ha sido reportado (146) la piruvato fosfato dicinasa recombinante (rPPDK) de *E. histolytica* como un marcador potencial en el diagnóstico de AHA; sin embargo, aunque la especificidad de WB usando la rPPDK fue de 100% cuando se comparó con la lectina con Gal/GalNac recombinante, la sensibilidad del ensayo fue del 93% y la especificidad del 100% sólo se alcanza cuando se utilizan como anticuerpo secundario, uno para el subtipo IgG4. Aunque los subtipos predominantes de IgG en la amibiasis han sido: IgG1 e IgG4, los sueros de pacientes con AHA muestran valores de ELISA para todos los subtipos de anticuerpos superiores a los de controles sanos (193), por lo que se debe obtener una especificidad del 100% con una mezcla de todos los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes. Una ventaja clara de usar un antígeno purificado en su conformación nativa sobre una recombinante en un ensayo serológico es que asegura que los anticuerpos que va a detectar son exactamente los que se generan en la respuesta humoral. Por otra parte, la estructura nativa del amiboporo también se corroboró por su habilidad confirmada para formar poros.

Los resultados aquí obtenidos nos permiten proponer el uso del amiboporo purificado de *E. histolytica* como un marcador potencial de diagnóstico para AHA.

En el presente trabajo se menciona por primera vez el uso del amiboporo en pruebas inmunológicas para la detección del AHA, lo que permite ampliar las alternativas para el diagnóstico de dicha enfermedad. Otro aspecto interesante es que al revisar los trabajos publicados en revistas especializadas de amibiasis se encontraron en los últimos años muy pocos ensayos sobre propuestas de diagnóstico de laboratorio, con la misma directriz.

Los resultados del trabajo aportan conocimientos adicionales a las pruebas de diagnóstico de laboratorio por lo que no hay que descartar el papel importante que tiene el amiboporo en el daño inducido por los trofozoítos y de utilizar como una herramienta corroborativa en dichas pruebas.

## **10. Conclusiones**

- ✓ En este estudio, mediante el uso del amiboporo previamente purificado y utilizando las pruebas de inmunoensayo de ELISA y WB, se detectaron anticuerpos anti-amiboporo en suero de pacientes con AHA.
- ✓ El análisis estadístico realizado con la curva de ROC resultó con 100% de sensibilidad y especificidad en el ensayo de ELISA indirecto, por lo que nos permite proponer la utilización del ensayo de ELISA como un ensayo complementario en el diagnóstico de AHA en humanos.

## 11. Perspectivas

- Si estamos de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y de ser posible complementar el proyecto de investigación en el monitoreo de suero de pacientes con colitis amibiana para vislumbrar o discriminar el grado de detección entre el AHA y la colitis amibiana.
- El hecho de tener los ensayos preliminares de extractos de otros parásitos distintos a la amiba y que no se establezca una reacción cruzada, se visualiza un buen inicio para una prueba de detección y tal vez de realizar ensayos de otras clases de parásitos intestinales que consolide al amiboporo como un buen candidato para los ensayos de diagnóstico de laboratorio.
- Probar suero de pacientes enfermos de infecciones gastrointestinales de otros países que no sean endémicos de la amibiasis. Con la finalidad de obtener una mayor integración del proceso de la enfermedad de amibiasis.

## 12. Bibliografía

1. World Health Organization. (1997). Amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec, 72:97-100.
2. Walsh J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. Reviews of Infectious Diseases 8(2): 228-238.
3. Gatti S., Swierczynski G., Robinson F., Anselmo M., Corrales J., Moreira J. (2002). Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica* – *Entamoeba dispar* complex: a study of incidence in a remote rural area of Ecuador. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67(1):123-7.
4. Gathiram V. & Jackson T.F. (1987). A longitudinal study of asymptomatic carries of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. South African Medical Journal 72(10): 669-72.
5. Caballero-Salcedo A., Viveros-Rogel M., Salvatierra B., Tapia-Conyer R., Sepulveda-Amor J., Gutiérrez G. & Ortiz-Ortiz L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50(4):412-9.
6. Ximénez C. (2000) Parasitosis intestinal en México. Cuadernos Funsalud 34. Fundación Mexicana para la Salud. Ed. Mex. D.F.
7. Dirección General de Epidemiología de la Secretaria de Salud del Gobierno Federal (México). Disponible en: <http://www.dgepisalud.gobmx/infoepi/indexhtm>.
8. Haque R., Ali I.K., Akther S. & Petri W.A. Jr. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba*

- histolytica* infection. Journal of Clinical Microbiology 36(2):449-52.
9. Haque Rashidul, Huston Christopher, Hughes Molly, Houpt Eric and Petri William Jr. (2003). Current concepts amebiasis. The New England Journal of Medicine, 348:1565-73.
  10. Ali I.K., Clark C.G. & Petri W.A. Jr. (2008). Molecular epidemiology of amebiasis. Infection, Genetics and Evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 8(5):698-707.
  11. Petri W.A. Jr., Haque R., Lyerly D., Vines R.R. (2000) Estimating the impact of amebiasis in health. Parasitology Today, 16(8):320-321.
  12. Ximénez C., Morán P., Ramos F. & Ramiro M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. Medicina Interna de México 23(5):398-407.
  13. Rose A.N., Franklin W.M., Hormuzd A.K., Mohammad A., Charles A. and Clarence M.L. (2004). Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Journal National Medical Association 96(5):671-677.
  14. <http://www.salud.mx>
  15. Ramos F., Morán P., González E., García G., Ramiro M., Gómez A., García de León M.C., Melendro E.I., Valadez A., Ximénez C. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* prevalence infection in a rural mexican community. Experimental Parasitology 110(3):327-230.
  16. Leder K. & Weller P.F. (2010). Extraintestinal *Entamoeba histolytica* amebiasis. Disponible en [http://uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey =parasite/8435&selectedTitle=1%7E11&source=search\\_result#](http://uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey =parasite/8435&selectedTitle=1%7E11&source=search_result#)

17. González Vázquez M.C., Carabarin Lima A., Baylon Pacheco L. & Rosales Encina J.L. (2012). De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica* Elementos 87:13-18. Disponible en [www.elementos.buap.mx](http://www.elementos.buap.mx)
18. Mann B.J. & Loftus B.J. (2002). The Molecular Biology and Pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Pathogen Genomics Impact on Human Health. Shaw Karen J. ed. Humana Press. N.J., U.S.A. 281-302.
19. Petri W.A. Jr., Jackson T.F., Gathiram V., Kress K., Saffer L.D., Snodgrass T.L., Chapman M.D., Zeren Z. & Mirelman D. (1990). Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infection and Immunity 58(6):1802-1806.
20. Romero C.R., Macias P.M., Tay S.J. et al (1994) Amibiasis. Segunda Reunión de Expertos. Mex Searle de México S.A. de C.V.
21. Romero C.R. (2008). Amibiasis en el siglo XXI. Sarcodinos o amibas de importancia médica. Robert Guerrero L. Sevilla Editores S.A. de C.V., México pp. 16-28.
22. Martínez P.A. Amibiasis. Capítulo 3 Patología de la amibiasis. Pérez Tamayo R. Edit. Panamericana S.A. México D.F. 1986. Pp. 42-78.
23. Brandt H. and Pérez Tamayo R. (1970). Amibiasis. Prensa Médica Mexicana, México D.F.
24. Petri W.A. Jr., Smith R.D., Schlesinger P.H., Murphy C.F. & Ravdin J.I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediated the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. The Journal of Clinical Investigation 80(5):1238-1244.
25. Petri W.A. Jr., Chapman M.D., Snodgrass T., Mann B.J., Broman J.

- & Ravdin J.I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. The Journal of Biological Chemistry 264(5):3007-12.
26. Cheng X.J., Tsukamoto H., Kaneda Y. & Tachibana H. (1998) Identification of the 150 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose- and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. Parasitology Research 84(8):632-639.
27. Mann B.J., Torian B.E., Vedvick T.S. & Petri W.A. Jr. (1991). Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(8):3248-52.
28. Ramakrishnan G., Ragland B.D., Purdy J.E. & Mann B.J. (1996). Physical mapping and expression of genes families encoding the N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Molecular Microbiology 19(1):91-100.
29. McCoy J.J., Mann B.J., Vedvick T.S., Pak Y., Heimark D.B. & Petri W.A. Jr. (1993). Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin. The Journal of Biological Chemistry 268(32):24223-31.
30. McCoy JJ, Mann BJ, Vedvick T, Petri WA Jr. (1993) Sequence analysis of genes encoding the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesion light subunit. Molecular and Biochemical Parasitology 61(2):325-28.
31. Ramakrishnan G., Lee S., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (2000). *Entamoeba histolytica*: Deletion of the GPI anchor signal sequence on the Gal/GalNAc lectin light subunit prevents its assembly into the lectin

- heterodimer. *Experimental Parasitology* 96(1):57-60.
32. Ravdin J.L. & Guerrant R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 68(5):1305-1313.
  33. Gutiérrez-Kobeh L., Cabrera N. & Pérez-Montfort R. (1996). A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Parasitology* 83(2):234-241.
  34. Chadee K., Petri W.A. Jr., Innes D.J. & Ravdin J.I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Clinical Investigation* 80(5):1245-1254.
  35. Guerrant R.L., Brush J., Ravdin J.I., Sullivan J.A. & Mandell G.L. (1981) Interactions between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases* 143(1):83-93.
  36. Petri W.A. Jr., Snodgrass T.L., Jackson T.F., Gathiram V., Simjee A.E., Chadee K. & Chapman M.D. (1990). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *Journal of Immunology (Baltimore. Md.: 1950)* 144(12):4803-4809.
  37. Vines R.R., Ramakrishnan G., Rogers J.B., Lockhart L.A., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (1998). Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a  $\beta$ -2 integrin motif. *Molecular Biology of the Cell* 9(8):2069-2079.



38. Ravdin JI, Croft BY & Guerrant RL (1980) Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. The Journal of Experimental Medicine 152(2):377-390.
39. Li E., Becker A. & Stanley S.L. Jr. (1989). Chinese hamster ovary cell deficient in N-acetyl-glucosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica*-mediated cytotoxicity. Infection and Immunity 57(1):8-12.
40. Ravdin J.I., Stanley P., Murphy C.F. & Petri W.A. Jr. (1989.) Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. Infection and Immunity 57(7): 2179-86.
41. Saffer L.D. & Petri W.A. Jr. (1991). Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. Infection and Immunity 59(12):4681-3.
42. Li E., Becker A. & Stanley S.L. (1988). Use of Chinese hamster ovary cells with altered glycosylation patterns to define the carbohydrate specificity of *Entamoeba histolytica* adhesion. The Journal of Experimental Medicine 167(5):1725-30.
43. Dodson J.M., Lenkowski P.W. Jr., Eubanks A.C., Jackson T.F., Napodano J., Lyerly D.M., Lockhart L.A., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (1999). Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. The Journal of Infectious Diseases 179(2):460-6.
44. Pillai D.R., Wan P.S., Yau Y.C., Ravdin J.I. & Kain K.C. (1999). The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170-kilodalton subunit) is sufficient for high-affinity Gal/GalNAc-specific

- binding *in vitro*. Infection and Immunity 67(8):3836-41.
45. Ankri S., Padilla-Vaca F., Stolarky T., Koole L., Katz U. & Mirelman D. (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNAc lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. Molecular Microbiology 33(2): 327-337.
  46. Katz U., Ankri S., Stolarsky T., Nuchamowitz Y. & Mirelman D. (2002). *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its Gal-lectin are less virulent. Molecular Biology of Cell 13(12): 4256-4265.
  47. Coudrier E., Amblard F., Zimmer C., Roux P., Olivo-Marín J.C., Rigother M.C. & Guillén N. (2005). Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. Cellular Microbiology 7(1):19-27.
  48. Tavares P., Rigother M.C., Khun H., Roux P., Huerre M. & Guillén N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. Infection and Immunity 73(3): 1771-1778.
  49. Braga L.L., Ninomiya H., McCoy J.J., Eacker S., Wiedmer T., Pham C., Wood S., Sims P.J. & Petri W.A. Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. The Journal of Clinical Investigation 90(3): 1131-1137.
  50. Meza I., Cazares F., Rosales-Encina J.L., Talamás-Rohana P. & Rojkind M. (1987). Use of antibodies to characterize a 220- kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. The Journal of Infectious Diseases

156(5): 798-805.

51. Rosales-Encina J.L., Meza I., López-De-León A., Talamás-Rohana P. & Rojkind M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Diseases* 156(5):790-797
52. Arroyo R. & Orozco E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesion. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23(2):151-158.
53. Rigother M.C., García-Rivera G., Guaderrama M. & Orozco E. (1992). Purification and functional characterization of the 112 kDa 80exicana of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 23(2):239-41.
54. De la Torre A, De la Hoz-Couturier R, Landa L & Sepulveda B. (1971) Cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigación Médica* 2(1):165-172.
55. Bracha E. Nuchamowitz Y, Anbar M & Mirelman D. (2006). Transcriptional silencing of multiple genes in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *PloS Pathogens* 2(5):e48
56. Kisson-Singh V, Mortimer L & Chadee K. (2011). *Entamoeba histolytica* cathepsin-like enzymes: interactions with the host gut. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 712:62-83.
57. Bruchhaus I., Loftus B.J., Hall N. & Tannich E. (2003). 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* 2(3): 501-509.
58. Que X., Brinen L.S., Perkins P. et al. (2002). Cysteine proteinases from

- distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119(1): 23-32.
59. McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ & Bouvier J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* 47:821-853.
  60. Tillack M., Biller L., Irmer H. et al. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* 8. Art. 170.
  61. Jacobs T., Bruchhaus I., Dandekar T., Tannich E. & Leippe M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 27(2):269-276.
  62. García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, González -Robles A & Orozco E. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin from the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 33(3):556-568.
  63. Que X. & Reed S.L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2):196-206.
  64. Stanley S.L. & Reed S.L. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions: VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *American J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 280(6):G1049-G1054.
  65. Keene W.E., Hidalgo M.E., Orozco E. & McKerrow J.H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Experimental*

- Parasitology 71(2):199-206.
66. Muñoz M.L., Calderon J. & Rojkind M. (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. The Journal of Experimental Medicine 155(1): 42-51.
  67. Serrano J.J., de la Garza M., Moreno M.A., Tovar R., León G., Tsutsumi V. & Muñoz M.L. (1994). *Entamoeba histolytica*: electron-dense granules secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. Molecular Microbiology 11(4):787-792
  68. Seydel K.B., Li E., Swanson P.E. & Stanley S.L. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in s SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. Infection and Immunity 65(5):1631-1639.
  69. Zang Z., Wang I., Seydel K.B., Li E., Ankri S., Mirelman D. & Stanley S.L. Jr. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. Molecular Microbiology 37(3):542-548.
  70. Ankri S., Stolarsky T. & Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. Molecular Microbiology 28(4):777-785.
  71. Tsutsumi V & Shibayama M. (2006) Experimental amebiasis: a selected review of some *in vivo* models. Archives of Medical Research 37: 210-220.
  72. Leippe M., Andrä J., Nickel R., Tannich E. & Muller-Eberhard H.J. (1994). Amoebapores a family of membranolytic peptides from cytoplasmic

- granules of *Entamoeba histolytica*: isolation primary structure and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular Microbiology* 14(5): 895-904.
73. Leippe M., Tannich E., Nickel R., van der Goot G., Pattus F., Horstmann R.D. & Müller-Eberhard H.J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *The EMBO Journal* 11(10):3501-3506.
74. Hecht O., Van Nuland N.A., Schleinkofer K., Dingley A.J., Bruhn H., Leippe M. & Grotzinger J. (2004). Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry* 279(17):17834-41.
75. Gutschmann T., Riekens B., Bruhn H., Wiese A., Seydel U. & Leippe M. (2003). Interaction of amoebapore and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* 42(32): 9804-9812.
76. Bruhn H., Riekens B., Berninghausen O. & Leippe M. (2003). Amoebapores and NK-Lysin members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals – a comparative functional analysis. *The Biochemical Journal* 375(Pt 3):737-744.
77. Nickel R., Ott C., Dandekar T. & Leippe M. (1999). Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*: similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *European Journal of Biochemistry* 265(3):1002-1007.
78. Bracha R., Nuchamowitz Y., Leippe M. & Mirelman D. (1999). Antisense

- inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Molecular Microbiology* 34(3): 463-472.
79. Bracha R., Nuchamowitz Y. & Mirelman D. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 2(2):295-305.
80. Zang X., Zang Z., Alexander D., Bracha R., Mirelman D. & Stanley S. Jr. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infection and Immunity* 72(2):678-683.
81. Ravdin J.I. (1995). Amebiasis. *Clinical Infectious Diseases* 20(6):1453-64; quiz 1465-6.
82. Munford R.S., Sheppard P.O. & O'Hara P.J. (1995). Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal of Lipid Research* 36(8):1653-63.
83. Andersson M., Gunne H., Agerberth B., Boman A., Bergman T., Sillard R., Jornvall H., Mutt V., Olsson B., Wigzell H., Dagerlind A., Boman H.G. & Gudmundsson G.H. (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO Journal* 14(8):1615-25.
84. Peña S.V., Hanson D.A., Carr B.A., Goralski T.J. & Krensky A.M. (1997). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *Journal of Immunology* 158(6):2680-8.

85. Bruhn H. & Leippe M. (1999). Comparative modeling of amoebapores and granulysin based on the NK-lysin structure-structural and functional implications. *Biological Chemistry* 380(7-8):1001-1007.
86. Miteva M., Andersson M., Karshikoff A. & Otting G. (1999). Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Letters*. 462(1-2):155-158.
87. Ruyschaert J.M., Goormaghtigh E., Homble F., Andersson M., Liepinsh E. & Otting G. (1998) Lipid membrane binding of NK-lysin. *FEBS Letters* 425(2): 341-344.
88. Anderson D.H., Sawaya M.R., Cascio D., Ernst W., Modlin R., Krensky A. & Eisenberg D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of Molecular Biology* 325(2):355-365.
89. Keller F., Hanke W., Trissl D. & Bakker-Grunwald T. (1989). Pore-forming protein from *Entamoeba histolytica* forms voltage- and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates. *Biochimica et Biophysica Acta* 982(1): 89-93.
90. Leippe M., Ebel S., Schoenberger O.L., Horstmann R.D. & Müller-Eberhard H.J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(17):7659-7663.
91. Leippe M. (1997). Amoebapores. *Parasitology Today* 13(5):178-83.
92. McCoy J.J., Mann B.J. & Petri W.A. Jr. (1994). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*, or how lectins let parasite stick around. *Infection and Immunity* 62(8):3045-3050.



93. Saffer L.D. & Petri W.A. Jr. (1991). *Entamoeba histolytica*: recognition of alpha- and beta-galactose by the 260-kDa adherence lectin. *Experimental Parasitology* 72(1):106-108.
94. Luaces A.L. & Barret J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical Journal* 250(3):903-909.
95. Leippe M., Ebel S., Schoenberger O.L., Horstmann R.D. & Müller-eberhard H.J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* 88(17):7659-7663.
96. Coudrier E., Amblard F., Zimmer C., Roux O., Olivos-Marin J.C., Rigother M.C. & Guillén N. (2005). Myosin II and the Gal/GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 7(1):19-27.
97. Quintanar-Quintanar M.E., Jarillo-Luna A., Rivera-Aguilar V., Ventura-Juárez J., Tsutsumi V., Shibayama M., Campos-Rodríguez R. (2004). Immunosuppressive treatment inhibits the development of amebic liver abscesses in hamsters. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 10(9):B317-B324.
98. Snow M., Chen M., Guo J., Atkison J. & Stanley S.L. Jr. (2008). Differences in complement mediated killing of *Entamoeba histolytica* between men and women. An explanation for the increased susceptibility of men to invasive amebiasis? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(6):922-923.
99. Nicholls S.R. & Alvarez A.C. Amibiasis (2005). *Tratado de Medicina*

- Interna. 4 Ed. Medica Celus. Colombia. Pp. 1452-1459.
100. Kretschmer R. (1994) Amibiasis infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Cap. 8 Respuesta de inmunidad humoral. Pérez Montfort R. y Kretschmer R. Ed. Trillas México. Pp. 120-134.
  101. Diamond LS. (1982). A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. Journal of Parasitology 68(5):958-959.
  102. Thompson PE, Graedel SK, Schneider CR, Stucki WP, Gordon RM. (1968). Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. Bulletin of the World Health Organization 39(3):349-365.
  103. Ortiz-Ortiz & Rosales Burjas. (2007). Amibiasis: Inmunología y Diagnóstico. Revista Médica de la Extensión protuguesa-ULA. 1(1):45-54.
  104. López Vaca D.A. (2007). Proceso Inmunológico de la amebiasis intestinal. Revista Médica. (Cochabamba). 18(28):76-77.
  105. Nakada-Tsukui K. & Nozaki T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. Frontiers in Immunology. 7:175.
  106. Healy G.R., Visvevara G.S. & Kagan I.G. (1974). Observations on the persistence of antibodies to *E. histolytica*. Archivos de Investigación Medica (México) 5(2):495-500.
  107. Kaur U., Sharma A.K., Sharma M., Vohra H. (2004). Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAv lectin-specific antibody response in an endemic area. Scandinavian Journal of Immunology. 60:524.

108. Viasus D.F., Pinilla A.E. & López M.C. (2006). Inmunología del absceso hepático amibiano. *Revista de Salud Pública (Colombia)*; 6(1):80.
109. Asgharpour A., Gilchrist C., Baba D., Hamano S., Houpt E. (2005). Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1 + cells. *Infection and Immunity*. 73:4522.
110. Guo X., Houpt E., Petri W.A. (2007). Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and survival strategies. *Current Opinion in Immunology*. 19:376.
111. Ximénez C., Leyva O., Morán P., Ramos F., Melendro E.I., Ramiro M., Martínez M.C., Muñoz O., Kretschmer R.R., Arellano J. (1993). *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 87:31.
112. Harries J. (1982). Amoebiasis: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 75(3):190-197.
113. Krupp I.M. & Powell S.J. (1971). Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20(3):414-420.
114. Chacin Bonilla L. & Bonpart D. (1981). A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30(6):1201.
115. López M., Quiroz D. & Pinilla A. (2008). Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal. *Acta Médica Colombiana* 33(2):75-83.
116. Pinilla AE, López MC, Castillo B, Murcia M, Nicholls RS, Duque S et al. (2003). Enfoque clínico y diagnóstico del absceso hepático. *Revista Médica de Chile* 131(12):1411-20.

117. Clark C.G. & Diamond L.S. (1991). The Laredo strain and other '*Entamoeba histolytica*-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46(1):11-18.
118. Shibayama-Hernández H., Pedroza-Gómez J., Rivero-Baños B., Shibayama M., Serrano-Luna J. & Tsutsumi V. (2000). A simple stool concentration method for the detection and preservation of the vegetative forms of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. *Archives of Medical Research* 31(4): S30-S31.
119. Krogstad DJ, Spencer HC Jr, Healy GR, Gleason NN, Sexton DJ and Herron CA. (1978). Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Annals of Internal Medicine* 88(1):89-97.
120. Boeck, W. C. y Drbohlav, J. (1925). The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Hygiene*. 5:371.
121. Robinson G.L. (1968). The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62(2):285-294.
122. Diamond L.S., Harlow D.R. & Cunnuck C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72(4):431-432.
123. Cheng H.S. & Wang L.C. (1999). Amoebiasis among institutionalized psychiatric patients in Taiwan. *Epidemiology and Infection* 122(2):317-22.
124. Clark C.G. & Diamond L.S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3):329-341.

125. Jensen J.B. (1983). Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonads* and *Giardia*. In JB Jensen (Eds), *In vitro* cultivation of protozoan parasites. Boca Raton FL: CRC Press, pp 67-109.
126. Sargeant P.G., Williams J.E. & Grene J.D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72(5):519-521.
127. Sargeant P.G. (1987). The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. *Parasitology Today* 3(2):40-43.
128. Ardic N., Tanyuksel M., Doganci L. & Gun H. (1998). Evaluation of zymodemes of pathogen and non-pathogen *Entamoeba histolytica*. *Flora* 3:125-133 (in Turkish)
129. Bruckner D.A. (1992). Amoebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 4:356.
130. Ohnishi K. & Murata M. (1997). Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. *Epidemiology and Infection* 119(3):363-367.
131. Weinke T., Friedrich-Jänicke B., Hopp P. & Janitschke K. (1990). Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *The Journal of Infectious Diseases* 161(5):1029-1031.
132. Walderich B., Weber A. & Knobloch J. (1997). Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and resident of endemic regions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57(1):70-74.
133. Zengzhu G., Bracha R., Nuchamowitz Y., Cheng-I W. & Mirelman D.

- (1999). Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* 37(9):3034-3036.
134. Knobloch J. & Mannweiler E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32(4):727-732.
135. Stevens D.L., Taylor R.G., Everett E.D., Oweby L. & McNitt T.R. (1979). Amebic liver abscess. Report of a case presenting with nonreactive serologic tests for *Entamoeba histolytica*. *The American Journal of Gastroenterology* 72(3):234-238.
136. Tanyuksel M., Erguven S., Tanriover B., Baylan O. & Gun H. (1995). Comparison of the serologic tests (IFA, ELISA) with microscopy using for the diagnosis of amoebosis. *Acta Parasitologica. Turc* 19:476-482 (in Turkish).
137. Garcia L.S., Bruckner D.A., Brewer T.C. & Shimizu R.Y. (1982). Comparison of indirect fluorescent-antibody amoebic serology with counterimmunoelectrophoresis and indirect hemagglutination amoebic serologies. *Journal of Clinical Microbiology* 158(4):603-605.
138. Pearson R.D. & Hewlett E.L. (1988). Amebiasis in travelers, p 556-562. In JI Ravdin (ed) *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc New York, N.Y.
139. Nicholls R., Restrepo M., Duque S., López M.C. & Corredor A. (1994). Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89(1):53-8.

140. Abd-Alla M.D. & Ravdin J.I. (2002). Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhea in Cairo, Egypt. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 7(4):365-370.
141. Ravdin J.I., Jackson T.F., Petri W.A. Jr., Murphy C.F., Ungar B.L., Gathiram V., Skiligiannis J. & Simjee A.E. (1990). Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Infectious Disease* 162(3): 768-772.
142. Joyce P.M. & Ravin J.I. (1988). Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38(1):77-80.
143. Singh K., Vohra H., Vinayak V.K. & Ganguly N.K. (2000). Partial characterization of a 36 kDa antigen of *Entamoeba histolytica* and its recognition by sera from patients with amoebiasis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 27(1):23-30.
144. Ximénez C., Sosa O., Leyva O., Morán P., Melendro E.I. & Ramiro M. (1992). Western Blot of *Entamoeba histolytica* antigen fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 86(2):121-127.
145. Stanley S.L. Jr., Terry F.H., Jackson G., Foster L. & Singh S. (1998). Longitudinal study of the antibody response to recombinant *Entamoeba histolytica* antigens in patients with amebic liver abscess. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58(4):414-416.
146. Saidin S., Yunus H.M., Zakaria N.D., Razak K.A., Huat B.L., Othman N. & Noordin R. (2014). Production of recombinant *Entamoeba*

- histolytic* apyruvate phosphate dikinase and its application in a lateral flow dipstick test for amoebic liver abscess. BMC Infectious Diseases 14:182.
147. Zining T, Kin WW, Noordin R, Weicum TS, Chong FP, Mohamed Z, Olivos A and Huat BL (2013). Evaluation of *Entamoeba histolytica* recombinant phosphoglucose mutase protein for serodiagnosis of amoebic liver abscess. BMC Infections Diseases 13:144.
148. Carrero CJ, Díaz YM, Viveros M, Espinosa B, Acosta E and Ortiz L. (1994). Human secretory immunoglobulin A Anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cell infection and immunity 764-767.
149. Carrero JC, Contreras-Rojas A, Sanchez-Hernández B, Petrosyan P, Bobes RJ, Ortiz-Ortiz L, Lacleste JP. (2010). Protection against murine intestinal amoebiasis induced by oral immunization with the 29 kDa antigen of *Entamoeba histolytica* and cholera toxin. Experimental Parasitology 125:359-365.
150. Haque R., Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, Lyerly D, Peri WA Jr. (2000). Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. Journal of Clinical Microbiology 38 (9):3235-3239.
151. Sargeant PG, Jackson TFHG, Wiffen SR, Bhojnani R. (1988). Biological evidence of genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 82(6): 862-867.
152. Ohnishi K, Murata M, Okuzawa E. (1994). Symptomatic amebic colitis in a Japanese homosexual AIDS patient. Internal Medicine (Tokyo, Japan) 333(2):120-122.



153. Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. (1996). Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research* 83(1):96-98.
154. Braga LL, Lima AAM, Sears CL, Newman RD, Wuhib T, Pavia CA, Guerrant RL, Mann BJ: (1996). Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a Slum in Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55(6):693-697.
155. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo G, Bruno A, Maserati R, Bisoffi Z, Scaglia M. (2002). Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67(1):123-127.
156. Strachan WD, Chiodini PL, Spice WM, Moody AH, Ackers JP. (1988). Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet (London, England)* 12(8585):561-563.
157. Saklatvala T. (1993). Milestones in Parasitology. *Parasitology Today* 9(10):347-348.
158. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. (1997). Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Journal of Clinical Microbiology* 35(9):2405-7.
159. Troll H, Martí H, Weiss N. (1997). Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35(7):1701-5.

160. Tannich E, Burchard GD. (1991). Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *Journal of Clinical Microbiology* 29(2):250-255.
161. Lotter H, Mannweiler E, Tannuch E. (1993). Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive amebiasis. *Tropical Medicine and Parasitology* 44(4):277-280.
162. Roche J, Benlto A. (1999). Prevalence of intestinal parasite infections with special reference to *Entamoeba histolytica* on the island of Bioko. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 60(2):257-262.
163. Krupp IM. (1974). Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 23(1):27-30.
164. Tanyuksel M. & Petri W.A. Jr. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 16(4):713-29.
165. Pinilla A.E., López M.C. & Viasus D.F. (2006). Inmunoglobulina G en pacientes con absceso hepático amebiano. *Revista de la Facultad de Medicina* 54(2):117-123. Veáse en: [www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v54n2/v54n2a07.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v54n2/v54n2a07.pdf)
166. Gómez J.C., Cortés J.A., Cuervo S.I. & López M.C. (2007). Amebiasis Intestinal. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*. *Infectio* 11(1):36-45.
167. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-75.

168. Loew L.M., Benson L., Lazarovici P. & Rosenberg I. (1985). Fluorometric analysis of transferable membrane pores. *Biochemistry* 24(9):2101-4.
169. Pick U. (1981) Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 212(1):186-194.
170. Rosenberg I., Bach D., Loew L.M. & Gitler C. (1989). Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (ameobapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33(3):237-247.
171. Leippe M., Andra J., Nickel R., Tannich E. & Müller-Eberhard H.J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular Microbiology* 14(5):895-904.
172. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteria-phage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
173. Spector D.L., Goldman R.D. & Leinwand L.A. (1988), *Cells. Vol.1: Culture and Biochemical Analysis of Cells*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 57.5-57.9.
174. Edman P. & Begg A. (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1(1):80-91.
175. Montfort I., Pérez Tamayo R., Pérez Montford R., González Canto A. and Olivos A. (1994). Purification and characterization of a 30 kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res*, 80:607-613.
176. López Vancell R. (2008). *E. histolytica*: Estudio *in vitro* de los

mecanismos moleculares de su virulencia. Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina – UNAM.

177. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350-4354.
178. Wilkins-Rodríguez A.A., Escalona-Montaña A.R., Aguirre-García M., Becker I. and Gutiérrez-Kobeh L. (2010). Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmaniamexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental Parasitology*, 126:426-434.
179. World Health Organization. (1976). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the World Health Organization* 54(2):129-239.
180. González A., Monterrubio D., Nequiz M., López R., Olivos A., García de León C., et al. (2008). Localization of *Entamoeba histolytica* amebopore in amebic liver abscesses in hamsters. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149:375-379.
181. Eckmann L., Reed S.L., Smith J.R. & Kagnoff M.F. (1995). *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cell through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *The Journal of Clinical Investigation* 96(3):1269-79.
182. Chadee K. & Meerovitch E. (1984). The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *The American Journal of Pathology* 117(1):71-80.
183. Velázquez J.R., Llaguno P., Fernández-Diez J., Pérez-Rodríguez M, Arellano J., López-Osuna M. & Kretschmer R.R. (1995). Antigen induced

- eosinophilia protects gerbil (*Meriones unguiculatus*) against experimental amoebic abscess of the liver. Archives of Medical Research 26:S93-S98.
184. Cieslak P.R., Virgin H.W. IV & Stanley S.L. Jr. (1992). A severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. The Journal of Experimental Medicine 176(6):1605-9.
185. Pérez-Tamayo R., Martínez R.D., Montfort I., Becker I., Tello E. & Pérez-Montfort R. (1991). Pathogenesis of acute experimental amebic liver abscess in hamsters. The Journal Parasitology 77:982-988.
186. Tsutsumi, V. y M. Shibayama. (2006). Experimental Amebiasis: a Selected Review of some *in Vivo* Models. Archives of Medical Research. 37,210-220.
187. Leippe M. & Müller-Eberhard H.J. (1994). The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. Toxicology 87(1-3):5-18.
188. Joyce M.P. & Ravdin J.I. (1988). Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 38(1):74-80.
189. Tan Z.N., Wong W.K., Noordin R., Zeehaida M., Olivos G.A., Lim B.H. (2013). Efficacies of two in-house indirect ELISAs for diagnosis of amoebic liver abscess. Tropical Biomedicine, 30:250-256.
190. Flores M.S., Carrillo P., Tamez E., Rangel R., Rodriguez E.G., Maldonado M.G., et al. (2016). Diagnostic parameters of serological ELISA for invasive amoebiasis, using antigens preserved without enzymatic inhibitors. Experimental Parasitology 161:48-53.

191. Ximénez C., Leyva O., Morán P., Ramos F., Melendro E.I., Ramiro M., et al. (1993). *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 87(1):31-9.
192. Ximénez C., Leyva O., Morán P., Ramos F., Melendro E.I., Ramiro M., et al. (2007). Amebic and pyogenic liver abscess: importance of differential diagnosis in endemic areas of amebiasis. 5<sup>th</sup> European Congreso on Tropical Medicine and International Health, Amsterdam (The Netherlands) May 24-28.
193. Nicholls R.S., Restrepo M.I., Duque S., Lopez M.C., Corredor A. (1994). Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89:53-58.

**13. Anexos**

## Research Article

# Detection of Specific Antibodies for Amoebapore in Serum of Patients with Amoebic Liver Abscess

González-Canto A<sup>1,2\*</sup>, Escalona-Montaña AR<sup>2</sup>, Ruiz-Remigio A<sup>2</sup>, Ximénez-García C<sup>2</sup>, Del Callejo-Canal D<sup>3</sup>, Gutiérrez-Ruiz C<sup>4</sup>, López-Vancell R<sup>2</sup> and Pérez Tamayo R<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posgrado de Biología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,

<sup>3</sup>Instituto de Investigación de Estudios Superiores Económicos y Sociales de la, Universidad Veracruzana, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

## \*Corresponding author

González-Canto A, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, C.P. 06726, Ciudad de México, México, Tel: 52-56-23-2652; Fax: 52-57610249.

Email: metaugus@yahoo.com

Submitted: 03 October 2016

Accepted: 30 January 2017

Published: 01 February 2017

ISSN: 2373-9282

## Copyright

© 2017 González-Canto et al.

## OPEN ACCESS

## Keywords

- Amoebapore
- *Entamoeba histolytica*
- Amoebic liver abscess (ALA)
- Clinical diagnosis

## Abstract

The presence of anti-amoebapore antibodies was detected through an enzymatic immunoassay linked to an enzyme (ELISA) and immune electro transference (Western Blot) in patients with a clinical diagnosis of amoebic liver abscess (ALA).

Twenty-five samples of serum of patients from General Hospital of Mexico with a previous clinical diagnosis of ALA were assessed. In addition to this, the samples obtained from other 22 subjects were evaluated to form the 4 control groups that are described as follows: 9 patients with pyogenic liver abscess (PLA), 3 with leishmaniasis, 3 with trypanosomiasis, and, 7 healthy ones. Out of the patients previously diagnosed with ALA, 60% tested positive in the actual ELISA analysis; the same outcome was obtained in the Western Blot (WB) assay. The statistical analysis with the Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) showed values of 100% of sensitivity and 100% of specificity in the ELISA technique using pure amoebapore. Therefore, the ELISA with the amoebapore protein seems to be a good choice for the serum diagnosis of ALA.

## INTRODUCTION

Amoebiasis is a disease caused by the *Entamoeba histolytica*, which is a protozoan parasite with worldwide distribution. It is believed that this parasite infects around 50 million people every year, and that 110,000 of them die from complications. One percent of the infected people may develop pathologies such as acute amoebic colitis or amoebic liver abscess (ALA) [1-5]; having this latter a 10-times higher frequency in men than in women [6,7]. ALA shows up when the parasite invades the liver from the intestine, probably through via porta; most of the cases exist with only one abscess generally located in the right hepatic lobe, which receives most part of the portal circulation [8,9]. The origins of the liver abscess in a patient may be amoebic or not [10], thus to make a specific diagnosis requires lab tests such as the ultrasound and microbiological and immunological analyses to corroborate the etiology [11-14].

Amoebiasis diagnosis based on the parasite's morphology through a microscopic analysis is highly useful; however, it

requires a series of fresh samples and the results tend to vary a lot, thus several analyses are needed in order to give a morphological diagnosis [15].

The *E. histolytica* parasite produces an immune response in humans: cellular as well as humorally; antibodies are produced in patients with symptomatic amoebiasis but also in asymptomatic patients, probably as a result of the invasion of such pathogen [16,17].

The presence of antibodies against *E. histolytica* in patients with extraintestinal amebiasis [13,18-20] has been identified by different techniques such as complement fixation (CF), counter immunoelectrophoresis, indirect immunofluorescence, ELISA and Western Blot (WB).

It has been shown the increase of circulating antibodies in patients with ALA, mainly of the IgG type, which may be detectable one week after symptoms start, in humans as well as in experimental animals [21]. These antibodies endure for years after invasive amoebiasis is resolute [22,23] probably due to the

**Cite this article:** González-Canto A1,2\*, Escalona-Montaña AR2, Ruiz-Remigio A2, Ximénez-García C2, Del Callejo-Canal D, et al. (2017) Detection of Specific Antibodies for Amoebapore in Serum of Patients with Amoebic Liver Abscess. *Ann Clin Pathol* 5(1): 1103.



persistence of amoebic antigens in the monocyte macrophage system cells [17].

The increased titles of antibodies are not related to the clinical seriousness or to the prognosis, but they do coincide with early stages of the disease; however, such variables decrease with treatment [24]. Statistical analysis shows a relationship between active amoebiasis and an increase in the serum IgG concentration; ALA patients show higher levels of IgG than those with amoebic colitis or of healthy patients ( $p < 0,001$ ) [25,26].

There are seroepidemiological studies in which 81-100% of ALA patients and a lower percentage of patients with amoebic colitis (50%) develop specific IgG antibodies to *E. histolytica* [26-28]. A low percentage of false negatives may be due to the late production of antibodies and false positive results are more frequently found in endemic areas, due to past infections [16]. Overall, from all immunoglobulins, the increase in IgG has been the most consistent in patients with symptomatic amoebiasis [25]. Several research groups have detected, through ELISA, certain amoebic antigens in feces and pus from liver abscesses as well as antibodies in serum and saliva [29-32].

In some assays, a complete *E. histolytica* lysate was used to identify an immunological reaction [33,34]. In regards to the use of pure molecules for this type of assays, Gal/GalNAc lectin is the most common [34,35], even though there are other molecules derived from the amoeba used for this purpose, such as the serine-rich antigen [36] or the lipophosphoglycan [37]. On the other hand, WB allows the detection of *E. histolytica* specific antigens, which are recognized by sera from symptomatic and asymptomatic patients [38].

ELISA and WB techniques were used in this research work for the detection of specific antibodies for amoebapore in serum from patients with a clinical diagnose of ALA based on the results of ELISA using as antigen a membrane rich extract.

## MATERIAL AND METHODS

### Purified amoebapore

As described by Diamond *et al.*, we got the lysate and amoebic supernatant from the axenic culture of *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS trophozoites [39-41]. The purification of the amoebapore was carried out in a similar way to the method used by Leippe [42], with two adaptations: 1) the fraction was eluted with 0.1M NaCl in the ionic exchange chromatography; and, 2) in the last stage of purification, native electroelution was performed. Fractions were analyzed in silver stained 16% polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE), in each purification phase; amoebapore activity was monitored fluorometrically by the dissipation of a valinomycin-induced diffusion potential in liposomes [42,43].

In order to corroborate de molecule's purity, the porin sample was sequenced by a mass spectrometry (MS) in the Sequencing Unity at the Medicine School of the National Autonomous University of Mexico.

### Anti-amoebapore rabbit IgG antibodies

To prepare rabbit antibodies, pure amoebapore was used as

antigen following the protocol described elsewhere [44]. At the end of the immunization scheme, rabbits were bled and anti-amoebapore IgGs were purified.

The specificity of IgGs anti-amoebapore was corroborated by Western Blot analysis [45] against total lysates of *E. histolytica* HM1: IMSS trophozoites.

### Specificity for anti-amoebapore IgGs assay over *Leishmania*, *Trypanosomes* and *Entamoeba histolytica* extracts

A WB assay was carried out from a complete lysate of *L. mexicana* and *T. cruzi* button cells; each sample was treated with 10 mM EDTA, 100  $\mu$ M Iodoacetamide and 0.2  $\mu$ M E-64. An amoeba lysate, treated in the same way, and a pure sample of amoebapore (3.2  $\mu$ g) were included as a positive control. All samples were adjusted to 10  $\mu$ g of protein and treated with 10 %  $\beta$ -mercaptoethanol. The transference was carried out in nitrocellulose and 1.25  $\mu$ g/mL anti-amoebapore rabbit IgGs were used. And lastly, it was treated with a 1:120,000 dilution of the peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG's). The strips were revealed by chemiluminescence [46].

### Sera

The examined 47 human sera were classified into four groups. Group A included 25 patients' sera with ALA clinical diagnosed; in group B, 7 healthy subjects' sera were obtained; group C constituted of 9 pyogenic liver abscess's (PLA) sera; and, lastly, group D consisted of 6 sera: 3 from patients with leishmaniasis and other three with trypanosomiasis. Sera were obtained from 5 mL of blood from each patient.

### ELISA

The antigen (0.6  $\mu$ g of pure amoebapore) was fixed by microwell (each serum to be analyzed in triplicate) on a 96 plaque. A 100  $\mu$ L dilution of 1:100 was added by microwell of each one of the sera belonging to each one of the four groups previously described. Additional 100  $\mu$ L of dilution 1:12,000 was added by microwell of the secondary peroxidated antibody (rabbit anti-human IgA, IgG and IgM), which were revealed by TMB peroxidase substrate (Tetramethylbenzidine) and peroxidase solution B. The reaction was stopped with 100  $\mu$ L of phosphoric acid 1M. The reading of the samples was carried out at a wavelength of 450 nm and the cut point of each analyzed sample was calculated taking into consideration the standard deviation (SD) and applying the following formula: (3 x SD + the average of negative control). Next, the cut point was deducted from the average value of each sample and when the result was higher to the cut point, it was considered positive. Otherwise, if the result was lesser or equal to the cut point, it was considered negative.

### Western Blot

A denaturing electrophoresis was carried out at 16 % polyacrylamide with 40  $\mu$ g of a pure amoebapore sample available at the only lane formed by a one-single tooth comb. The run was stopped when the advancing front reached the end of the gel. The gel was then transferred to a nitrocellulose membrane

and blocked with 5% nonfat milk in a TBST buffer for one hour at room temperature. After rinsing, the membrane was cut in strips in order to incubate each of the sera. Each strip was incubated during all night with a 1:200 dilution of the corresponding serum; in all, 47 sera were analyzed. A 1: 5,000 dilution of a secondary antibody (peroxidated rabbit anti-human IgA, IgG and IgM antibody) was used. Strips were revealed by chemiluminescence.

**STATISTICAL ANALYSIS**

The statistical analysis was made with a ROC curve (Receiver Operating Characteristics Curves). We wanted to evaluate the quality performance of two diagnostic tests: ELISA using the membrane rich extract of amoebic trophozoites as antigen (Table 1) and ELISA using pure amoebapore (Table 2). For this reason, the sensitivity and specificity values of these two assays were calculated with the WB result (corroborative method) as a true condition status.

**Table 1:** ELISA assay using the membrane rich extract of amoebic trophozoites as antigen.

Sera	Average 490 nm	Cut point	Results	Reading
A81	0.90	0.52	>cp	+
A82	0.83	0.52	>cp	+
A83	0.54	0.52	>cp	+
A84	1.20	0.52	>cp	+
A89	0.73	0.52	>cp	+
A101	1.40	0.52	>cp	+
A119	1.20	0.52	>cp	+
A121	0.65	0.52	>cp	+
A123	1.30	0.52	>cp	+
A126	1.14	0.52	>cp	+
A129	1.10	0.52	>cp	+
A131	0.71	0.52	>cp	+
A133	0.65	0.52	>cp	+
A138	0.63	0.52	>cp	+
A139	0.90	0.52	>cp	+
A140	0.80	0.52	>cp	+
A141	0.59	0.52	>cp	+
A148	1.30	0.52	>cp	+
A149	1.00	0.52	>cp	+
A150	0.73	0.52	>cp	+
A154	0.90	0.52	>cp	+
A155	0.90	0.52	>cp	+
A158	0.90	0.52	>cp	+
A160	0.73	0.52	>cp	+
A162	0.60	0.52	>cp	+
N129	0.40	0.52	<cp	-
N131	0.30	0.52	<cp	-
N132	0.18	0.52	<cp	-
N134	0.45	0.52	<cp	-
N136	0.50	0.52	<cp	-
N137	0.20	0.52	<cp	-
N138	0.10	0.52	<cp	-
N139	0.10	0.52	<cp	-
N152	0.34	0.52	<cp	-

Sera of ALA clinical diagnosis (A). Clinical suggestion of PLA sera (N); >cp higher than the cut point →positive; <cp lower than the cut point →negative.

**Table 2:** Anti-amoebapore antibody identification in 47 sera analyzed.

Groups	Sera	Average 450 nm	Cut point	Results	Reading
A ALA (CS)	A81	0.213	0.264	0	-
	A82	0.990	0.329	0.669	+
	A83	0.164	0.251	0	-
	A85	1.164	0.386	0.777	+
	A89	0.273	0.395	0	-
	A101	0.674	0.268	0.405	+
	A119	1.634	0.366	1.267	+
	A121	1.944	0.348	1.595	+
	A123	1.173	0.306	0.866	+
	A126	0.618	0.405	0.212	-
	A129	1.585	0.271	1.313	+
	A131	1.439	0.256	1.182	+
	A133	2.450	0.280	2.169	+
	A138	0.434	0.253	0.180	-
	A139	1.421	0.272	1.148	+
	A140	1.124	0.364	0.759	+
	A141	0.961	0.265	0.695	+
	A148	0.681	0.279	0.401	+
A149	1.322	0.304	1.017	+	
A150	1.145	0.240	0.904	+	
A154	0.280	0.263	0.016	-	
A155	0.249	0.172	0.076	-	
A158	0.524	0.320	0.204	-	
A160	0.238	0.286	0	-	
A162	0.254	0.322	0	-	
B (H)	H1	0.163	0.190	0	-
	H2	0.376	0.199	0.176	-
	H3	0.192	0.230	0	-
	H4	0.227	0.198	0.028	-
	H5	0.219	0.212	0.006	-
	H6	0.352	0.181	0.17	-
	H7	0.264	0.184	0.079	-
C (PLA)	N129	0.509	0.666	0.057	-
	N131	0.338	0.194	0.143	-
	N132	0.188	0.426	0	-
	N134	0.649	0.742	0	-
	N136	1.295	0.355	0.939	+
	N137	0.264	0.179	0.084	-
	N138	0.747	0.407	0.339	-
	N139	0.558	0.339	0.218	-
N152	0.373	0.426	0	-	
D (T)	T1	0.098	0.273	0	-
	T2	0.299	0.336	0	-
	T3	0.269	0.261	0.007	-
(L)	L1	0.130	0.270	0	-
	L2	0.141	0.188	0.3	-
	L3	0.298	0.263	0.37	-

ELISA assay using amoebapore antigen (0.6 µg) with different sera groups: Group A, patients with clinical suggestion of Amoebic Liver Abscess (ALA); Group B, healthy subjects' sera (S); Group C, Patients with Pyogenic Liver Abscess (PLA); Group D, patients with *Leishmaniasis* (L) and *Trypanosomiasis* (T). Results: negative (-) and positive (+).

**RESULTS**

**Amoebapore purification**

Amoebapore was purified from of *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS trophozoites, as already described [47]. The pure sample was analyzed electrophoretically in gels at 16% of polyacrylamide and silver stained (Figure 1). A band with a

molecular weight of 10 kDa was obtained. Sequencing of 8 amino acid residues by mass spectrophotometry, the result: KLIQIEKV, matched the Blastp in 100 % with the "peptide precursor of amoebapore A" of *Entamoeba histolytica* strain HM1: IMSS, with the number of access: XP\_653265.1. In regards to its activity verification, the depolarizing assay of liposomal membranes showed porin activity (Figure 2).

### Specificity of the antiamoebapore antibodies for total lysates from *E. histolytica*, *Leishmania* and *Trypanosome*

Figure (3) shows as expected, our antibodies recognized pure amoebapore (lane 4), and also in the *E. histolytica* lysate (lane 1), but there was no cross reactivity with *Leishmania* (lane 2), nor *Trypanosome* lysate (lane 3)

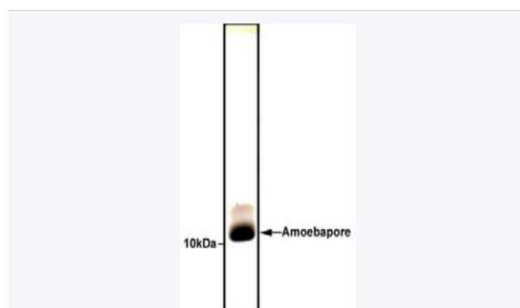
### Quantitative assays of human sera

Consider the 34 patients group (originally classified with liver abscess) to compare the two ELISA assays with the WB result (as a corroborative method). The results obtained in ELISA with the membrane rich extract indicated that 25 sera were positive for ALA and 9 were negative, but positive for PLA (Table 4). The ELISA performed to the same sera, but using pure amoebapore detected 16 positive for ALA and 18 negative (Table 5). The first assay (ELISA using membrane rich extract) shows 10 cases (55.55%) as false positives, and 1 case (6.25%) as false negative, while the second assay (ELISA performed with pure amoebapore) shows no false negatives nor false positives.

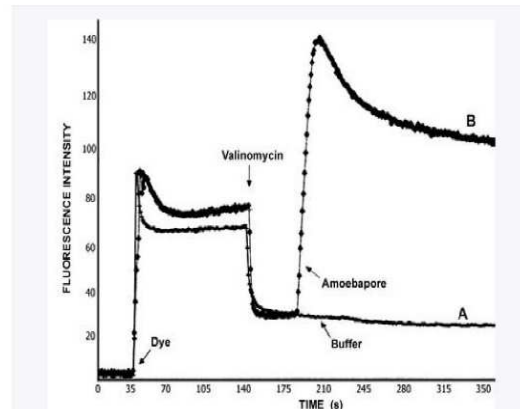
The sensitivity and the specificity of two assays are shown in the Figure (1), one can see the ELISA using pure amoebapore detecting anti-amoebapore antibodies in the sera is better as the same assay using the membrane rich extract constituted by multiple peptides.

### Qualitative assays using human sera

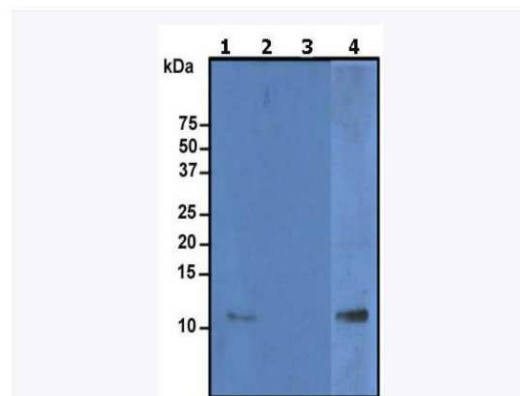
The results obtained in the WB assays, with the porin of the amoeba and the different sera groups (A-D) of the participants, were identical to those obtained through the ELISA assays. Figure (5) shows some representative strips of WB of each of the analyzed groups.



**Figure 1** Purity of the amoebapore of *E. histolytica*, strain HM1:IMSS. Electrophoretic profile gel at 16 % of purified Amoebapore was stained with silver a *histolytica*.



**Figure 2** Temporary course of the liposome depolarization by Amoebapore. A. A) Measured fluorescence at adding a TRIS suspension (20 mM, pH 7.8) to liposomes. B) In this case, Amoebapore molecule was added to the cuvette with liposomes. A radical change is observed in the fluorescence measure caused by the diffusion of the cyanine dye from the liposomes into the medium, which implies that the molecule shows activity.



**Figure 3** Immunoelectrotransference profile of total lysate of parasite samples. Anti-amoebapore antibody specificity in extracts from different protozoan parasites by WB. 1) *E. histolytica*, 2) *L. mexicana*, 3) *T. cruzi*, 4) Amoebapore.

## DISCUSSION

Liver abscess is by far the most common manifestation of extraintestinal amoebiasis. As afore mentioned, the increase of circulant antibodies in ALA patients may be detected soon after symptoms appear. As it is a complication that puts patients' life in danger, its fast and precise diagnosis is crucial, thus serodiagnosis in patients with probable ALA may be of great help in the clinical decision and the spare of costs at avoiding other treatments and the unnecessary prolonged hospitalization. Although the search for antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from patients with amoebic liver abscess was first referred by Joyce et al in 1988 [48] there are recent works [49,50] setting different conditions for serological assays in the diagnosis of ALA patients. The aforementioned reflects that there is still a need of a reliable diagnosis method for ALA. ELISA, using an undefined

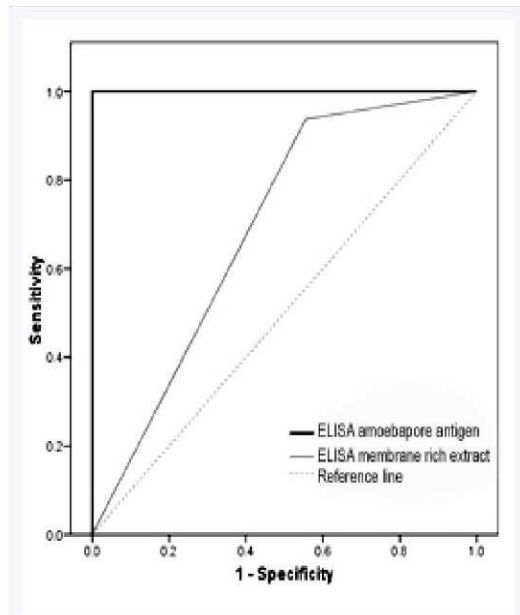


Figure 4 ROC curve for the two ELISA methods. Using the SPSS 23.0.

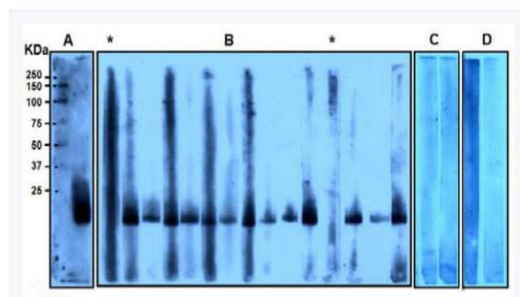


Figure 5 WB showing identification of amoebapore by specific antibodies present in CS-ALA patients' sera A) anti-amoebapore IgG's (rabbit); B) CS-ALA patients' sera that came out positive; C) healthy subjects' sera; D) patients' sera with Leishmaniasis and an asterisk. (\*) CS-ALA patients' sera that came out negative.

mixture of *Entamoeba histolytica* as antigen is one of the most popular serological methods used by Diagnostic Labs, as it is highly sensitive and specific aside from being quantitative

At the General Hospital of Mexico, patients are diagnosed at first, in the Medical Service, based on clinical symptoms and further tests such as ultrasound imaging thereafter, at the Experimental Medicine Service (EMS) in the same Hospital, an indirect ELISA is performed on the patients serum samples to achieve a differential diagnosis with pyogenic liver abscess (PLA). The indirect ELISA is performed with a membrane rich extract [51] as antigen, from trophozoites of *E. histolytica* HM1: IMSS axenically cultured. The HM1: IMSS strain is considered as a reference virulent strain, and is commonly used in amebiasis research.

A group of 34 serum samples from patients of the General Hospital, was diagnosed (by ultrasound imaging) as having

liver abscess; from them, 25 were further confirmed at the EMS with ALA by their positive result with the indirect ELISA using membrane rich extract as antigen, and the remaining 9 with PLA [52]. We have previously reported amebopore purification in its native conformation and with pore forming activity from *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoites [47]; in this study, we have performed to the same 34 serum samples from patients mentioned above, an indirect ELISA and Western Blot using as antigen the purified amebopore. The results obtained by the indirect ELISA and the Western Blot using purified amebopore were identical: those sera positive or negative by ELISA gave the same result by WB. We evaluated the sensitivity and specificity of the indirect ELISA using the membrane rich extract as antigen or the purified amebopore. To do this, we considered the WB result as a true condition status.

The sensitivity and specificity of the indirect ELISA using amebopore was 100%, and indicated that 10 serum samples that were considered positive with the indirect ELISA using the membrane rich extract were "false positives", so those patients would have been treated unnecessarily. On the other hand, one of the serum samples originally detected as PLA, turned out as positive for ALA (false negative), although we don't have a reasonable explanation for this result.

There are in the literature serologic studies for diagnosis of ALA in which recombinant proteins are used; for example: it has been reported [53] the recombinant pyruvate phosphate dikinase (rPPDK) from *E. histolytica* as a potential diagnostic marker for ALA, however, although the specificity of WB using the rPPDK was 100% when compared to the recombinant Gal/GalNAc lectin, the sensitivity of the assay was 93%, and the specificity of 100% is only achieved when they use as the secondary antibody, one to the IgG4 subtype. Although the predominant IgG subtypes in amebiasis have been reported to be: IgG1 and IgG4, the sera from patients with ALA show ELISA values for all antibody subtypes higher than those of healthy controls [54] so a specificity of 100% should be obtained with a mixture of all the antibodies present in the patients sera. A clear advantage of using a purified antigen in

Table 3: Decision matrix: ELISA, Using membrane rich extract of trophozoites from *E. histolytica*.

		True condition status (WB)		
		Positive	Negative	Total
Test Result	Positive	15	10	25
	Negative	1	8	9
	Total	16	18	34
	Sensitivity	93.75%		
Specificity	44.44%			

Table 4: Decision matrix: ELISA assay using pure amoebapore detected anti-amoebapore antibodies.

		True condition status (WB)		
		Positive	Negative	Total
Test Result	Positive	16	0	16
	Negative	0	18	18
	Total	16	18	34
	Sensitivity	100%		
	Specificity	100%		

its native conformation over a recombinant one in a serological assay is that you assure that the antibodies you are going to detect are exactly those that were generated in the humoral response. On the other hand, the native structure of the amebopore is also corroborated by its confirmed ability to form pores.

The results here by obtained allow us to propose amebopore purified from *E. histolytica* as a potential diagnostic marker for ALA.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by PAPIIT-DGAPA IN-219210

To biologist Mario Nequiz for providing the ameba, to doctor Patricia Morán for providing ALA and PLA patients' sera, to doctor Jorge Ramirez, Chemistry intern, Adriana Rodríguez for the lab support, to engineer Angélica Serrano, for the images' scanning and edition.

This research work includes part of doctoral dissertation at the Universidad Autónoma Metropolitana, *campus* Iztapalapa of Augusto González.

## REFERENCES

1. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* 1986; 8: 228-238.
2. The World Health Report 1995--bridging the gaps. *World Health Forum.* 1995; 16: 377-385.
3. Huston CD, Haque R, Petri WA Jr. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert Rev Mol Med.* 1999; 1999: 1-11.
4. Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3748-3756.
5. Parija SC. Progress in the research on diagnosis and vaccines in amebiasis. *Trop Parasitol.* 2011; 1: 4-8.
6. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1565-1573.
7. Salles JM, Moraes LA, Salles MC. Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7: 96-110.
8. Thompson JE Jr, Forlenza S, Verma R. Amebic liver abscess: a therapeutic approach. *Rev Infect Dis.* 1985; 7: 171-179.
9. Nicholls RS, Restrepo MI, Duque S, Lopez MC, Corredor A. Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89: 53-58.
10. Sathar MA, Simjee AE, Nel JD, Bredenkamp BL, Gathiram V, Jackson TF. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *S Afr Med J.* 1988; 74: 625-628.
11. Kraoul L, Adjimi H, Lavarde V, Pays JF, Tourte-Schaefer C, Hennequin C. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1530-1532.
12. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5491-5497.
13. Haque R, Petri WA Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res.* 2006; 37: 273-276.
14. Buss S, Kabir M, Petri WA Jr, Haque R. Comparison of two immunoassays for detection of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2778-2779.
15. Chacón-Bonilla L. [Microscopic diagnosis of amebiasis: an obsolete method but necessary in the developing world]. *Invest Clin.* 2011; 52: 291-294.
16. Trissi D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev Infect Dis.* 1982; 4: 1154-1184.
17. Ximénez C, Leyva O, Morán P, Ramos F, Melendro EI, Ramiro M, et al. *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann Trop Med Parasitol.* 1993; 87: 31-39.
18. van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Peek R, Wetsteyn JC, et al. Use of rapid dipstick and latex agglutination tests and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amoebic liver abscess, amoebic colitis, and *Entamoeba histolytica* Cyst Passage. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4801-4806.
19. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA Jr, Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2168-2172.
20. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 511-532.
21. Kretschmer R. Immunology of Amebiasis. In Martinez Palomo A (ed) *Amebiasis*, 1st edn. Elsevier, Netherlands, 1986, 95-168.
22. Ravdin JI. State-of-the-art. Clinical Article. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 1453-1466.
23. Hughes MA, Petri WA Jr. Amoebic liver abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2000; 14: 565-582.
24. Vinayak VK, Purnima, Singh K, Venkatswarlu K, Nain CK, Mehta SK. Specific circulating immune complexes in amoebic liver abscess. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 1088-1090.
25. Abioye AA, Lewis EA, McFarlane H. Clinical evaluation of serum immunoglobulins in amoebiasis. *Immunology.* 1972; 23: 937-946.
26. Salata RA, Ravdin JI. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica*. *Rev Infect Dis.* 1986; 8: 261-272.
27. Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amoebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32: 727-732.
28. Valenzuela O, Ramos F, Moran P, Gonzalez E, Valadez A, Gomez A, et al. Persistence of secretory anti-amoebic antibodies in patients with past invasive intestinal or hepatic amoebiasis. *Parasitol Res.* 2001; 87: 849-852.
29. Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2558-2561.
30. Leo M, Haque R, Kabir M, Roy S, Lahlou RM, Mondal D, et al. Evaluation of *Entamoeba histolytica* antigen and antibody point-of-care tests for the rapid diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4569-4571.
31. Visser LG, Verweij JJ, Van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296: 397-403.
32. Khairnar K, Parija SC. Detection of *Entamoeba histolytica* DNA in the saliva of amoebic liver abscess patients who received prior treatment

- with metronidazole. *J Health Popul Nutr.* 2008; 26: 418-425.
33. Ximenez C, Sosa O, Leyva O, Moran P, Melendro EI, Ramiro M. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992; 86: 121-127.
34. Petri WA Jr, Singh U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 1117-1125.
35. Pillai DR, Keystone JS, Sheppard DC, MacLean JD, MacPherson DW, Kain KC. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 1315-1318.
36. Stanley SL Jr, Jackson TF, Foster L, Singh S. Longitudinal study of the antibody response to recombinant *Entamoeba histolytica* antigens in patients with amoebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 414-416.
37. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2405-2407.
38. Arguello R, Sanchez MC, Garduno G, Valadez A, Martinez MC, Munoz O, et al. Evaluation of an immunoblot methodology for the detection of relevant *Entamoeba histolytica* antigens by antibodies induced in human amebiasis. *Arch Invest Med (Mex).* 1990; 21: 3-9.
39. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J Parasitol.* 1968; 54: 1047-1056.
40. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978; 72: 431-432.
41. López-Vancell R, Arreguín Espinosa R, González-Canto A, Néquiz Avendaño M, García de León MC, Olivos-García A, et al. *Entamoeba histolytica*: expression and localization of Gal/GalNAc lectin in virulent and non-virulent variants from HM1: IMSS strain. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 244-250.
42. Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Müller-Eberhard HJ. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 7659-7663.
43. Loew LM, Rosenberg I, Bridge M, Gitler C. Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry.* 1983; 22: 837-844.
44. Montfort I, Perez R, Perez R, Gonzalez A, Olivos A. Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 1994; 80: 607-613.
45. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 4350-4354.
46. Wilkins-Rodríguez AA1, Escalona-Montaño AR, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol.* 2010; 126: 426-434.
47. González A, Monterrubio D, Nequiz M, López R, Olivos A, García de León C, et al. Localization of *Entamoeba histolytica* amebopore in amoebic liver abscesses in hamsters. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1149: 375-379.
48. Joyce MP1, Ravdin JI. Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38: 74-80.
49. Tan ZN, Wong WK, Noordin R, Zechaida M, Olivos GA, Lim BH. Efficacies of two in-house indirect ELISAs for diagnosis of amoebic liver abscess. *Trop Biomed.* 2013; 30: 250-256.
50. Flores MS, Carrillo P, Tamez E, Rangel R, Rodriguez EG, Maldonado MG, et al. Diagnostic parameters of serological ELISA for invasive amoebiasis, using antigens preserved without enzymatic inhibitors. *Exp Parasitol.* 2016; 161: 48-53.
51. Ximénez C1, Leyva O, Morán P, Ramos F, Melendro EI, Ramiro M, et al. *Entamoeba histolytica*: antibody response to recent and past invasive events. *Ann Trop Med Parasitol.* 1993; 87: 31-39.
52. Ximénez C, Leyva O, Morán P, Ramos F, Melendro E. Amoebic and Pyogenic Liver Abscess: Importance of Differential Diagnosis in Endemic Areas of Amebiasis. 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health. 2007, Amsterdam (The Netherlands) May 24-28.
53. Saidin S, Yunus MH, Zakaria ND, Razak KA, Huat LB, Othman N, et al. Production of recombinant *Entamoeba histolytica* pyruvate phosphate dikinase and its application in a lateral flow dipstick test for amoebic liver abscess. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 182.
54. Nicholls RS, Restrepo MI, Duque S, Lopez MC, Corredor A. Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of amoebic liver abscess. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89: 53-58.

Cite this article

González-Canto A1,2\*, Escalona-Montaño AR2, Ruiz-Remigio A2, Ximénez-García C2, Del Callejo-Canal D, et al. (2017) Detection of Specific Antibodies for Amoebopore in Serum of Patients with Amoebic Liver Abscess. *Ann Clin Pathol* 5(1): 1103.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00094  
Matrícula: 209381730

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS  
ESPECÍFICOS PARA AMIBOPORO  
EN SUERO DE PACIENTES CON  
ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 31 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ  
DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH  
DR. LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS  
DRA. MARIA DEL ROSARIO LOPEZ VANCELL



*Augusto Jose Gonzalez Canto*  
AUGUSTO JOSE GONZALEZ CANTO  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: AUGUSTO JOSE GONZALEZ CANTO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

REVISÓ

*Julio Cesar de Laransassi*  
LIC. JULIO CESAR DE LARANSASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*Edith Ponce Alquicira*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

*Leticia Bucio Ortiz*  
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

VOCAL

*Laila Gutierrez Kobe*  
DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH

VOCAL

*Luis Fernando Olguin Contreras*  
DR. LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS

SECRETARIA

*Maria del Rosario Lopez Vancell*  
DRA. MARIA DEL ROSARIO LOPEZ VANCELL