

---

---

*Universidad de Guadalajara*

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



IDENTIFICACION DE UN ANTIGENO DE *Entamoeba histolytica*  
QUE PARTICIPA EN LA FAGOCITOSIS

---

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A  
ARTURO CHAVOYA PEÑA

GUADALAJARA, JALISCO NOVIEMBRE 1988

---

---

IDENTIFICACION DE UN ANTIGENO  
DE Entamoeba histolytica QUE  
PARTICIPA EN LA FAGOCITOSIS

AUTOR: ARTURO CHAVOYA PEÑA

DIRECTOR DE LA TESIS: M. en C. JUAN MORA GALINDO

14157/022005  
563  
E.7

Esta tesis se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la asesoría de la Dra. Esther Orozco Orozco.

## INDICE

I) INTRODUCCION	1
1.1) Generalidades	1
1.2) Ciclo de vida de <u>Entamoeba histolytica</u>	2
1.3) Trofozoito	3
1.4) Quiste	6
1.5) Fagocitosis en <u>E. histolytica</u>	7
1.6) Fagocitosis como factor de virulencia de <u>E. histolytica</u>	9
1.7) Otros factores de virulencia de <u>E. histolytica</u>	11
1.7.1) Adhesión	11
1.7.2) Carga eléctrica de superficie	12
1.7.3) Actividad proteolítica	13
1.7.4) Actividad formadora de poros membranales	15
1.7.5) Efecto citopático sobre células en cultivo	17
1.8) Mutantes de <u>E. histolytica</u>	18
1.9) Anticuerpos monoclonales contra la superficie de <u>E. histolytica</u>	20
II) OBJETIVOS	26
III) MATERIALES Y METODOS	28
3.1) Cultivo de trofozoitos de <u>Entamoeba histolytica</u>	28
3.2) Cultivo de hibridomas	28
3.3) Inoculación en ratón de los hibridomas cultivados <u>in vitro</u> para la obtención de líquido ascítico	29
3.4) Técnica de ELISA	30
3.5) Inmunofluorescencia indirecta	31
3.6) Extracción de proteína total de amiba	33
3.7) Cuantificación de proteínas	33
3.8) Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	34
3.9) Tinción del gel de poliacrilamida	36
3.9.1) Tinción con azul de Coomassie	36
3.9.2) Tinción con plata	36
3.10) Inmunoelectrotransferencia	37
3.11) Precipitación con sulfato de amonio de anticuerpos anti-ratón de cabra	40
3.12) Purificación de anticuerpo anti-ratón de cabra por cromatografía de afinidad	41
3.13) Acoplamiento de anticuerpos anti-ratón de cabra a Sepharose 4B	42

3.14)	Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal	43
3.15)	Semipurificación del anticuerpo monoclonal por medio de cromatografía líquida rápida de proteínas	44
3.16)	Adsorción y entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal a la columna de Sepharose 4B con anticuerpo anti-ratón acoplado	45
3.17)	Obtención de extracto total de amiba para cromatografía de afinidad	46
3.18)	Cromatografía de afinidad	47
3.19)	Inhibición de eritrofagocitosis	49
IV) RESULTADOS		51
4.1)	Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos de <u>E. histolytica</u>	51
4.2)	Patrón electroforético de proteínas de las clonas de <u>E. histolytica</u>	52
4.3)	Inmunoelctrotransferencia de proteína total de las clonas de <u>E. histolytica</u>	53
4.4)	Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis	56
4.5)	Semipurificación del anticuerpo monoclonal del líquido ascítico	56
4.6)	Adsorción y entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal semipurificado con el anticuerpo anti-ratón acoplado a Sepharose 4B	59
4.7)	Cromatografía de afinidad usando el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis	59
4.8)	Ensayos de inhibición de eritrofagocitosis empleando la fracción eluida de la columna de afinidad	64
V) DISCUSION		65
VI) CONCLUSIONES		75
VII) REFERENCIAS		77
VIII) TABLAS Y FIGURAS		
IX) CARTA DE ACEPTACION DEL TEMA DE TESIS		
X) CARTA DE VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE LA TESIS		

## INTRODUCCION

### 1.1) Generalidades

El protozoario Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis humana, la cual es una de las enfermedades infecciosas más importantes en México y en general en los países en vías de desarrollo (Martínez-Palomo y Martínez-Báez, 1983).

Este protozoario, cuya existencia se conoce desde 1875 (Lesh, 1875), pertenece al phylum sarcomastigophora, subphylum sarcodina, superclase rhizopoda, clase lobosea, orden amoebida y familia endamoebidae (Levine y col, 1980), y es la única especie del género Entamoeba que parasita al ser humano (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

Se ha calculado que el 10% de la población mundial es portadora de este parásito (WHO, 1969; Walsh, 1986), pero la distribución no es uniforme, ya que hay mayor prevalencia en países de temperatura cálida. Sin embargo, esto se ha atribuido más a las condiciones socioeconómicas de la población que al clima (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

E. histolytica se encuentra generalmente como un comensal inocuo en el intestino grueso del hombre, pero en algunas personas infectadas puede atravesar la mucosa intestinal y producir así amibiasis invasiva (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984). Se ha estimado que en México existe una persona con amibiasis invasiva por cada cuatro o cinco

portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1982). La amibiasis invasiva puede localizarse en el intestino, o bien, extenderse a otros órganos a través del torrente sanguíneo. La amibiasis invasiva intestinal se caracteriza clínicamente por presentarse disenteria aguda o diarrea intermitente, con heces teñidas de sangre en ambos casos. Además, pueden identificarse en las heces fecales a las formas móviles de la amiba con eritrocitos en su interior.

El órgano blanco más frecuente de la amibiasis invasiva extraintestinal es el hígado, aunque ocasionalmente pueden resultar afectados también los pulmones y el cerebro. El absceso hepático amibiano es tres veces más frecuente en varones que en mujeres, y su incidencia es diez veces mayor en adultos que en niños. Sin embargo, se ignoran las causas de este comportamiento (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984). En un estudio efectuado en los principales hospitales generales de México se encontró que el 2% de los pacientes adultos fueron admitidos por presentar absceso hepático amibiano (Alvarez-Alva y De la Loza-Saldívar, 1971), destacándose así la importancia que tiene la amibiasis invasiva en nuestro país.

#### 1.2) Ciclo de vida de Entamoeba histolytica

La forma infectiva de la amiba son los quistes (Krishna Murti, 1971), los cuales, después de ser ingeridos por el

hombre, llegan hasta la parte terminal del intestino delgado, en donde sufren el proceso de desenquistamiento. Cada quiste, después de una serie compleja de divisiones nucleares y citoplásmicas, llega a producir ocho trofozoítos, los cuales constituyen la forma invasiva de la amiba y son los responsables de la sintomatología asociada a la amibiasis.

Bajo ciertas condiciones, no del todo establecidas, los trofozoítos pierden movilidad y empiezan a secretar una pared protectora, transformándose entonces en quistes. Estos abandonan al huésped en grandes cantidades por medio de las heces fecales y se diseminan en el medio ambiente.

El proceso de enquistamiento se ha estudiado con mayor detalle en Entamoeba invadens, ya que en esta especie se ha logrado inducir in vitro este fenómeno (Rengspien y Bailey, 1975). Entre los factores que favorecen el enquistamiento in vitro de E. invadens se hallan el alto crecimiento de los trofozoítos, la falta de nutrientes y la baja osmolaridad del medio de cultivo (McConnachie, 1969).

### 1.3) Trofozoíto

Los trofozoítos son formas celulares altamente dinámicas y pleomórficas con un diámetro que va de 7 a 40  $\mu\text{m}$  (Martínez-Palomo, 1982). La locomoción y la ingestión de partículas se llevan a cabo por medio de la emisión de

pseudópodos gruesos del tipo de los lobópodos (González-Robles y Martínez-Palomo, 1983), aunque también se presentan filópodos delgados en toda la superficie del trofozoito, pero principalmente en la especialización celular conocida como uroide (Lushbaugh y Pittman, 1979). Este último tiene forma de abanico y se localiza en el extremo opuesto al del sentido del movimiento de la amiba.

El trofozoito tiene una membrana plasmática de 10 nm de grosor con la apariencia trilaminar típica. Externamente a la membrana se encuentra en toda la superficie una cubierta flexible con un espesor de 6 a 10 nm (Martínez-Palomo, 1982).

En el citoplasma pueden distinguirse dos regiones distintas: el ectoplasma y el endoplasma. El primero presenta un aspecto hialino y se localiza periféricamente, en tanto que el segundo está inmediatamente debajo del ectoplasma y contiene muchas vesículas y partículas citoplásmicas, entre ellas los gránulos de glucógeno (Martínez-Palomo, 1982). El citoplasma de los trofozoitos de E. histolytica difiere del de eucariotes "típicos" en que están ausentes algunos organelos celulares, tales como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtúbulos (Martínez-Palomo, 1982).

Las vacuolas están presentes en gran número en el citoplasma de los trofozoitos y su diámetro es muy variable, pudiendo medir de 0.5 a más de 9  $\mu\text{m}$  (Martínez-Palomo, 1982). En las vacuolas de trofozoitos obtenidos directamente de

pacientes con amibiasis invasiva pueden identificarse eritrocitos y restos de células epiteliales e inflamatorias (Martínez-Palomo, 1982). La fosfatasa ácida, utilizada en otros sistemas celulares como marcador de lisosomas, se localiza adherida a la membrana de las vacuolas digestivas más que estar libre dentro de ellas (Kairalla y col, 1976; Aley y col, 1980).

Los ribosomas se encuentran generalmente agrupados en forma de arreglos helicoidales, los cuales, al formar complejos, constituyen los llamados cuerpos cromatoides, los que son visibles con el microscopio óptico. Se han encontrado arreglos helicoidales asociados a vacuolas digestivas y a cisternas membranosas, lo que podría constituir un sistema sustituto del retículo endoplásmico rugoso (Rosenbaum y Wittner, 1970).

El citoesqueleto del trofozoito está constituido principalmente por microfilamentos de actina (Aus-Kettis, 1977), los que tienen un diámetro de 7 nm (Martínez-Palomo, 1982). La actina se ha localizado inmediatamente debajo de la membrana plasmática en los sitios de unión del trofozoito al substrato, así como en las regiones de la superficie celular especializadas en formar canales fagocíticos o macropinocíticos (Martínez-Palomo, 1982).

El núcleo de los trofozoitos tiene un diámetro de 4 a 7  $\mu\text{m}$  y no tiene una posición fija dentro de la célula. Presenta cromatina condensada en la periferia y un endosoma en la parte central (Martínez-Palomo, 1982). Dentro de núcleos en

división de trofozoítos se han identificado arreglos paralelos de microtúbulos (Solís y col, 1986), los que, como ya se mencionó, no se han podido localizar en el citoplasma.

El trofozoito es un organismo esencialmente anaerobio, pero puede llegar a consumir oxígeno si se le proporciona (Weinbach y Diamond, 1974), aun a pesar de que no posee mitocondrias ni ciclo del ácido cítrico (Martínez-Palomo, 1982). El glucógeno es la principal fuente de energía, la que se obtiene a través de procesos glicolíticos (Martínez-Palomo, 1982).

#### 1.4) Quiste

La forma del quiste es redonda o ligeramente oval con un diámetro de 8 a 20  $\mu\text{m}$  (Martínez-Palomo, 1982). Recubriendo al quiste se encuentra una pared de 125 a 150 nm de grosor compuesta de elementos fibrilares de 2 a 3 nm de diámetro (Chávez y col, 1978). En E. invadens se ha determinado que la pared del quiste está formada principalmente de quitina (Arroyo-Begovich y col, 1980; Arroyo-Begovich y Carabez-Trejo, 1982).

La membrana plasmática presenta a menudo invaginaciones profundas y muy cerca de su cara interna se localizan arreglos polirribosomales y vacuolas con material fibrogranular denso (Chávez y col, 1978). A medida que el

quiste madura van disminuyendo del citoplasma los cuerpos cromatoides y los depósitos de glucógeno (Martínez-Palomo, 1982).

En las etapas prequísticas sólo hay un núcleo, el cual sufre dos divisiones para producir cuatro núcleos hijos en el quiste maduro.

En general, la organización estructural del citoplasma y de los núcleos del quiste es similar a la descrita para los trofozoítos (Martínez-Palomo, 1982).

#### 1.5) Fagocitosis en E. histolytica

Los trofozoítos de E. histolytica, como ya se mencionó, son células altamente pleomórficas y que dependen de la emisión de pseudópodos para ingerir partículas alimenticias. Este proceso de endocitosis es conocido como fagocitosis y es característico de células que presentan movimiento ameboideo. La fagocitosis en E. histolytica (Orozco y col, 1988) podría iniciarse con una quimiotaxis hacia componentes solubles de la célula blanco que condujeran al trofozoito hasta ésta última, como se ha demostrado en E. invadens (Bailey, 1982). Después de que el trofozoito ha localizado a la célula blanco, la adherencia a receptores de ésta se logra por medio de adhesinas presentes en la superficie amibiana. Las adhesinas distribuidas originalmente en toda

la superficie del trofozoíto se pueden agrupar en zonas localizadas después de formarse el complejo adeshina-receptor (Martínez-Palomo y col, 1980), como se ha reportado para la adhesión de trofozoítos a células CHO (Ravdin y Guerrant, 1981) o a eritrocitos, así como después de incubar trofozoítos con anticuerpos contra su superficie (Calderón y col, 1980) o con la lectina concanavalina A (Trissl y col, 1977).

La adhesión podría producir una señal transmembranal que indujera al trofozoíto a englobar a la célula blanco por medio de la emisión de pseudópodos y así ser introducida al interior del trofozoíto. Alrededor de la célula que está siendo fagocitada es posible demostrar la polimerización de actina, comprobándose así la participación del citoesqueleto en el proceso de fagocitosis (Bailey y col, 1985). Una vez ingerida, la célula blanco podría sufrir degradación después de la fusión con vacuolas que contuvieran enzimas digestivas (Orozco y col, 1988). La interconexión de vacuolas en E. histolytica se ha observado por microscopía electrónica usando la técnica de criofractura para la preparación de los trofozoítos (Lushbaugh y col, 1976). Por otro lado, el mecanismo de destrucción de las células fagocitadas es diferente del sistema encontrado por Klebanoff en los fagocitos de mamíferos (Ravdin y Guerrant, 1982a), ya que en éstos es dependiente de oxígeno y se requiere de la enzima peroxidasa (Klebanoff, 1980; Klebanoff, 1982; Klebanoff y

col, 1983), ambas condiciones normalmente ausentes en los trofozoítos amibianos.

Por último, la eliminación de desechos de partículas ingeridas por el trofozoíto se lleva a cabo por medio de procesos de exocitosis (Orozco y col, 1988). Estos últimos procesos también podrían ser utilizados para el reciclaje de receptores membranales amibianos.

#### 1.6) Fagocitosis como factor de virulencia de E. histolytica

La eritrofagocitosis es una característica distintiva de las amibas patógenas y tradicionalmente se ha considerado como evidencia clínica de amibiasis invasiva el encontrar en las heces de pacientes a trofozoítos con eritrocitos en su interior (Wilcocks y Manson-Bahr, 1972). Además, si se observa por microscopía electrónica a amibas virulentas atacando a células en cultivo se puede comprobar que la fagocitosis juega un papel importante en la destrucción de la célula blanco (Martínez-Palomo y col, 1985).

El grado de eritrofagocitosis medido in vitro varía de acuerdo con la procedencia de la cepa de E. histolytica que se utilice para el ensayo, siendo mayor en aquellas cepas aisladas de pacientes con amibiasis invasiva, mientras que las cepas que provienen de individuos asintomáticos presentan un grado de eritrofagocitosis significativamente

menor (Trissl y col, 1978). Sin embargo, aun dentro de las cepas aisladas de pacientes con amibiasis invasiva se presenta diferente grado de eritrofagocitosis que correlaciona de manera directa con su virulencia in vivo (Orozco y col, 1980). Esta última se mide determinando la proporción de hámsteres que presentan absceso hepático días después de que se les han inoculado trofozoítos por vía intraportal (Tsutsumi y col, 1984).

Por otra parte, Orozco y col (1982a) obtuvieron una clona de E. histolytica que es deficiente en fagocitosis y también en virulencia, y revertantes de la misma clona que recobraban su virulencia, recuperaban también la capacidad de fagocitar (Orozco y col, 1983). Además, cuando se aíslan clonas de amibas de cepas heterogéneas, como la HM1:IMSS, se puede demostrar que la eritrofagocitosis medida in vitro varía para cada clona y es directamente proporcional a su grado de virulencia in vivo (Orozco y col, 1985a). Asimismo, los trofozoítos mutagenizados y seleccionados por su deficiencia en fagocitosis presentan también una disminución en su virulencia en hámsteres (Rodríguez y Orozco, 1986; Hernández Rivas, 1987).

De esta manera, en E. histolytica se ha comprobado una relación directa entre fagocitosis y virulencia, por lo que si hay factores que afectan a la primera, éstos repercutirán en la segunda.

## 1.7) Otros factores de virulencia de E. histolytica

### 1.7.1) Adhesión

Aunque uno de los mecanismos principales por los que E. histolytica causa daño a los tejidos es la fagocitosis, ésta tiene que estar precedida por la adhesión del trofozoito a la célula blanco (Ravdin y Guerrant, 1982b). Después de la adhesión se ha comprobado una citólisis de células en cultivo que es dependiente de contacto y que generalmente precede a la fagocitosis (Ravdin y col, 1980; Ravdin y Guerrant, 1981).

La adhesión parece estar mediada por adhesinas amibianas del tipo de las lectinas, pues algunos azúcares son capaces de inhibir específicamente la adhesión del trofozoito a la célula blanco, inhibiendo también la destrucción de la última (Orozco y col, 1982b; Ravdin y Guerrant, 1981). Se han identificado por lo menos dos azúcares que inhiben la adhesión; éstos son la N-acetilgalactosamina (Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin y col, 1985a; Ravdin y col, 1985b) y ciertos oligómeros de N-acetilglucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980). Sin embargo, no se ha logrado una inhibición total de la adhesión con estos azúcares, lo que sugiere que existen otras adhesinas que intervienen en la adherencia del trofozoito a las células del huésped.

Por otro lado, todas las clonas de E. histolytica deficientes en adhesión que se han aislado a la fecha también han sido deficientes en virulencia sobre células en cultivo y sobre animales de experimentación (García-Rivera y col, 1982; Rodríguez y Orozco, 1986). Sin embargo, se han aislado clonas que, aunque se adhieren eficientemente a la célula blanco, no son virulentas (Orozco y col, 1983; Rodríguez y Orozco, 1986). Además, cepas de E. histolytica que tienen una velocidad de adherencia similar tienen diferente grado de eritrofagocitosis y de virulencia in vivo (Orozco y col, 1982c).

Todo lo anterior sugiere que aunque la adherencia específica del trofozoíto a la célula huésped es una condición indispensable para que aquél pueda provocar daño a ésta, aparentemente no interviene en forma directa en la patogenicidad, por lo que la virulencia de la amiba es ocasionada por factores que intervienen después de la adhesión.

#### 1.7.2) Carga eléctrica de superficie

El ácido siálico, que tiene carga eléctrica negativa, es un componente importante de la cubierta exterior en la mayoría de las células eucarióticas, sin embargo, no se ha podido localizar este azúcar en la superficie ni en fracciones membranales de E. histolytica (Feria-Velasco y col, 1973).

Además, Trissl y col (1977) no lograron encontrar carga eléctrica en la superficie de cepas amibianas virulentas, mientras que cepas de E. histolytica no virulentas y ciertas especies no patógenas de Entamoeba presentaron carga eléctrica negativa en su superficie.

El que las cepas virulentas de E. histolytica no tengan carga eléctrica en su superficie podría facilitar la adhesión a las células del huésped, cuya superficie está cargada negativamente, ya que si el trofozoíto tuviera carga negativa, habría una fuerza de repulsión electrostática que tendería a mantener separado al parásito de la célula blanco. De esta manera, la falta de carga eléctrica neta en la superficie parece constituir un factor de virulencia de E. histolytica.

### 1.7.3) Actividad proteolítica

Aunque se ha comprobado en láminas de epitelio cecal de cobayo que E. histolytica invade al tejido intestinal por las regiones de menor resistencia mecánica, como son las áreas interglandulares de descamación celular (Mora-Galindo y col, 1978; Mora-Galindo y col, 1982), la presencia de enzimas que degradaran proteínas de uniones intercelulares facilitaría la invasión de los tejidos intestinales por parte del trofozoíto y constituiría de esta manera un mecanismo importante de patogenicidad en la amibiasis. La

presencia de tales enzimas proteolíticas en trofozoítos de E. histolytica se había sospechado desde el siglo pasado, pero sólo hasta la década de los 50's se demostró su existencia (Harinasuta y Maegraith, 1958), y se trató de correlacionar el nivel de las proteasas de extractos totales de trofozoítos con la virulencia de las cepas ambientales sin encontrarse resultados concluyentes (Neal, 1960).

En 1982, Muñoz y col describieron una colagenasa presente en trofozoítos de E. histolytica, y posteriormente encontraron que el grado de actividad colagenolítica correlacionaba de manera directa con la virulencia in vivo de las cepas (Muñoz y col, 1984). Este hallazgo basa su importancia en el hecho de que la colágena es uno de los componentes principales de la lámina basal y la matriz extracelular del intestino, por lo que su degradación podría contribuir a la invasión de los tejidos intestinales por los trofozoítos. La colagenasa parece estar asociada a la membrana plasmática del trofozoíto y presenta un patrón de inhibición similar al reportado para otras colagenasas bien caracterizadas, esto es, parece ser una proteasa dependiente de iones metálicos (Muñoz y col, 1982).

Por otra parte, Keene y col (1986) purificaron del sobrenadante de cultivo de trofozoítos de E. histolytica una proteasa dependiente de grupos sulfhidrilo cuyo peso molecular es de 56 Kd. Esta enzima es secretada cinco veces más por la cepa virulenta HM1:IMSS que por la HK9, que es considerada una cepa de virulencia atenuada. La proteasa

purificada degrada laminina, fibronectina y colágena tipo I, proteínas componentes del tejido conectivo que son importantes para mantener la integridad estructural del intestino. Además, esta proteasa es capaz de desprender del substrato a células en cultivo, pero sin causarles daño, por lo que efectivamente parece estar involucrada en la degradación de proteínas que intervienen en la unión intercelular. La proteasa purificada por Keene y col tiene características parecidas a las de una actividad proteolítica que había sido reportada previamente por Gadasi y Kobiler (1983), y también parece ser la misma enzima aislada por Lushbaugh y col (1985).

#### 1.7.4) Actividad formadora de poros membranales

La formación de poros en la membrana plasmática de la célula blanco parece ser uno de los mecanismos por los que E. histolytica ejerce su efecto citoletal. Hasta la fecha ha habido dos reportes de proteínas de E. histolytica formadoras de canales permeables a iones que, aunque parecen tener la misma actividad, difieren en ciertos aspectos.

Lynch y col (1982) identificaron en E. histolytica un polipéptido con capacidad de incorporarse espontáneamente a bicapas lípidas artificiales y formar poros permeables a iones. Esta proteína, a la que denominaron "amebaporo", tiene un peso molecular aparente de 13 Kd, se encuentra

tanto en el medio de cultivo como en una fracción celular de la amiba que sedimenta a 150 000 X g, y la contiene en mayor cantidad la cepa altamente virulenta HM1:IMSS que la cepa avirulenta HK9. Young y col (1982) también reportaron la presencia en E. histolytica de una proteína capaz de formar canales en membranas artificiales y en células tales como macrófagos y linfocitos. Sin embargo, a diferencia del amebaporo de Lynch y col, esta proteína tiene un peso molecular de 30 Kd y no es secretada al medio de cultivo a menos que se usen agentes estimulantes de la membrana plasmática.

Por otro lado, es de llamar la atención que en los mamíferos los linfocitos T citotóxicos y los conocidos como asesinos naturales ("Natural Killer") destruyen a las células neoplásicas mediante la secreción de una proteína formadora de canales conocida como perforina (Young y Cohn, 1986). Además, esta proteína presenta reacción inmunológica cruzada con la proteína C9 (Tschopp y Conzelmann, 1986), la cual es directamente responsable del efecto formador de canales causado por el sistema del complemento. También ciertas toxinas de bacterias y levaduras son capaces de formar poros en membranas (Young y Cohn, 1986). Por lo tanto, parece ser que la formación de canales es un mecanismo común de ataque celular.

### 1.7.5) Efecto citopático sobre células en cultivo

Un método in vitro para evaluar la virulencia de las cepas amibianas ha sido la medición del grado de destrucción que causan los trofozoítos vivos sobre monocapas cultivadas de líneas celulares de mamíferos (Orozco y col, 1978; Mattern y col, 1978). Esta capacidad de destrucción de monocapas celulares confluentes es conocida como efecto citopático y, siendo éste un evento complejo y multifactorial, es muy probable que intervengan en él los factores de virulencia mencionados anteriormente.

Todas las clonas y cepas de E. histolytica a las que se les ha demostrado una deficiencia en su efecto citopático tienen una menor capacidad de formar abscesos hepáticos en hámsteres. Lo anterior se ha demostrado tanto en cepas obtenidas de pacientes (Orozco y col, 1978; Mattern y col, 1978; Orozco y col, 1980) como en clonas aisladas de aquéllas (Orozco y col, 1982a), así como en mutantes deficientes en fagocitosis (Rodríguez y Orozco, 1986; Hernández Rivas, 1987).

Los extractos de trofozoítos también son capaces de destruir la confluencia de monocapas celulares. Sin embargo, este efecto, conocido como "actividad de toxina", no se ha podido correlacionar directamente con el grado de virulencia in vivo.

### 1.8) Mutantes de E. histolytica

Los factores de virulencia de E. histolytica mencionados anteriormente, incluida la fagocitosis, son fenómenos complejos que involucran una gran cantidad de elementos individuales, algunos de los cuales pueden no estar directamente relacionados con la virulencia. Para poder establecer con precisión cuáles de estos elementos son los responsables directos de la virulencia de E. histolytica es necesario estudiar las moléculas específicas que confieren a este parásito su patogenicidad. Una estrategia eficiente para estudiar a moléculas relacionadas con alguna función es el uso de mutantes que tienen alterada esta función.

De E. histolytica se han aislado mutantes que tienen una menor capacidad de fagocitar. El método de selección de los trofozoítos deficientes en fagocitosis fue introducido por Orozco y col (1982a) utilizando la metodología descrita por Clarke (1978) para aislar mutantes de movilidad de Dictyostelium discoideum. El procedimiento para E. histolytica consiste en poner los trofozoítos en interacción con bacterias Escherichia coli, cepa CR-34 Thy<sup>-</sup>, que han sido cultivadas en medio suplementado con bromodesoxiuridina, un análogo de la timidina. Los trofozoítos altamente fagocíticos ingieren una mayor cantidad de bacterias e incorporan en su DNA la bromodesoxiuridina presente en aquéllas. Después de la

irradiación con luz ultravioleta, el DNA de los trofozoítos es roto en los sitios en que la bromodesoxiuridina se incorporó en lugar de la timidina dentro del genoma de la amiba. De esta manera, los trofozoítos con altos niveles fagocíticos son eliminados y sobreviven los que tienen alguna deficiencia en la fagocitosis o en la incorporación de la bromodesoxiuridina.

Rodríguez y Orozco (1986) aislaron mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis utilizando el agente mutagénico etil metanosulfonato. Sin embargo, la frecuencia de reversión al fenotipo silvestre con este compuesto fue relativamente alta, ya que produce mutaciones puntuales, es decir, provoca la substitución incorrecta de nucleótidos en el DNA. Además, los genes mutados con esta sustancia química generalmente producen proteínas alteradas, más que resultar en la ausencia de las mismas. Para que la mutación sea más estable y severa es necesario emplear un agente que produzca alteraciones en el marco de lectura del gen. En este caso se inserta o se deleta algún nucleótido, por lo que la proteína traducida del gen mutado tiene a partir de ese sitio una secuencia de aminoácidos diferente de la original y frecuentemente la síntesis de la proteína es terminada prematuramente por llegarse a un codón de terminación que antes no se leía como tal por estar en un marco de lectura diferente. Un agente mutagénico que provoca alteraciones de este tipo es el ICR-170, con el cual también se obtuvieron

mutantes de E. histolytica con fagocitosis deficiente (Hernández Rivas, 1987).

Todas las clonas utilizados en la presente tesis provienen directa o indirectamente de la cepa HM1:IMSS, la cual es heterogénea y altamente virulenta. El origen de cada clona se presenta en la figura 1. Las clonas denominadas A y L-6 se aislaron directamente de HM1:IMSS (Orozco y col, 1982a) y aunque para la obtención de la clona L-6 no se empleó un agente mutagénico, aquella puede considerarse una mutante espontánea previamente presente en la cepa HM1:IMSS. La clona C9 procede de la A y tiene sus mismas características, salvo en que es resistente al antibiótico emetina, lo que servirá en otros estudios como marcador genético (Orozco y col, 1985b). C923 es deficiente en fagocitosis y se aisló de la clona C9 (Rodríguez y Orozco, 1986). Por último, la clona T6-3 se obtuvo después de mutagenizar a la clona A con el compuesto químico ICR-170 (Hernández Rivas, 1987). El fenotipo de todas estas clonas se presenta en la tabla I.

#### 1.9) Anticuerpos monoclonales contra la superficie de E. histolytica

Desde que Kohler y Milstein introdujeron la metodología para producir hibridomas secretores de anticuerpos

monoclonales (Kohler y Milstein, 1975), éstos han sido ampliamente utilizados en la investigación biomédica. Una de las aplicaciones que han tenido es la identificación de moléculas implicadas en la patogenicidad de microorganismos y parásitos en general.

El principio de la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales consiste en fusionar una célula productora de anticuerpo con una célula de mieloma. La célula productora de anticuerpo proviene del bazo de un ratón al que previamente se ha inmunizado con la sustancia contra la que se quieren obtener los anticuerpos monoclonales, mientras que la célula de mieloma procede de una línea celular obtenida de ratón, la cual ha perdido la capacidad de producir anticuerpos, pero que puede reproducirse de manera indefinida, a diferencia de los esplenocitos normales. De esta manera, el híbrido así formado, conocido como hibridoma, es capaz de secretar un solo tipo de anticuerpo y a la vez de reproducirse indefinidamente. Sin embargo, la formación de híbridos es al azar y tiene una frecuencia muy baja, por lo que después de que se ha efectuado la fusión, las células se cultivan en un medio de selección en el que solamente crecen los hibridomas. De esta forma se eliminan los esplenocitos y las células de mieloma que no se fusionaron, así como los híbridos no deseados, como los resultantes de la fusión de una célula de mieloma con otra célula de mieloma, o de un esplenocito con otro esplenocito. De entre los hibridomas se

seleccionan aquellos que producen anticuerpos contra la sustancia de interés, pues normalmente también se forman hibridomas que secretan anticuerpos contra otros antígenos. Esto ocurre porque en el bazo del ratón existen muchos esplenocitos que secretan anticuerpos contra otros inmunógenos y no sólo contra la sustancia con la que se inmunizó al ratón. La manera más sencilla de probar la especificidad del anticuerpo producido es empleando la técnica de ELISA, la cual consiste en adsorber a una fase sólida el antígeno de interés e incubar con el sobrenadante de cultivo de hibridomas para detectar los anticuerpos que están dirigidos contra dicho antígeno. Los hibridomas elegidos por su capacidad de producir anticuerpo contra el antígeno deseado se clonan para asegurar que el anticuerpo producido sea homogéneo y no esté contaminado con otro anticuerpo producido por un hibridoma resultante de otra fusión. Finalmente, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse del sobrenadante de cultivo in vitro del hibridoma, o en mucha mayor cantidad del líquido ascítico obtenido de ratones a los que se les han inoculado intraperitonealmente los hibridomas.

Actualmente contamos en el laboratorio con hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra E. histolytica, y en particular contra la superficie del trofozoito (Arroyo y Orozco, 1987), pues se ha demostrado que la superficie de este parásito juega un papel

fundamental en su virulencia (Martínez-Palomo y col, 1980; Orozco y col, 1980; Ravdin y Guérrant, 1982b). El proceso de inmunización de los ratones para la obtención de dichos anticuerpos monoclonales se realizó con trofozoítos vivos (Arroyo y Orozco, 1987), ya que aparentemente los anticuerpos que se producen in vivo contra trofozoítos de E. histolytica están dirigidos casi en su totalidad hacia la superficie del parásito (Aust Kettis y col, 1983). Algunos de estos anticuerpos monoclonales son capaces de inhibir in vitro ciertas funciones implicadas en la virulencia de E. histolytica, por lo que es de suponerse que reconocen moléculas que intervienen en las funciones amebianas inhibidas. Por lo tanto, estos anticuerpos constituyen una poderosa herramienta para el estudio a nivel molecular del mecanismo de agresión del agente etiológico de la amebiasis.

Uno de estos hibridomas produce un anticuerpo monoclonal que tiene la capacidad de inhibir in vitro la fagocitosis de E. histolytica. Este se eligió en la presente tesis a fin de identificar y localizar la o las moléculas relacionadas con esta importante función amebiana. Este anticuerpo inhibe también la actividad de toxina, pero se desconoce la importancia de tal hecho, puesto que, como ya se mencionó, no se ha logrado establecer una relación entre dicha actividad y la virulencia amebiana.

Por otra parte, es de esperarse que las moléculas relacionadas con la fagocitosis estén ausentes, disminuidas o modificadas en mutantes amebianas cuya fagocitosis está

alterada. De esta manera, el demostrar la alteración o ausencia en estas mutantes del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal que inhibe la fagocitosis, constituiría una evidencia a favor de la participación de tal antígeno en la fagocitosis de E. histolytica.

Para purificar la proteína que reconoce el anticuerpo monoclonal es posible utilizar cromatografía de afinidad, una de cuyas variantes consiste en acoplar covalentemente un anticuerpo a una matriz para aislar específicamente el antígeno que reconoce dicho anticuerpo de entre un extracto total de proteínas. Las proteínas no reconocidas por el anticuerpo se pueden eliminar lavando la matriz que tiene el complejo anticuerpo-antígeno. Posteriormente, el antígeno se desprende del anticuerpo utilizando condiciones que alteren la interacción antígeno-anticuerpo. Entre estas condiciones eluyentes se encuentran el pH extremo (ácido o alcalino), la adición de concentraciones altas de sales y el uso de iones caotrópicos.

Sin embargo, cuando el anticuerpo se acopla directamente a la matriz, aquél puede unirse por su fragmento Fab, quedando el sitio activo inaccesible para el antígeno. O bien, el anticuerpo podría desnaturalizarse durante el proceso de acoplamiento, especialmente tratándose del tipo de inmunoglobulina IgM, la cual es más propensa a la desnaturalización que las otras clases de anticuerpos. Por las razones anteriores, es conveniente que el anticuerpo monoclonal esté acoplado a la matriz a través de un brazo

intermediario, el cual puede ser un anticuerpo que reconozca al anticuerpo monoclonal, es decir, un anticuerpo anti-ratón. Sin embargo, para evitar que el anticuerpo monoclonal se desprenda también cuando se apliquen las condiciones eluyentes, es preciso que el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal este unido de manera covalente, lo cual se logra usando un agente entrecruzador como el dimetil pimelimidato dihidrocloruro (Schneider y col, 1982). Un complejo de este tipo se presenta esquemáticamente en la figura 2.

Los antígenos purificados pueden usarse para experimentos de inhibición in vitro de la fagocitosis al competir con las amibas por los sitios de la célula huésped que la hacen susceptible a la fagocitosis por los trofozoítos. De esta manera se puede comprobar si sigue biológicamente activo el antígeno purificado.

## OBJETIVOS

## Objetivo general

Identificación y purificación de un antígeno de Entamoeba histolytica involucrado en la fagocitosis.

## Objetivos particulares

- 1) Determinación de la distribución exterior e interior en el trofozoito del antígeno de E. histolytica que interviene en la fagocitosis.
- 2) Caracterización electroforética del antígeno a partir de extractos totales de trofozoitos y empleando el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis.
- 3) Comparación de niveles del antígeno y del reconocimiento del mismo por el anticuerpo monoclonal entre trofozoitos altamente fagocíticos y los deficientes en fagocitosis.

- 4) Purificación del antígeno por medio de cromatografía de afinidad usando el anticuerpo monoclonal.
  
- 5) Realización de ensayos de inhibición in vitro de la eritrofagocitosis empleando la fracción obtenida por cromatografía de afinidad.

## MATERIALES Y METODOS

3.1) Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica

Los trofozoítos de las clonas A, L-6, T6-3, C9 y C923 se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978), suplementado con 15% de suero bovino (HyClone) inactivado a 56°C por 30 min, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond (North American Biologicals), 0.25 U/ml de penicilina y 35 µg/ml de estreptomycin. Los trofozoítos se mantuvieron en tubos de 16 X 125 mm con tapa de rosca, pero cuando se quería tener una cantidad mayor de células, se sembraron en botellas de plástico de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon).

Para cosechar las amibas, los tubos o botellas de cultivo se enfriaron durante 10 min en un baño de agua y hielo y se agitaron suavemente con el fin de desprender a los trofozoítos de las paredes.

## 3.2) Cultivo de hibridomas

Las clonas de hibridomas se cultivaron en medio de Eagle (1959) modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 15% de suero fetal bovino (HyClone), glutamina 2 mM, glicina 0.3 µM, 2-mercaptoetanol (Merck) 50 µM, 0.25 µg/ml de

Fungizona (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Fazekas y Scheidegger, 1980). El medio de cultivo se cambió cada tercer día y se colectó para usarlo como fuente de anticuerpos monoclonales.

Las células se mantuvieron a 37°C en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon) en una atmósfera de aire y CO<sub>2</sub> (95:5%).

### 3.3) Inoculación en ratón de los hibridomas cultivados in vitro para la obtención de líquido ascítico

Los hibridomas se desprendieron de las botellas de cultivo golpeando a éstas suavemente con la mano, después de lo cual las células se centrifugaron a 360 X g por 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de células se resuspendió en DMEM a una concentración celular de 5 a 10 X 10<sup>6</sup> células/ml. De esta suspensión se inocularon 0.5 ml a cada ratón por vía intraperitoneal. Previamente a la inoculación, los ratones habían sido tratados con pristina (Merck), la cual se inyectó intraperitonealmente utilizando 0.5 ml por animal en cada uno de dos tratamientos. El primero de los tratamientos se dio seis semanas antes de inocular los hibridomas y el segundo dos semanas antes de la inoculación.

Cuando los ratones inoculados con los hibridomas presentaron hinchazón del abdomen se les extrajo

asépticamente el líquido ascítico empleando una aguja de 20 X 25. Las células presentes en el líquido ascítico se eliminaron por centrifugación a 360 X g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se filtró usando membranas de poro de 0.2 µm (Millipore) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 3.4) Técnica de ELISA (Engvall y Perlman, 1971)

Placas de 96 pozos (Linbro) se recubrieron con 200 µl por pozo de la solución de proteína por adsorber al sustrato sólido (20 µg/ml), disuelta en amortiguador de carbonato 10 mM, pH 9.6. Las placas con la solución de proteína se dejaron toda la noche a 4°C. El sobrenadante se desechó y las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7.2 con NaCl 140 mM, KCl 3 mM y Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween).

Los sitios no recubiertos se bloquearon llenando las cámaras con gelatina (Baker) al 0.5% disuelta en PBS-Tween e incubando 30 min a 37°C.

Las placas recubiertas y bloqueadas se lavaron dos veces con PBS-Tween antes de colocar las muestras con anticuerpos. Cuando la muestra era sobrenadante de cultivo de hibridoma, éste se colocó directamente en las cámaras, de otra manera la dilución de las muestras se hizo con PBS-Tween. De las muestras se depositaron 100 µl por cámara y se incubaron

toda la noche a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y las cámaras se lavaron tres veces con PBS-Tween.

El siguiente paso fue agregar el conjugado de peroxidasa con anticuerpo (anti-ratón o anti-conejo, dependiendo de la muestra) diluido en PBS-Tween con gelatina al 0.5%.

Después de incubar 3 h a temperatura ambiente con el conjugado, el sobrenadante se eliminó y las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween para en seguida añadir a cada pozo 200 µl del substrato de la peroxidasa recién preparado. Éste último contenía o-fenilendiamina (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck), ambos al 0.04%, disueltos en solución amortiguadora de fosfato 50 mM y citrato 25 mM, pH 5.0.

Transcurrida la incubación de 30 min en la obscuridad a 37°C, la reacción enzimática de la peroxidasa se detuvo agregando una gota de ácido sulfúrico 2.5 M por pozo. Los pozos positivos se evaluaron de acuerdo al grado de coloración alcanzado.

### 3.5) Inmunofluorescencia indirecta

Las amibas cosechadas de una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> se lavaron con PBS estéril frío y se centrifugaron a 360 X g por 5 min. La pastilla de trofozoitos se disgregó con 0.5 ml de PBS y se incubó 10 min a 37°C. Para fijar los trofozoitos se les agregó 1 ml de formaldehído al 3.6% diluido en PBS y

se dejó incubar 1 h a 37°C. Después del fijado, los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS por centrifugación y la suspensión de amibas se dividió en varios tubos cónicos de vidrio de 15 ml. A los trofozoítos que se les iba a permeabilizar la membrana celular se les agregó 1 ml de acetona enfriada previamente a -20°C y se incubaron a temperatura ambiente por 30 seg, inmediatamente después de lo cual se agregaron 12 ml de PBS a cada tubo y éstos se centrifugaron.

Tanto los trofozoítos que no fueron permeabilizados como aquéllos que lo fueron se incubaron 30 min a 37°C con 500 µl de sobrenadante de cultivo de hibridoma o, como control negativo, de medio de cultivo sin anticuerpo. El exceso de anticuerpo monoclonal se eliminó lavando los trofozoítos tres veces con PBS. Posteriormente se agregaron 200 µl del anticuerpo fluoresceinado anti-ratón y se incubó por 20 min a 37°C en la obscuridad. El anticuerpo fluoresceinado no adsorbido a los trofozoítos se eliminó lavando tres veces con PBS. Finalmente, de cada suspensión celular se colocó una gota en portaobjetos y los cubreobjetos se sellaron con cera derretida.

Los trofozoítos se observaron y se fotografiaron en un microscopio Polyvar (Reichert-Jung) con fuente de luz ultravioleta incorporada.

### 3.6) Extracción de proteína total de amiba

Las amibas obtenidas de las botellas de cultivo se centrifugaron a 360 X g por 5 min a 4°C y se lavaron tres veces con PBS por centrifugación. En seguida, la pastilla de trofozoítos se disgregó usando 1 ml de p-hidroximercuribenzoato 100 mM, disuelto en Trizma base [tris(hidroximetil)aminometano] 100 mM, por cada 12 a 15 X 10<sup>6</sup> trofozoítos. Para lisar las amibas, éstas se agitaron vigorosamente por 5 min en un aparato Super-Mixer (Lab-Line Instruments, Inc.). Al extracto obtenido se le agregó un volumen de solución amortiguadora para electroforesis, que contenía Trizma base 55 mM, pH 6.7, EDTA 0.9 mM, SDS al 4% y glicerol al 20%. La solución de proteínas se hirvió en un baño maría por 5 min y se almacenaron alícuotas de 100 µl en nitrógeno líquido. La concentración proteica se determinó por el método de Lowry.

### 3.7) Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (1951) modificado por Oyama (1956). A 5 µl de muestra de proteínas se les agregaron 195 µl de agua bidestilada. En seguida se adicionó 1 ml de la solución preparada mezclando un volumen de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 0.5% con 50 volúmenes de una

solución que contenía  $\text{NaCO}_3$  al 2%,  $\text{NaOH}$  al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%. Se mezcló bien y se dejó 10 min a temperatura ambiente.

A cada tubo de muestra se le agregaron 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido en agua bidestilada (1:1), se mezcló bien y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 45 min.

La concentración proteica se determinó en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 660 nm.

### 3.8) Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Las proteínas se analizaron electroforéticamente en geles planos de poliacrilamida al 7.5% o al 10%, usando como agente desnaturalizante al SDS, de acuerdo al método de Laemmli (1970) modificado por Avila (1982).

Los geles se prepararon en moldes de 15 X 17 cm y 1.5 mm de anchura, para lo cual se vertieron primero 30 ml de la solución del gel separador, que contenía acrilamida (Serva) al 7.5% o al 10%, 0.4 g de  $N,N'$ -metilen bisacrilamida (Serva) por cada 15 g de acrilamida, SDS (Bio-Rad) al 0.1%, glicerol (Merck) al 5%, persulfato de amonio al 0.05% y TEMED (Bio-Rad) al 0.06%, disueltos en amortiguador Trizma base 0.56 M, pH 8.8 con EDTA 2 mM. Una vez que el gel

separador hubo polimerizado se añadió en el espacio restante del molde la solución del gel concentrador. Esta contenía acrilamida al 6%, N,N'-metilen bisacrilamida al 0.16%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 0.1% y TEMED al 0.05% en solución amortiguadora Trizma base 0.12 M, pH 6.6 con EDTA 2 mM. Antes de polimerizar el gel concentrador se colocó el peine formador de ranuras para las muestras.

Tanto el persulfato de amonio como el TEMED se añadieron a la solución de los geles inmediatamente antes de verterla al molde para iniciar la polimerización de la acrilamida.

Después de montar el gel en la cámara de electroforesis (BRL, modelo V161) se agregó a ésta el amortiguador para la corrida, consistente en Trizma base 25 mM y glicina (Sigma) 192 mM, pH 8.3 con SDS al 0.1%.

A las muestras disueltas en amortiguador de electroforesis (ver la técnica de extracción de proteína total de amiba) se les añadió 2-mercaptoetanol a una concentración final de 5% y las muestras se hirvieron otros 2 min. Antes de colocarlas en los carriles del gel, se les agregó el colorante azul de bromofenol (Merck) para una concentración final de 0.01%.

La corrida se hizo con corriente constante de 20 mA hasta que el colorante llegó a aproximadamente 0.5 cm del extremo inferior del gel.

El análisis densitométrico de las proteínas separadas electroforéticamente se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-7. Los carriles del gel teñido con azul de Coomassie se cortaron y se colocaron en una celda de

cuarzo de 10 cm de longitud. La longitud de onda empleada para la densitometría fue de 500 nm.

### 3.9) Tinción del gel de poliacrilamida

3.9.1).- Tinción con azul de Coomassie. Terminada la corrida del gel, éste se desmontó de la cámara de electroforesis y se colocó en un recipiente que contenía aproximadamente 250 ml de la solución de tinción, la que consistía de azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad) al 0.25%, disuelto en metanol al 45% y ácido acético al 10%. Después de 1 h, el gel se lavó con agua bidestilada para descartar de aquél el exceso de colorante.

Para desteñir el gel se empleó una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%, cambiándola cuando se saturaba de colorante, hasta que el fondo del gel estuviera transparente o azul tenue.

3.9.2).- Tinción con plata. El gel se colocó en un recipiente que contenía 500 ml de metanol al 50% y se dejó 2 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o bien, toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. En seguida se agitó el gel por 2 h a temperatura ambiente con 500 ml de agua tridestilada. El proceso de lavado con metanol al 50% y agua se repitió dos veces.

Para la tinción del gel se empleó la técnica descrita por Oakley y col (1980). El gel se pasó a un recipiente con 150 ml de la solución de tinción recién preparada, que consistía de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Merck) al 0.014%,  $\text{NaOH}$  (Baker) al 0.076% y  $\text{AgNO}_3$  (Merck) al 0.8%. Después de un minuto de agitación se desechó esta solución de tinción y se agregaron otros 150 ml de la misma agitando 15 min más.

El exceso de solución de tinción se eliminó del gel pasándolo a otro recipiente que contenía 500 ml de agua tridestilada y agitando por 2 min.

El revelado del gel se realizó en otro recipiente con 300 ml de la solución reveladora, la que contenía ácido cítrico al 0.005% y formaldehído al 0.019%. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarse.

El gel se agitó hasta que las bandas de proteínas aparecieron. Por último, se detuvo el revelado agitando el gel en ácido acético al 1%.

### 3.10) Inmunolectrotransferencia

Terminada la electroforesis del gel de poliacrilamida las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa de acuerdo a la técnica de Towbin y col (1979). El gel se equilibró en la solución amortiguadora de transferencia, que consistía de Trizma base 25 mM y glicina 192 mM, pH 8.3 con

metanol (Merck) al 20%. Esta solución se cambió cuatro veces con intervalos de 20 min.

Asimismo, el papel de nitrocelulosa (Sartorius, poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ), cortado al tamaño del gel, se equilibró en la misma solución amortiguadora por 30 min.

Una vez equilibrados el gel y el papel de nitrocelulosa, se armó en una bandeja con amortiguador la unidad de transferencia (Bio-Rad) de la siguiente manera: se colocó primero un cojinete de fibra y en seguida dos capas de papel filtro (Whatman 2MM), ambos previamente humedecidos en amortiguador de transferencia. Sobre el papel filtro se colocó el gel y sobre éste el papel de nitrocelulosa, presionando con un objeto cilíndrico con el fin de eliminar burbujas de aire. Después del papel de nitrocelulosa se adicionaron otras dos capas de papel filtro y un cojinete de fibra. La unidad se cerró y se pasó a la cámara de transferencia (Bio-Rad), que contenía 2.5 l del amortiguador ya mencionado.

La transferencia se realizó toda la noche a 4°C con voltaje constante de 30 V para al siguiente día aumentarlo a 150 V por una hora más, pero disminuyendo el voltaje de manera que la corriente eléctrica no sobrepasara los 800 mA.

Posteriormente se desmontó la unidad de transferencia y se inició el proceso de revelado del papel de nitrocelulosa con agitación lenta en todos los pasos. El papel se sumergió en solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7.4 con NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween, pero ligeramente

diferente del utilizado en la técnica de ELISA), donde permaneció 4 h con cambios del amortiguador cada 20 min (Batteiger y col, 1982).

El papel se cortó en tiras delgadas y éstas se pasaron individualmente a tubos de 16 X 125 mm con tapa de rosca, donde se agregaron 5 ml por tubo del primer anticuerpo diluido en PBS-Tween que además contenía leche descremada al 5%. Cuando se usó sobrenadante de cultivo de hibridomas como fuente de anticuerpos, solamente se le agregó Tween 20 a una concentración final de 0.5%.

Después de incubar las tiras toda la noche a 4°C, se eliminó la solución del primer anticuerpo y se lavaron cuatro veces con PBS-Tween por 20 min cada vez.

El conjugado de peroxidasa y segundo anticuerpo (dirigido contra el primer anticuerpo) se diluyó en PBS-Tween con leche descremada al 5% y se añadieron 5 ml por tubo. Las tiras se dejaron en incubación por 3 h a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las tiras se lavaron dos veces por 5 min cada vez con amortiguador de fosfato 20 mM, pH 7.4 con NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%. Esta misma solución, pero sin Tween 20, se empleó para lavar otras dos veces las tiras por el mismo tiempo.

Las tiras se lavaron por 5 min con solución amortiguadora de fosfato 50 mM, pH 7.4 y se agregaron a cada tubo 5 ml de la solución reveladora preparada de la siguiente forma: a cada 10 ml del amortiguador anterior se añadieron 2 ml de una solución de 4-Cl-1-naftol (3 mg/ml disuelto en metanol)

y 4  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno. Se siguió el revelado en la obscuridad hasta que las bandas se definieron y la reacción se detuvo lavando las tiras tres veces con agua bidestilada.

Para la tinción de proteína total en las tiras de papel de nitrocelulosa se agregaron 10 ml de una solución de tinta india diluida 1:500 en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.4 con NaCl 150 mM. Se continuó la tinción hasta que aparecieron las bandas y las tiras se lavaron entonces con agua bidestilada.

### 3.11) Precipitación con sulfato de amonio de anticuerpos anti-ratón de cabra

El suero utilizado se obtuvo de una cabra que había sido previamente inmunizada con inmunoglobulinas de ratón. A un volumen de este antisuero se agregó gota a gota un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio (Merck) a fin de lograr un 50% de saturación. Lo anterior se realizó en un baño de hielo y con agitación constante.

Después de mantener a la solución 1 h en agitación, se centrifugó a 13,200 X g por 30 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió con PBS (fosfato 10 mM, pH 7.0 con NaCl 150 mM) al volumen original del antisuero y se repitió la precipitación y centrifugación, pero esta vez se disolvió la pastilla al final en un volumen mínimo de PBS.

La solución concentrada de anticuerpos se dialisó por 48 h contra un litro de PBS haciendo de 4 a 6 cambios al día, para finalmente almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$ .

### 3.12) Purificación de anticuerpo anti-ratón de cabra por cromatografía de afinidad

Para la purificación del anticuerpo anti-ratón se utilizó suero de cabra concentrado por precipitación con sulfato de amonio. En un tubo cónico de plástico se pusieron en interacción 10 ml de antisuero de cabra concentrado con 5 ml de Sepharose 4B (Pharmacia) con inmunoglobulinas de ratón acopladas. La mezcla se agitó suavemente por 1 h a temperatura ambiente. La resina con los anticuerpos de cabra adsorbidos se lavó dos veces con PBS por centrifugación y se montó en una columna de 1 X 10 cm. Por la columna montada se pasó PBS a un flujo de 0.5 ml/min hasta que la densidad óptica a 280 nm disminuyó a 0.1, después de lo cual se pasó por la columna la solución amortiguadora eluyente (glicina-HCl 0.1 M, pH 2.8) y se colectaron fracciones de 2 ml. Para neutralizar el pH ácido del amortiguador de elución se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M, pH 8.0 a cada fracción colectada. Las fracciones con el anticuerpo anti-ratón eluido se mezclaron y se dialisaron por 24 h contra un litro de PBS, haciendo tres cambios del último. La

cantidad de anticuerpo obtenido se midió utilizando la técnica de Lowry.

3.13) Acoplamiento de anticuerpos anti-ratón de cabra a Sepharose 4B (March y col, 1974; Porath, 1974)

A un volumen de Sepharose 4B se agregaron tres volúmenes de carbonato de sodio 2 M y, en un baño de hielo, se agitó vigorosamente dentro de una campana de extracción para añadir en seguida la solución de bromuro de cianógeno (Merck) disuelto en acetonitrilo (1 g/ml). De ésta se añadieron 2 ml por cada 20 ml de Sepharose 4B y se agitó por 2 min.

La resina así activada se pasó a un embudo de filtro poroso, donde se lavó con 20 volúmenes de amortiguador de carbonato 0.1 M, pH 9.5 e igual cantidad de agua bidestilada, para agregar en seguida 20 volúmenes de solución amortiguadora de carbonato 0.2 M, pH 9.5.

La masa húmeda y compacta de la resina se transfirió a un recipiente de plástico que contenía dos volúmenes del anticuerpo anti-ratón (4 mg/ml) disuelto en amortiguador de carbonato 0.2 M, pH 9.5. El acoplamiento de los anticuerpos se realizó por 20 h con agitación lenta a 4°C.

Los grupos activados de la resina que no reaccionaron con el anticuerpo fueron bloqueados mediante la adición de

0.1 volumen de glicina 1 M disuelta en el mismo amortiguador utilizado en el acoplamiento del anticuerpo. El bloqueo fue llevado a cabo con agitación por 4 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, el gel se lavó en un embudo de filtro poroso con 40 volúmenes de cada una de las siguientes soluciones: amortiguador de acetato 0.1 M, pH 4.0 con NaCl 0.5 M; urea 2 M; amortiguador de carbonato 0.1 M, pH 10.0 con NaCl 0.5 M; y por último, amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.2 con NaCl 150 mM.

El gel con el anticuerpo acoplado se almacenó a 4°C hasta su uso en solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7.0 con NaCl 150 mM y azida de sodio (Sigma) al 0.05%.

### 3.14) Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal

El ensayo de doble inmunodifusión radial en placa de agarosa (Ouchterlony) se empleó para determinar el isotipo del anticuerpo monoclonal. Las placas se prepararon en portaobjetos agregando 4 ml de agarosa al 1% disuelta en PBS y fundida en baño maría. Con un horador se hicieron perforaciones de 3 mm de diámetro, de manera que quedara un orificio central y seis periféricos. En el orificio central se colocó sobrenadante concentrado de cultivo de hibridoma y en los seis restantes se vertieron los sueros anti-isotipos de ratón (Nordic Immunological Laboratories); el volumen

empleado para cada orificio fue de 15  $\mu$ l. La placa se incubó dentro de una caja Petri a temperatura ambiente y, una vez que apareció la banda de precipitación, el gel se secó colocando sobre él cinco capas de papel filtro. Después de que la agarosa se secó, la placa se lavó con NaCl 0.1 M por 15 min. El ciclo de secado y lavado se repitió tres veces, con un lavado final de 15 min en agua bidestilada. Antes de teñir la placa, ésta se secó totalmente en una corriente de aire frío. La tinción se realizó sumergiendo la placa por 5 min en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.5% disuelto en etanol al 45% y ácido acético glacial al 10%. Esta última solución, pero sin azul de Coomassie, se empleó para desteñir la placa haciendo de 2 a 3 lavados de 10 min cada uno.

### 3.15) Semipurificación del anticuerpo monoclonal por medio de cromatografía líquida rápida de proteínas

El anticuerpo monoclonal fue semipurificado del líquido ascítico utilizando el equipo programable FPLC (Pharmacia) para cromatografía líquida rápida de proteínas, el cual consta de dos bombas de alta precisión, un mezclador, una bomba peristáltica, una válvula para inyección de muestra, una válvula selectora, un monitor de luz ultravioleta, un graficador, un colector de fracciones y un controlador

general programable. Las columnas utilizadas fueron la Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) y la Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia). La primera es de intercambio aniónico y la segunda de exclusión molecular.

En la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 como amortiguador de equilibrio y para la elución de las proteínas se usó NaCl 0.5 M disuelto en la solución amortiguadora de equilibrio. Durante la cromatografía se utilizó un flujo constante de 1 ml/min y se inyectaron a la columna 500  $\mu$ l de líquido ascítico diluido 1:1 con amortiguador de equilibrio.

La columna Superose 6 separa las proteínas de acuerdo a su peso molecular dentro del rango de 5 a 5000 Kd. La cantidad de líquido ascítico inyectado a la columna fue de 200  $\mu$ l y durante toda la cromatografía se utilizó un amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.2 con NaCl 150 mM a un flujo de 0.25 ml/min.

3.16) Adsorción y entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal a la columna de Sepharose 4B con anticuerpo anti-ratón acoplado

La resina con anticuerpo anti-ratón acoplado se dejó en interacción con el anticuerpo monoclonal semipurificado por 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Una vez que

el anticuerpo monoclonal se adsorbió a la resina, ésta se lavó tres veces con PBS por centrifugación, con un lavado final con trietanolamina 0.2 M, pH 8.2. En seguida, la resina se resuspendió y se entrecruzaron covalentemente los anticuerpos agitando por 45 min a temperatura ambiente con 20 volúmenes de dimetil pimelimidato dihidrocloruro (Sigma) 30 mM, disuelto en trietanolamina 0.2 M y con el pH reajustado a 8.2 (Schneider y col, 1982). Para detener la reacción de entrecruzamiento, la resina se centrifugó y se resuspendió en un volumen de etanolamina 0.2 M, pH 8.2, continuándose la agitación por 10 min más. Finalmente, la resina se lavó tres veces por centrifugación con PBS y se almacenó hasta su uso en PBS con azida de sodio al 0.05%.

### 3.17) Obtención de extracto total de amiba para cromatografía de afinidad

Después de desprender de las paredes de las botellas de cultivo los trofozoitos, éstos se centrifugaron a 360 X g por 5 min a 4°C y el medio de cultivo se eliminó lavando las amibas tres veces con solución salina, centrifugando al final de cada lavado y desechando el sobrenadante. La pastilla de trofozoitos fue disgregada directamente con los inhibidores de proteasas p-hidroximercuribenzoato 100 mM y N-etilmaleimida 100 mM, de los que se agregaron 150 µl de

cada uno. Se añadieron en seguida 150  $\mu$ l del amortiguador Tris-HCl 2 M, pH 8.6 y se dejó 10 min en un baño de hielo.

Las amibas fueron lisadas con tres ciclos de congelación y descongelación usando nitrógeno líquido como agente congelante. Las proteínas de membrana se solubilizaron añadiendo 300  $\mu$ l de desoxicolato de sodio (DOC) al 10% al lisado de amibas e incubando 45-60 min en un baño de hielo, agitando de vez en cuando.

El extracto total de amiba se almacenó en alícuotas de 500  $\mu$ l en nitrógeno líquido después de determinar su concentración de proteínas por el método de Lowry.

### 3.18) Cromatografía de afinidad

Todos los pasos de la cromatografía se efectuaron en el equipo para cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de Pharmacia. El extracto total de amiba se centrifugó por 30 min a 4°C en una microcentrífuga (Eppendorf) y después se pasó a un flujo de 0.4 ml/min por una columna de 1.6 X 6 cm de Sephadex G-25 (Pharmacia) para eliminar los inhibidores de proteasas y las proteínas de bajo peso molecular. La cantidad de proteína total de amibas empleada fue de 10 mg.

El amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8.3 con NaCl 150 mM y DOC al 0.5% (Williams y Barclay, 1986) fue usado en todos los pasos de la cromatografía, excepto en la elución de las

proteínas amibianas de la columna con anticuerpo monoclonal acoplado y en un paso previo a la elución. Por otra parte, las proteínas se detectaron por su densidad óptica a la longitud de onda de 280 nm.

La fracción de proteínas amibianas de alto peso molecular se pasó a un flujo de 0.15 ml/min por una columna de Sepharose 4B que tenía acoplado sólo el anticuerpo anti-ratón, con el fin de adsorber las proteínas amibianas que se adhirieran inespecíficamente (Parkhouse, 1984). Las dimensiones de la columna fueron de 1 X 6.5 cm.

La fracción no adsorbida obtenida del paso anterior se pasó a un flujo de 0.15 ml/min por una columna de Sepharose 4B que tenía acoplado el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal. Las dimensiones de esta columna fueron también de 1 X 6.5 cm y el volumen de las fracciones colectadas fue de 2 ml. Después de que hubieron pasado las proteínas amibianas y de que la densidad óptica de las fracciones colectadas volvió al nivel basal, se invirtió la dirección del flujo en la columna. Esto se hizo con el fin de que las proteínas salieran más rápidamente al aplicar la solución eluyente, ya que aquéllas tienden a adsorberse al principio de la columna y al invertir el flujo en ésta las proteínas adsorbidas quedan más cerca de la salida de la columna. Antes de agregar la solución eluyente, se aplicaron 8 ml de amortiguador de glicina 50 mM, pH 9.3 con NaCl 150 mM y DOC al 0.5% a un flujo de 0.5 ml/min. El objeto de este paso fue desprender las posibles proteínas

adsorbidas inespecíficamente, pero sin desprender aquéllas adheridas al anticuerpo monoclonal.

Las proteínas adheridas específicamente al anticuerpo monoclonal se eluyeron empleando 20 ml de la solución amortiguadora de dietilamina 50 mM, pH 11.5 con DOC al 0.5% (Williams y Barclay, 1986) a un flujo de 0.5 ml/min. Para neutralizar el pH alcalino del amortiguador de elución se agregaron 100  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M a cada fracción colectada.

Finalmente, a las fracciones eluidas y neutralizadas se les determinó su concentración proteica por el método de Lowry y se corrieron en geles de poliacrilamida al 7.5%. Las proteínas se visualizaron en el gel empleando la técnica de tinción con plata.

### 3.19) Inhibición de eritrofagocitosis

Para los ensayos de inhibición de la eritrofagocitosis se utilizaron trofozoítos de la clona A y eritrocitos humanos obtenidos por punción venosa. Los eritrocitos fueron lavados tres veces por centrifugación con 10 ml de solución salina y se fijaron incubando a 37°C durante 1 h con un volumen de glutaraldehído al 2.5% diluido en PBS. Los eritrocitos fijados se lavaron nuevamente tres veces con solución salina para eliminar el glutaraldehído.

Se dejaron interaccionar  $4 \times 10^7$  eritrocitos con 100  $\mu$ l de la fracción eluida de la columna con anticuerpo monoclonal, o bien, con 100  $\mu$ l de la misma solución amortiguadora en que se encontraban las proteínas eluidas (dietilamina 50 mM, pH 11.5 con DOC al 0.5%, neutralizada a aproximadamente pH 8 con Tris-HCl 1 M). La suspensión de eritrocitos se agitó a 37°C por 30 min, después de lo cual los eritrocitos se lavaron dos veces con 5 ml de solución salina. Cada pastilla de eritrocitos se resuspendió en 0.4 ml de medio TYI-S-33 previamente calentado a 37°C y se les agregó 0.4 ml de una suspensión de trofozoítos ajustada con medio TYI-S-33 a 37°C a una concentración de  $1 \times 10^6$  trofozoítos/ml. Después de una incubación de 5 ó 10 min a 37°C, el proceso de fagocitosis de eritrocitos se detuvo agregando 10 ml de agua bidestilada enfriada a 4°C. Posteriormente, las preparaciones se lavaron tres veces con 10 ml de solución salina centrifugando a 360 X g por 3 min. A las pastillas de trofozoítos y eritrocitos se les agregó 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5% diluido en PBS y se dejaron 30 min a 37°C para que se fijaran. Los eritrocitos se tiñeron usando la técnica de Novikoff (1972).

Finalmente, empleando un microscopio óptico se contaron los eritrocitos fagocitados por cien trofozoítos elegidos al azar y se obtuvo el promedio de eritrocitos ingeridos por amiba para cada preparación.

## RESULTADOS

4.1) Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos de E. histolytica

La técnica de inmunofluorescencia fue usada con el fin de determinar la localización en el trofozoíto de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. La localización en el exterior celular se efectuó con trofozoítos que sólo fueron fijados con formaldehído, mientras que para determinar la localización dentro de la célula se emplearon trofozoítos fijados y con la membrana celular permeabilizada por tratamiento con acetona.

En la figura 3 se muestra el patrón de inmunofluorescencia presentado por trofozoítos de fenotipo silvestre (clona A) incubados con el anticuerpo monoclonal. Las fotografías del panel A corresponden a trofozoítos cuya membrana no fue permeabilizada, por lo que el anticuerpo monoclonal sólo puede reconocer el exterior de la amiba. Los trofozoítos con membrana permeabilizada se presentan en el panel B de la figura 3. Las fotografías de la parte superior (A-1 y B-1) corresponden a trofozoítos visualizados con la técnica de contraste de fases y muestran la integridad de los mismos

después del tratamiento para la técnica de inmunofluorescencia.

Los trofozoítos no permeabilizados presentaron la fluorescencia localizada en zonas discretas de la membrana de la amiba (figura 3, A-2 y A-3), lo que indica que la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal no se halla uniformemente distribuida en el exterior del trofozoito. Cuando el anticuerpo monoclonal penetró al interior celular (trofozoítos permeabilizados), la fluorescencia se presentó de manera difusa por todo el citoplasma (B-2 y B-3, figura 3).

#### 4.2) Patrón electroforético de proteínas de las clonas de E. histolytica

Los extractos proteicos obtenidos de clonas amibianas con diferente grado de fagocitosis se corrieron en geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes. Los patrones de proteínas de las clonas se compararon a fin de averiguar si había diferencias evidentes entre ellos, con respecto a la disminución o ausencia de alguna proteína. El patrón proteico total de estas clonas se muestra en la figura 4.

No se distinguieron diferencias significativas a simple vista entre las clonas de fenotipo silvestre (A y C9) y las

clonas mutantes deficientes en fagocitosis (L-6, T6-3 y C923), por lo que la diferencia entre estas clonas probablemente se deba a la alteración de alguna proteína, más que a la ausencia o disminución de la misma.

#### 4.3) Inmunolectrotransferencia de proteína total de las clonas de E. histolytica

Las proteínas amibianas separadas electroforéticamente en gel desnaturizante de poliacrilamida al 7.5% se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se reveló específicamente sólo la proteína que reconoce el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. A esta proteína amibiana se le determinó un peso molecular aproximado de 120 Kd en estos experimentos y parece corresponder a una proteína de E. histolytica descrita por Arroyo y Orozco (1987). Esta última proteína se reportó con un peso molecular de 112 Kd y en geles de poliacrilamida migra a la misma distancia que la proteína identificada en esta tesis. Por lo tanto, dado que parece tratarse de la misma proteína, y hasta no hacer otro tipo de ensayos para determinar su peso molecular exacto, se seguirá considerando en la presente tesis el peso molecular previamente reportado, es decir, de 112 Kd.

Al comparar las clonas amibianas se encontró que la proteína de 112 Kd es reconocida por el anticuerpo monoclonal en menor proporción en la clona mutante L-6 (figura 5, tira 2), mientras que en las otras clonas deficientes en fagocitosis (T6-3 y C923) el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal es aproximadamente el mismo que para las clonas de fenotipo silvestre (A y C9).

Sin embargo, el menor reconocimiento en la clona L-6 de la proteína de 112 Kd por el anticuerpo monoclonal aparentemente no es debido a que esta clona tenga menor cantidad de dicha proteína, pues se encontró que la banda en el gel de poliacrilamida correspondiente a la proteína de 112 Kd se presentaba en aproximadamente la misma cantidad en las clonas silvestres y en las clonas mutantes deficientes en fagocitosis, incluyendo a la L-6. Esto se comprobó tanto con la simple observación de las proteínas separadas en gel de poliacrilamida (figura 4), como cuando se hizo un análisis densitométrico del mismo (figura 6, flechas).

Por otra parte, cuando las tiras de papel de nitrocelulosa con proteína total de las cinco clonas amibianas se revelaron con un antisuero policlonal obtenido contra trofozoítos enteros de fenotipo silvestre (clona A), no se encontró diferencia de tinción para la proteína de 112 Kd entre las clonas silvestres y las mutantes deficientes en fagocitosis (figura 7), sugiriendo este hecho que dicha proteína se encuentra en aproximadamente igual cantidad en estas clonas. Cabe señalarse que tanto las tiras de papel de

nitrocelulosa reveladas con el antisuero contra amiba entera (figura 7) como las tiras reveladas con el anticuerpo monoclonal (figura 5) provienen del mismo experimento de inmunolectrotransferencia, e inclusive, para cada clona amibiana las tiras corresponden al mismo carril con proteína total transferida. De otra manera, si hubiera menor cantidad de proteína total transferida al papel de nitrocelulosa, el anticuerpo monoclonal podría reconocer la proteína de 112 Kd en menor proporción, constituyendo esto un artefacto de la técnica; pero dado que las bandas se tiñeron en aproximadamente la misma proporción en las tiras reveladas con el antisuero policlonal anti-amiba (figura 7), se descarta la posibilidad de que la menor tinción de la proteína de 112 Kd en la clona L-6 se deba a que haya menor cantidad de proteína transferida en esta tira que en las de las otras clonas.

Todo lo anterior parece señalar que en la clona L-6 la proteína de 112 Kd está alterada por lo menos en el epítopo que reconoce el anticuerpo monoclonal, y esto podría ser la causa del menor reconocimiento por el anticuerpo y de la menor capacidad fagocítica de esta clona.

#### 4.4) Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis

El ensayo de doble inmunodifusión radial en placa de agarosa (Ouchterlony) demostró que el isotipo del anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis es IgM. El conocimiento del isotipo del anticuerpo monoclonal puede resultar útil en la elección del método de purificación del mismo de acuerdo a las características bioquímicas de la clase de anticuerpo a la que pertenezca.

#### 4.5) Semipurificación del anticuerpo monoclonal del líquido ascítico

Para la preparación de columnas de afinidad es necesaria una alta concentración del anticuerpo monoclonal, la que es más fácil de obtener del líquido ascítico de ratones inoculados con hibridomas que del sobrenadante de cultivo in vitro de estas células. Sin embargo, dado que la heterogeneidad de las proteínas presentes en el líquido ascítico es comparable a la encontrada en el suero normal, es recomendable una purificación del anticuerpo monoclonal antes de su acoplamiento a la matriz de la columna de afinidad. Tomando en cuenta lo anterior se procedió a la semipurificación del anticuerpo monoclonal usando el equipo

FPLC para cromatografía líquida rápida de proteínas. La evaluación de la actividad del anticuerpo monoclonal se realizó por el reconocimiento de la proteína de 112 Kd en tiras de papel de nitrocelulosa con proteína amibiana total transferida (clona A).

Considerando que el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis es IgM, cuyo peso molecular (aproximadamente 900 Kd) es más alto que el de la mayoría de las proteínas presentes en el líquido ascítico, se intentó la purificación del anticuerpo usando cromatografía de exclusión molecular en la columna denominada Superose 6, donde las proteínas se separan de acuerdo a su peso molecular. El patrón de elución del líquido ascítico de la columna Superose 6 se presenta en la figura 8. La actividad del anticuerpo monoclonal se detectó en tiras de papel de nitrocelulosa y se localizó en el pico I (figura 9), como era de esperarse para un anticuerpo de isotipo IgM, pues las proteínas de alto peso molecular se eluyen primero. El pico I representa aproximadamente el 25% de la proteína total inyectada a la columna. En la figura 10 se muestra el patrón electroforético del líquido ascítico y de los tres primeros picos eluidos. El carril 2 es el que corresponde al pico donde se eluye el anticuerpo monoclonal. Dado que para los ensayos de electroforesis las muestras de proteínas se preparan en condiciones reductoras y desnaturalizantes, las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas se separan y migran de acuerdo a su respectivo peso molecular en el gel

de poliacrilamida. La cadena pesada de la IgM de ratón tiene un peso molecular de alrededor de 75 Kd, mientras que el de la cadena ligera es de aproximadamente 25 Kd.

El pico con el anticuerpo monoclonal presentó algunas proteínas contaminantes (figura 10, carril 2), por lo que se intentó purificar aún más el anticuerpo mediante un paso previo por la columna de intercambio aniónico llamada Mono Q. En la figura 11A se presenta el patrón de elución del líquido ascítico de la columna de intercambio aniónico. La flecha dentro de cada cuadro señala el pico donde se localizó la actividad del anticuerpo monoclonal. Las proteínas presentes en este pico se concentraron y se inyectaron a la columna Superose 6, de donde se obtuvieron cuatro picos (figura 11B), presentándose el anticuerpo monoclonal en el primero de éstos. La figura 12 muestra el patrón proteico en gel de poliacrilamida tanto del pico de la cromatografía de intercambio aniónico que contiene al anticuerpo monoclonal, como de los tres primeros picos de la de exclusión molecular.

En estos experimentos se observa que, a pesar de que la pureza de las proteínas se suele incrementar entre mayor sea el número de pasos de purificación, la cantidad de proteínas contaminantes del anticuerpo monoclonal no disminuyó de manera significativa con el paso previo por la columna Mono Q (figura 12, carril 2). Por lo tanto, se decidió usar solamente la cromatografía de exclusión molecular para la purificación del anticuerpo monoclonal.

#### 4.6) Adsorción y entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal semipurificado con el anticuerpo anti-ratón acoplado a Sepharose 4B

El anticuerpo monoclonal semipurificado de líquido ascítico se acopló a la matriz de la columna de afinidad a través de un anticuerpo anti-ratón. A 6 ml de Sepharose 4B a la que previamente se le había acoplado anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra (7 mg de anticuerpo por ml de resina), se le agregó el anticuerpo monoclonal semipurificado disuelto en PBS. Este último anticuerpo se agregó en exceso con el fin de saturar al anticuerpo policlonal anti-ratón. La cantidad de anticuerpo monoclonal que se logró adsorber fue de 2.2 mg por cada ml de Sepharose 4B con anticuerpo anti-ratón acoplado. El complejo así formado (anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal) se entrecruzó de manera covalente usando dimetil pimelimidato dihidrocloruro.

#### 4.7) Cromatografía de afinidad usando el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis

Antes de que el extracto amibano interaccionara con la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado, aquél se pasó por una columna de Sephadex G-25, de donde se colectó sólo

el primer pico, que correspondía a las moléculas de peso mayor de 5 Kd. Posteriormente, este pico se pasó por una columna de Sepharose 4B que tenía acoplado sólo el anticuerpo anti-ratón. Este paso se realizó con el fin de adsorber las proteínas que se adhirieran a la resina o al anticuerpo anti-ratón y así tener la certeza de que las proteínas que se eluyeran de la columna con anticuerpo monoclonal acoplado sólo hubieran interaccionado con éste último. Las proteínas no adsorbidas en el paso anterior se inyectaron a la columna que tenía acoplado el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal.

El patrón cromatográfico de la purificación del antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal se presenta en la figura 13. El primer pico corresponde a las proteínas del extracto total amibiano que no se adsorbieron a la columna. Antes de eluir las proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal, se aplicó un amortiguador de un pH moderadamente alcalino (pH 9.3) con el propósito de desprender las posibles proteínas amibianas adsorbidas inespecíficamente que todavía permanecieran. Las proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal se eluyeron de la columna con una solución amortiguadora de pH 11.5. En la figura 13 se muestra el pico obtenido después de aplicar el amortiguador de elución.

Las fracciones de la cromatografía de afinidad se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras, y las

bandas de proteínas se visualizaron en el gel con la técnica de tinción con plata. En el carril 2 de la figura 14 se presenta el patrón electroforético de las proteínas eluidas de la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado. Como puede observarse, se encontraron más proteínas de las esperadas de acuerdo al reconocimiento del anticuerpo monoclonal de una sola banda de 112 Kd en los experimentos de inmunoelectrotransferencia (figura 5). Sin embargo, la mayor parte de las proteínas presentes en la fracción eluida parecen corresponder a proteínas acopladas a la columna de afinidad que se desprendieron. Normalmente, antes de pasar la muestra, las columnas de afinidad se tratan con el mismo amortiguador con el que se eluyen las proteínas por purificar. Esto se hace con el propósito de desprender las moléculas (por ejemplo, los anticuerpos) que no estuvieran firmemente acopladas a la resina, y así tratar de evitar que contaminen a las proteínas purificadas al aplicar el amortiguador de elución después de pasar el extracto total de proteínas. Este paso de elución previo a la aplicación de la muestra se realizó en las columnas de afinidad empleadas en la presente tesis, y las proteínas desprendidas se analizaron en gel de poliacrilamida. En el carril 4 de la figura 14 se muestran las proteínas desprendidas de la columna con el anticuerpo anti-ratón acoplado, y en el carril 5 las de la columna con el complejo anti-ratón-anticuerpo monoclonal. La mayor parte de las proteínas presentes en el pico de elución después de pasar

el extracto total amibiano (figura 14, carril 2) parecen corresponder a las proteínas desprendidas de la columna con el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal (carril 5, figura 14). Sin embargo, en la fracción eluida se encontraron ciertas bandas que no parecían corresponder a proteínas acopladas a la columna en sí, lo que sugería que eran proteínas amibianas; estas proteínas se señalan en el lado derecho de la figura 14. No obstante, estas supuestas proteínas amibianas parecen adsorberse inespecíficamente a la columna, pues dichas proteínas se detectaron también cuando a la columna con el anticuerpo anti-ratón se le aplicó el eluyente después de pasar la muestra de proteína de amiba (carril 3, figura 14). Dado que esta columna no contiene anticuerpo monoclonal, seguramente aquellas proteínas no se adsorbieron a la columna con anticuerpo monoclonal porque las reconociera éste, sino que muy probablemente la adhesión fue de manera inespecífica.

Para determinar si la proteína de 112 Kd estaba presente en la fracción eluida de la columna con anticuerpo monoclonal, dicha fracción se corrió en gel de poliacrilamida, de donde se transfirió a papel de nitrocelulosa y se reveló con el anticuerpo monoclonal. El carril en el papel de nitrocelulosa correspondiente a la fracción eluida se cortó en dos tiras. Una de ellas se reveló con el anticuerpo monoclonal y la otra se usó como control negativo, es decir, se incubó con medio de cultivo sin anticuerpo monoclonal. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal no reconoció en la

fracción eluida a la proteína de 112 Kd presente en extractos totales amibianos (figura 15, tira 1), sino a dos bandas de pesos moleculares de 81 y 22 Kd (figura 15, tira 2). Tanto esta tira como la del control negativo (tira 3, figura 15) se trataron previamente con un antisuero policlonal anti-ratón con el fin de bloquear las proteínas de ratón desprendidas de la columna de afinidad que estuvieran contaminando la fracción eluida. Esto se hizo dado que en la técnica de revelado de la tira se usa un segundo anticuerpo dirigido contra proteínas de ratón. Este anticuerpo reconoce al anticuerpo monoclonal empleado como primer anticuerpo, y si hubiera proteínas de ratón transferidas a la tira, aquéllas también se revelarían como resultado del reconocimiento por el segundo anticuerpo. Lo anterior se evita si las proteínas de ratón en la tira se encuentran bloqueadas con anterioridad. Este paso de bloqueo asegura que las bandas de 81 y 22 Kd (tira 2, figura 15) corresponden a proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal, puesto que en la tira usada como control negativo no se reconoció nada, a pesar de que también interaccionó con el segundo anticuerpo.

#### 4.8) Ensayos de inhibición de eritrofagocitosis empleando la fracción eluida de la columna de afinidad

En estos ensayos, antes de agregar los trofozoítos, los eritrocitos fijados con glutaraldehído fueron incubados con la fracción eluida de la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado, o bien, con el amortiguador utilizado en la cromatografía de afinidad. En la figura 16 se presenta la fagocitosis a los 5 y 10 min de eritrocitos incubados con la fracción eluida de la columna de afinidad (-●-) y, como control negativo, de eritrocitos incubados sólo con el amortiguador (-○-). Empleando la prueba estadística "t" de Student se determinó que no había inhibición de la eritrofagocitosis.

## DISCUSION

La estrategia del uso, por una parte de mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis, y por otra de un anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis, resultó en la identificación de una proteína amibiana de 112 Kd. Dicha proteína de E. histolytica parece estar participando en la fagocitosis amibiana, la cual es una función que se ha correlacionado directamente con la virulencia del parásito.

En las clonas amibianas que se estudiaron, esta proteína de 112 Kd parece encontrarse en aproximadamente la misma cantidad tanto en las clonas altamente fagocíticas como en las deficientes en fagocitosis. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal reconoció en menor medida la proteína de 112 Kd de la clona L-6, la cual es deficiente en fagocitosis. Este hecho sugiere que, aunque esta clona parece producir cantidades suficientes de la proteína de 112 Kd, dicha proteína se halla alterada por lo menos en el sitio que reconoce el anticuerpo monoclonal, lo cual a su vez podría afectar la función de dicha proteína y ser por lo tanto menos eficiente que la proteína de 112 Kd de los trofozoitos altamente fagocíticos.

No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que hubiera más de una proteína de un peso molecular aproximado de 112 Kd y que por lo tanto migraran a la misma distancia en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Si éste fuera

el caso, estas proteínas bien podrían no estar relacionadas, y la proteína involucrada en la fagocitosis resultaría enmascarada si hubiera más cantidad de la otra u otras proteínas de 112 Kd. De esta manera, aunque en el gel se observara igual cantidad de proteína en la región de 112 Kd en las clonas amibianas eficientes y deficientes en fagocitosis, podría ser que la clona L-6 tuviera menor cantidad de la proteína relacionada con la fagocitosis y que por lo tanto fuera reconocida en menor proporción por el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis.

En cualquier caso, tanto si la proteína de 112 Kd se halla alterada, como si sólo se halla en menor cantidad, el hecho de que un anticuerpo inhibidor de la fagocitosis reconozca en menor proporción esta proteína en una clona deficiente en esta función, constituye una evidencia en favor de la importancia de dicha proteína en esta misma función.

En cuanto a la explicación de porqué las clonas T6-3 y C923 son deficientes en fagocitosis, parece ser que también es debido a la modificación de proteínas más que a la ausencia de éstas, puesto que no se pudo detectar disminución significativa de alguna proteína cuando se estudió el patrón electroforético de las mismas. En este sentido cabe destacarse a la clona T6-3, que aunque se mutagenizó con un agente que provoca alteración en el marco de lectura del ADN, no presentó ausencia evidente de alguna proteína. Sin embargo, pudiera darse el caso de que la proteína que estuviera ausente en la clona T6-3 fuera producida en tan

poca cantidad en las clonas altamente fagocíticas que no fuera posible detectar su disminución en la clona mutante con las técnicas utilizadas.

Por otra parte, es de llamar la atención que la proteína identificada en esta tesis parece ser la misma proteína encontrada por Arroyo y Orozco (1987). Estos autores reportaron la existencia en E. histolytica de una proteína de 112 Kd involucrada en la adhesión a la célula huésped. Dicha proteína fue identificada usando anticuerpos monoclonales que inhibían la adhesión del trofozoito a la célula blanco. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis empleado en la presente tesis no es capaz de inhibir la adhesión (Arroyo Verástegui, 1987), a pesar de que aparentemente reconoce a la misma proteína que anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión (Arroyo y Orozco, 1987). Esto sugiere que la proteína de 112 Kd de E. histolytica tiene por lo menos dos funciones, pues si dos anticuerpos monoclonales reconocen a la misma proteína ambiana, pero inhiben funciones distintas, entonces estos anticuerpos muy probablemente reconocen sitios de la proteína que tienen funciones diferentes.

También es de llamar la atención que de las tres clonas amebianas deficientes en fagocitosis que se estudiaron, en la que el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis reconoció en menor proporción a la proteína de 112 Kd fue precisamente la que se adhiere a la célula blanco de modo comparable a las clonas de fenotipo silvestre (L-6),

mientras que las otras dos clonas deficientes en fagocitosis (T6-3 y C923) son también deficientes en adhesión (ver tabla I). Por lo tanto, si fuera cierto que la proteína de 112 Kd está involucrada tanto en la función de adhesión como en la de fagocitosis, entonces podría ser que en la clona L-6 dicha proteína de 112 Kd estuviera alterada en el sitio que interviene en la fagocitosis, pero no en el que está relacionado con la adhesión. Esto podría explicar el fenotipo  $\text{Adh}^+$ ,  $\text{Phag}^-$  de esta clona amibiana (tabla I).

Todo lo anterior sugiere la posibilidad de que la proteína de 112 Kd interviene tanto en el reconocimiento y adhesión a la célula blanco, como en el desencadenamiento del proceso de fagocitosis. Un ejemplo de la participación de receptores tanto en la adhesión a la célula huésped como en la fagocitosis, se presenta en macrófagos de mamíferos (Wright y Silverstein, 1986). Los macrófagos tienen en su membrana plasmática receptores para más de cuarenta ligandos y se ha demostrado que algunos de éstos desencadenan la fagocitosis cuando se unen a su receptor en la membrana plasmática del macrófago. Uno de estos receptores reconoce la región Fc de ciertas clases de IgG, y cuando se establece la unión entre el receptor y su ligando, este mismo receptor actúa temporalmente como un canal permeable a iones que es específico para cationes monovalentes (Young y col, 1983). Aunque se desconoce el mecanismo exacto, se cree que este flujo de iones hacia dentro del macrófago es el responsable de la activación celular que conduce a la fagocitosis de la

célula blanco. De esta manera, si en fagocitos de mamíferos la misma molécula parece participar tanto en la adhesión a la célula blanco como en la fagocitosis de la misma, esto mismo podría ocurrir en E. histolytica.

Otro ejemplo de cómo una proteína de superficie puede desencadenar toda una respuesta celular compleja es la activación en mamíferos de células cebadas y leucocitos basófilos en el proceso de anafilaxis (Metzger e Ishizaka, 1982). Dicha activación se da después de que los receptores para la región Fc de las IgE han quedado "entrecruzados" por medio de un antígeno. Dichos receptores normalmente se encuentran libremente en la membrana plasmática de las células cebadas y los leucocitos basófilos, pero cuando un antígeno es reconocido a la vez por dos o más anticuerpos IgE presentes en la membrana de estas células, las IgE, y por lo tanto los receptores para su Fc en la membrana plasmática, quedan unidos a través del antígeno, constituyendo esto una señal para iniciar el proceso de degranulación en la célula cebada y en los leucocitos basófilos. De esta manera, la misma molécula, el receptor para la Fc de las IgE, está interviniendo tanto en el reconocimiento del antígeno (a través de la IgE), como en el desencadenamiento del proceso de degranulación. Otras proteínas membranales que activan procesos celulares por quedar entrecruzadas son el receptor para la insulina (Kahn y col, 1978) y el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (Schechter y col, 1979). Algo similar podría

estar sucediendo con la proteína de 112 Kd de E. histolytica: el trofozoito podría reconocer y adherirse a la célula blanco a través de, entre otras, la proteína de 112 Kd, y el entrecruzamiento de receptores en la membrana del trofozoito podría constituir una señal para el desencadenamiento de la fagocitosis de la célula blanco.

Sin embargo, antes de poder proponer en E. histolytica modelos del tipo de canal transmembranal permeable a iones o de activación celular por entrecruzamiento de receptores, es necesario demostrar que los anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y el inhibidor de la fagocitosis discutidos en esta tesis reconocen a la misma proteína de 112 Kd y no a diferentes moléculas de peso molecular semejante.

Los experimentos de inmunofluorescencia demostraron que la proteína de 112 Kd está localizada en ciertas zonas del exterior del trofozoito. Dado que probablemente dicha proteína de 112 Kd está relacionada tanto en la adhesión como en la fagocitosis, estos sitios localizados quizás representen regiones especializadas de la amiba en el reconocimiento y la ingestión de la célula blanco. Este hecho apoya la evidencia en favor de la importancia de la superficie del trofozoito de E. histolytica en su virulencia.

La distribución dentro del trofozoito de la proteína de 112 Kd se observa uniforme. Sin embargo, con la técnica de

inmunofluorescencia no se puede detectar la localización intracelular exacta de esta proteína, pues se depende del poder de resolución del microscopio óptico. No obstante, se puede especular que la distribución uniforme de la proteína en el interior celular es debida a que se está sintetizando la proteína de 112 Kd y está siendo incorporada a las membranas intracelulares, de donde pasaría a la membrana plasmática por el mecanismo de recirculación de membranas. Una evidencia a favor de esto es que se ha observado que el recambio de membrana es muy alto en los trofozoítos de E. histolytica, y si la proteína de 112 Kd ha de estar presente en la superficie celular, entonces debe de estar incorporada continuamente en las membranas intracelulares que van a constituir la membrana celular exterior.

En la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal no se obtuvo el éxito deseado, dado que se presentaron muchas proteínas contaminantes en la fracción eluida de la columna con anticuerpo monoclonal acoplado. Un tipo de contaminantes parecen ser proteínas de amiba que se adhieren inespecíficamente a los anticuerpos o al soporte de Sepharose 4B. Sin embargo, esta interacción inespecífica debiera ser mínima, pues las soluciones amortiguadoras usadas en la cromatografía de afinidad están diseñadas para evitar este tipo de interacciones, pues contienen sales en relativamente alta concentración para evitar interacciones

electrostáticas y también contienen un detergente para evitar interacciones hidrofóbicas entre las proteínas.

Otro tipo de contaminantes en la fracción eluida, y que constituyen la mayor parte de los mismos, parecen corresponder a proteínas desprendidas de la columna de afinidad, a pesar de que aquéllas se unen inicialmente de manera covalente al soporte. Este desprendimiento no fue posible evitarlo, pues no cesó a pesar de tratarse varias veces las columnas con la solución eluyente previamente a pasar el extracto de amiba (datos no mostrados). Dicho desprendimiento de proteínas acopladas es normal en columnas activadas con bromuro de cianógeno (Parikh y col, 1974), y fue posible detectarlo en los presentes experimentos puesto que la técnica de tinción con plata utilizada en el revelado del gel es muy sensible. Sin embargo, también es cierto que las proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal se eluyen en cantidades muy bajas, pues no se detectaron como bandas prominentes en el gel, como es de esperarse en un proceso de purificación. Esta adsorción ineficiente del antígeno al anticuerpo monoclonal en la columna probablemente refleje la baja afinidad que tienen los anticuerpos de tipo IgM, o también pudiera ser que la mayor parte del anticuerpo monoclonal se encuentre inactivo en la columna como resultado del proceso de purificación, adsorción y entrecruzamiento del mismo, a pesar de las precauciones tomadas para evitar esta inactivación.

Por otra parte, el hecho de que se eluyan de la columna de afinidad dos proteínas de 81 y 22 Kd en lugar de una sola de 112 Kd probablemente sea debido a que las condiciones empleadas en la elución del antígeno sean demasiado extremas y la proteína original se fragmente en por los menos dos partes; o bien, podría ser que la que se considera una sola proteína de 112 Kd, sea en realidad un multímero compuesto de subunidades que se disocian irreversiblemente bajo las condiciones eluyentes. Un hecho digno de mencionarse es que cuando se intentó purificar por cromatografía de afinidad a una proteína amibiana de 112 Kd usando un anticuerpo monoclonal inhibidor de la adhesión (Arroyo Verástegui, 1987), se lograron identificar tres bandas en los experimentos de inmunotransferencia, y dos de estas bandas tienen un peso molecular aproximado (85-90 y 24 Kd) a los de las bandas obtenidas en los presentes experimentos (81 y 22 Kd). Como se mencionó anteriormente, no se ha demostrado que ambos anticuerpos monoclonales reconozcan a la misma proteína amibiana de 112 Kd, pero el que también se hayan encontrado dos proteínas de pesos moleculares semejantes cuando se intentó purificar independientemente a dicha proteína con otro anticuerpo monoclonal, constituye evidencia a favor de que los dos anticuerpos reconocen a la misma proteína.

Por último, para explicar la falta de inhibición de la eritrofagocitosis usando la fracción eluida de la columna de cromatografía de afinidad se pueden dar varias

explicaciones. En primer lugar, pudiera ser que la proteína amibiana se inactivara con el proceso de elución, como sugiere el hecho de que se hallen dos proteínas en lugar de una sola; otra posibilidad es que estas proteínas fueran activas, pero que estuvieran bloqueadas por anticuerpo monoclonal que se eluyera también de la columna, compitiendo de esta manera por dicho antígeno. Una tercera posibilidad es que la proteína fuera activa, pero que no se encontrara en cantidad suficiente para apreciarse un efecto inhibitorio.

En cualquier caso, aunque se hubiera encontrado inhibición de la eritrofagocitosis, no se hubiera tenido la certeza de que fuera debido a las proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal, puesto que, como ya se indicó, parece que existen otras proteínas amibianas contaminantes en la fracción eluida.

## CONCLUSIONES

- 1) Empleando un anticuerpo monoclonal se logró identificar una proteína de Entamoeba histolytica involucrada en la fagocitosis. Esta proteína tiene un peso molecular aparente de 112 Kd y parece intervenir también en la adherencia a la célula blanco.
- 2) Esta proteína es reconocida en menor proporción por el anticuerpo monoclonal en la clona amibiana L-6, la cual es deficiente en fagocitosis. El menor reconocimiento en esta clona parece deberse a la alteración de la proteína más que a encontrarse ésta en menor cantidad.
- 3) La proteína de 112 Kd se localiza en zonas discretas del exterior del trofozoíto, lo que sugiere la especialización de estas regiones en la ingestión de la célula blanco. La distribución difusa dentro del citoplasma del trofozoíto probablemente se deba a la incorporación de la proteína de 112 Kd a las membranas intracelulares para pasar a formar parte después del exterior celular.

- 4) Cuando se intentó purificar la proteína de 112 Kd por cromatografía de afinidad se identificaron, usando el anticuerpo monoclonal, dos proteínas de pesos moleculares de 81 y 22 Kd en la fracción eluida. Esto pudiera deberse a que las condiciones extremas que se utilizan en el proceso de elución fragmentan a la proteína de 112 Kd en por lo menos dos partes. Además, las proteínas de 81 y 22 Kd no se obtuvieron de manera pura, sino que se presentó una gran cantidad de contaminantes, la mayoría de los cuales parecen corresponder a proteínas acopladas a la columna de afinidad que se desprendieron también durante la elución.
- 5) La fracción eluida de la columna de afinidad no fue capaz de inhibir la fagocitosis in vitro de eritrocitos, lo que probablemente sea debido a la inactivación de la proteína de 112 Kd durante la cromatografía de afinidad.

## REFERENCIAS

- Aley, S.B., Scott, W.A. y Cohn, Z.A. 1980. Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J Exp Med. 152: 391-404.
- Alvarez-Alva, R. y De la Loza-Saldivar, A. 1971. Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la República Mexicana. Arch Invest Med (Mex). 2 (Supl. 1): 327-332.
- Arroyo, R. y Orozco, E. 1987. Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. Mol Biochem Parasitol. 23: 151-158.
- Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A. y Ruiz-Herrera, J. 1980. Identification of the structural component in the cyst wall of Entamoeba invadens. J Parasitol. 66: 735-741.
- Arroyo-Begovich, A. y Carabez-Trejo, A. 1982. Location of chitin in the cyst wall of Entamoeba invadens with colloidal gold tracers. J Parasitol. 62: 253-258.
- Arroyo Verástegui, R. 1987. Identificación de una adhesina de Entamoeba histolytica. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Molecular). Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
- Aust-Kettis, A., Lidman, K. y Fagraeus, A. 1977. Actin in Entamoeba histolytica trophozoites revealed by human actin antibodies. J Parasitol. 63: 581-583.
- Aust-Kettis, A., Thorstensson, R. y Utter, G. 1983. Antigenicity of Entamoeba histolytica strain NIH 200: A survey of clinically relevant antigenic components. Am J Trop Med Hyg. 32: 512-522.
- Avila, E.E. 1982. Identificación de las proteínas de membrana plasmática y del "cap" inducido por anticuerpo en Entamoeba histolytica. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
- Bailey, G.B. 1982. Preliminary studies of chemotaxis by Entamoeba. Arch Invest Med (Mex.). 13 (Supl. 3): 265-271.
- Bailey, G.B., Day, D.B. y Gasque, J.W. 1985. Rapid polymerization of Entamoeba histolytica actin induced by interaction with target cells. J Exp Med. 162: 546-558.

Batteiger, B., Newhall, W.J. y Jones, R.B. 1982. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth.* 55: 297-307.

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

Clarke, M. 1978. A selection method for isolating motility mutants of Dictyostelium discoideum. En: Cell Reproduction. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. Dirksen, E.R., Prescott, D.M. y Fox, C.F. (eds.). Academic Press, New York. pp. 621-629.

Chávez, B., Martínez-Palomo, A. y De la Torre, M. 1978. Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens, E. histolytica y E. coli. *Arch Invest Med (Mex.)*. 9 (Supl. 1): 113-116.

Diamond, L.S., Harlow, D.R. y Cunnik, C.C. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Transac R Soc Trop Med Hyg.* 72: 431-432.

Eagle, H. 1959. Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. *Science.* 130: 432-437.

Engvall, E. y Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8: 871-874.

Fazekas, S.S.G. y Scheidegger, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Meth.* 35: 1-21.

Feria-Velasco, A., Martínez-Zedillo, G., Treviño-García Manzo, N. y Gutiérrez-Pastrana, M.D. 1973. Investigación de ácido siálico en la cubierta exterior de trofozoitos de E. histolytica. Estudio bioquímico y citoquímico de alta resolución. *Arch Invest Med (Mex.)*. 4 (Supl. 1): 33-38.

Gadasi, H. y Kobilier, D. 1983. Entamoeba histolytica: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol.* 55: 105-110.

García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guarneros, G. 1982. Aislamiento de clonas de Entamoeba histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arch Invest Med (Mex.)*. 13 (Supl. 3): 129-136.

González-Robles, A. y Martínez-Palomo, A. 1983. Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica. *J Protozool.* 30: 692-700.

Harinasuta, C. y Maegraith, B.G. 1958. The demonstration of proteolytic enzyme activity of Entamoeba histolytica by the use of photographic gelatin films. *Ann Trop Med Parasitol.* 52: 508-515.

Hernández Rivas, R. 1987. Obtención y caracterización de mutantes de Entamoeba histolytica con ICR-170. Tesis profesional de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM.

Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarret, D.B. y Flier, J.S. 1978. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75: 4209-4213.

Kairalla, A.B., Hofbauer, A.F., Pittman, J.C., Lushbaugh, W.B. y Pittman, F.E. 1976. Studies of amebiasis. IV. Isolation and characterization of phagosomes from axenic Entamoeba histolytica. En: Conferencia Internacional sobre Amibiasis. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. (eds.). Instituto Mexicano del Seguro Social. pp. 238-249.

Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S. y McKerrow, J.H. 1986. The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. *J Exp Med.* 163: 536-549.

Klebanoff, S.J. 1980. Myeloperoxidase-mediated cytotoxic systems. En: *The Reticuloendothelial System*. Sbarra, A.J. y Strauss, R. (eds.). Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 279-308.

Klebanoff, S.J. 1982. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. En: *Advances in Host Defense Mechanisms*. Gallin, J.I. y Fauci, A.S. (eds.). Raven Press, New York. pp. 111-162.

Klebanoff, S.J., Henderson, Jr., W.R., Jong, E.C., Jorg, A. y Locksley, R.M. 1983. Role of peroxidase in eosinophil function. En: *Immunobiology of the Eosinophil*. Yoshida, T. y Torisu, M. (eds.). Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 261-282.

Kobiler, D. y Mirelman, D. 1980. Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect Immun.* 29: 221-225.

Kohler, G. y Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497.

Krishna Murti, C.R. 1971. Encystment of amoebae: An example of single cell differentiation. *Curr Sci.* 22: 589-593.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*. 227: 680-685.

Lesh (Losch), F.A. 1875. Massive development of amebas in the large intestine. Traducido: 1975. *Am J Trop Med Hyg.* 24: 383-392.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 27: 37-58.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.

Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Pittman, J.C., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. 1976. Studies of amebiasis. V. Ultrastructural study of ingestive and digestive processes in Entamoeba histolytica: Correlation of freeze-etch replicas and thin sections with enzyme histochemistry. En: Conferencia Internacional sobre Amibiasis. Sepúlveda, B. y Diamond, L.S. (eds.). Instituto Mexicano del Seguro Social. pp. 250-260.

Lushbaugh, W.B. y Pittman, F.E. 1979. Microscopic observations on the filopodia of Entamoeba histolytica. *J Protozool.* 26: 186-195.

Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. 1985. Entamoeba histolytica: Purification of cathepsin B. *Exp Parasitol.* 59: 328-336.

Lynch, E.C., Rosenberg, I.M. y Gitler, C. 1982. An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. *EMBO J.* 1: 801-804.

March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P. 1974. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem.* 60: 149-152.

Martínez-Palomo, A., Orozco, E. y González-Robles, A. 1980. Entamoeba histolytica: Topochemistry and dynamics of the cell surface. En: *The Host-Invader Interplay*. Van den Bossche, H. (ed.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp. 55-68.

Martínez-Palomo, A. 1982. *The Biology of Entamoeba histolytica*. Primera edición. Research Studies Press/John Wiley & Sons LTD. p. 161.

Martínez-Palomo, A. y Martínez-Báez, M. 1983. Selective primary health care: Strategies for control of disease in the developing world. X. Amebiasis. Rev Infect Dis. 5: 1093-1102.

Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E., Fernández-Castelo, S. y Cervantes, A. 1985. Structural bases of the cytolytic mechanisms of Entamoeba histolytica. J Protozool. 32: 166-175.

Mattern, C.F.T., Keister, D.B. y Caspar, P.A. 1978. Experimental amebiasis. III. A rapid in vitro assay for virulence of Entamoeba histolytica. Am J Trop Med Hyg. 27: 882-887.

McConnachie, E.W. 1969. The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba. Parasitology. 59: 41-53.

Metzger, H. e Ishizaka. 1982. Transmembrane signaling by receptor aggregation: the mast cell receptor for IgE as a case study. Fedn Proc. 41: 7-34.

Mora-Galindo, J., Martínez-Palomo, A. y Chávez, B. 1978. Interacción entre Entamoeba histolytica y el epitelio cecal del cobayo. Arch Invest Med (Mex.). 9 (Supl. 1): 261-274.

Mora-Galindo, J., Martínez-Palomo, A. y González-Robles, A. 1982. Interacción entre Entamoeba histolytica y epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo. Arch Invest Med (Mex). 13 (Supl. 3): 233-243.

Muñoz, M.L., Calderón, J. y Rojkind, M. 1982. The collagenase of Entamoeba histolytica. J Exp Med. 155: 42-51.

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

Neal, R.A. 1960. Enzymic proteolysis by Entamoeba histolytica: biochemical characteristics and relationship with invasiveness. Parasitology. 50: 531-550.

Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Davis, C. y Quintana, N. 1972. Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. J Hystochem Cytochem. 20: 1006-1023.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. y Morris, N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 105: 361-363.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y López-Revilla, R. 1978. Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de Entamoeba histolytica. Arch Invest Med (Mex.). 9 (Supl. 1): 257-260.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. 1980. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch Invest Med (Mex.). 11 (Supl. 1): 153-157.

Orozco, E., Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. 1982a. Clonas de Entamoeba histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch Invest Med (Mex.). 13 (Supl. 3): 137-143.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Guarneros, G. y Mora-Galindo, J. 1982b. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de Entamoeba histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch Invest Med (Mex.). 13 (Supl. 3): 159-167.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A., Guarneros, G., Kobiler, D. y Mirelman, D. 1982c. Receptores participantes en la adherencia de Entamoeba histolytica a eritrocitos humanos. Arch Invest Med (Mex.). 13 (Supl. 3): 177-183.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. y Sánchez, T. 1983. Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. J Exp Med. 158: 1511-1521.

Orozco, E., Suárez, M.E. y Sánchez, T. 1985a. Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica, strain HMI:IMSS. Int J Parasitol. 15: 655-660.

Orozco, E., Hernández, F. y Rodríguez, M.A. 1985b. Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine. Mol Biochem Parasitol. 15: 49-59.

Orozco, E., Rodríguez, M.A. y Hernández, F.C. 1988. The role of phagocytosis in the pathogenic mechanism of Entamoeba histolytica. En: Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J.I. (ed.). John Wiley & Sons. pp. 326-338.

Oyama, V.I. y Eagle, H. 1956. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). Proc Soc Exp Biol Med. 91: 305-307.

Parikh, I., March, S. y Cuatrecasas, P. 1974. Topics in the methodology of substitution reactions with agarose. En: Methods in Enzymology. Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Jakoby, W.B. y Wilchek, M. (eds.). Academic Press, Inc. 34: 77-102.

Parkhouse, R.M.E. 1984. Immunopurification. Br Med Bull. 40: 297-301.

Porath, J. 1974. General methods and coupling procedures. En: Methods in Enzymology. Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Jakoby, W.B. y Wilchek, M. (eds.). Academic Press, Inc. 34: 13-30.

Ravdin, J.I., Croft, B.Y. y Guerrant, R.L. 1980. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J Exp Med. 152: 377-390.

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

Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. 1982a. Separation of adherence, cytolytic, and phagocytic events in the cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Arch Invest Med (Mex.). 13 (Supl. 3): 123-128.

Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. 1982b. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev Infect Dis. 4: 1185-1207.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L. y Hewlett, E.L. 1985a. N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. J Infect Dis. 151: 804-815.

Ravdin, J.I., John, J.E., Johnston, L.I., Innes, D.J. y Guerrant, R.L. 1985b. Adherence of Entamoeba histolytica trophozoites to rat and human colonic mucosa. Infect Immun. 48: 292-297.

Rengpien, S. y Bailey, G.B. 1975. Differentiation of Entamoeba: A new medium and optimal conditions for axenic encystation of E. invadens. J Parasitol. 61: 24-30.

Rodríguez, M.A. y Orozco, E. 1986. Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of Entamoeba histolytica. J Infect Dis. 154: 27-32.

Rosenbaum, R.M. y Wittner, M. 1970. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. *J Cell Biol.* 45: 367-382.

Schechter, Y., Hernaez, L., Schlessinger, J. y Cuatrecasas, P. 1979. Local aggregation of hormone-receptor complexes is required for activation by epidermal growth factor. *Nature.* 278: 835-838.

Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. y Greaves, M.F. 1982. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem.* 256: 10766-10769.

Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: Host-pathogen biology. *Rev Infect Dis.* 4: 1247-1253.

Sepúlveda, B. y Martínez-Palomo, A. 1984. Amebiasis. En: *Tropical and Geographical Medicine.* Warren, K.S. y Mahmoud, A.A.F. (eds.). McGraw-Hill. pp 305-318.

Solis, F.J., Chávez, B. y Orozco, E. 1986. Fases de la división nuclear en Entamoeba histolytica. *Arch Invest Med (Mex.)*. 17 (Supl. 1): 95-99.

Towbin, H., Staehelin, T. y Bordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-4359.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C., De la Torre, M. y De la Hoz, R. 1977. Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. *J Exp Med.* 145: 652-665.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E. 1978. Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human red blood cell phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med.* 148: 1137-1145.

Tschopp, J. y Conzelmann, A. 1986. Proteoglycans in secretory granules of NK cells. *Immunology Today.* 7: 135-136.

Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F. y Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol.* 117: 81-91.

Walsh, J.A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* 8: 228-238.

Weinbach, E.C. y Diamond, L.S. 1974. Entamoeba histolytica: I. Aerobic metabolism. *Exp Parasitol.* 35: 232-243.

Wilcocks, C. y Manson-Bahr, P.E.C. 1972. *Manson's Tropical Diseases*. Decimoséptima edición. Bailliere Tindall, London. p. 975.

Williams, A.F. y Barclay, A.N. 1986. Glycoprotein antigens of the lymphocyte surface and their purification by antibody affinity chromatography. En: *Handbook of Experimental Immunology*. Volumen I. Immunochimistry. Capítulo 22. Weir, D.M. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific.

World Health Organization. 1969. Amoebiasis. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Tech Rep Ser.* 421: 1-52.

Wright, S.D. y Silverstein, S.C. 1986. Overview: the function of receptors in phagocytosis. En: *Handbook of Experimental Immunology*. Volumen II. Cellular immunology. Capítulo 41. Weir, D.M. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific.

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

Young, J.D.E., Unkeless, J.C., Young, T.M., Mauro, A. y Cohn, Z.A. 1983. Role for mouse macrophage IgG Fc receptor as ligand-dependent ion channel. *Nature.* 306: 186-189.

Young, J.D.E. y Cohn, Z.A. 1986. Cell-mediated killing: a common mechanism? *Cell.* 46: 641-642.

TABLA I

FENOTIPO DE LAS CLONAS AMIBIANAS UTILIZADAS

	Adh	Phag	Cyp	Tox	Vir
A	+	+	+	+	+
L-6	+	-	-	-	-
T6-3	-	-	-	-	-
C9	+	+	+	+	+
C923	-	-	-	+	-

Adh= Adhesión; Phag= Fagocitosis; Cyp= Efecto citopático; Tox= Actividad de toxina; Vir= Virulencia in vivo.

FIGURA 1

Origen y relación de las clonas de E. histolytica utilizadas en los presentes estudios. EMS= Etil metanosulfonato.

HM1 : IMSS

A

L-6

ICR-170

EMS

T6-3

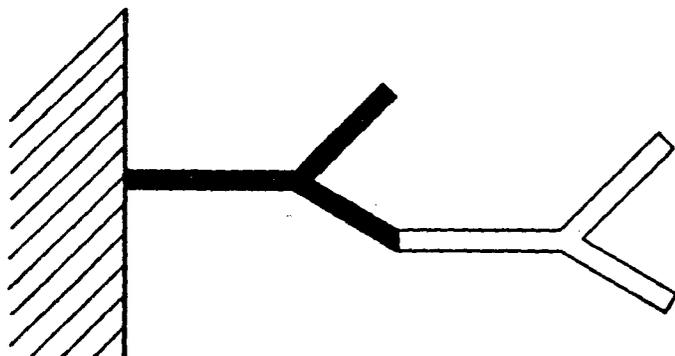
C9

EMS

C923

## FIGURA 2

Representación esquemática del complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal. Este complejo se encuentra acoplado a la matriz de la columna de afinidad (Sepharose 4B) a través del anticuerpo anti-ratón.



SEPHAROSE  
4B

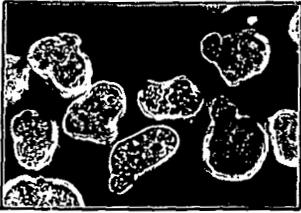
ANTICUERPO  
ANTI-RATON

ANTICUERPO  
MONOCLONAL

### FIGURA 3

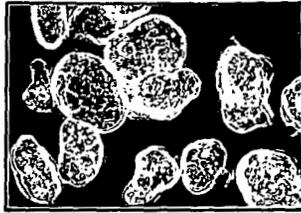
Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos de la clona A usando el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. (Panel A) Trofozoítos cuya membrana celular no fue permeabilizada. (Panel B) Trofozoítos con la membrana celular permeabilizada por tratamiento con acetona. (A-1) Trofozoítos visualizados con la técnica de contraste de fases. (B-1) Trofozoítos con la membrana celular permeabilizada y visualizados con la técnica de contraste de fases. (A-2 y A-3) Trofozoítos incubados con el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. (B-2 y B-3) Trofozoítos con la membrana celular permeabilizada e incubados con el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis.

A



A-1

B



B-1



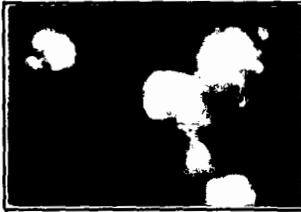
A-2



B-2



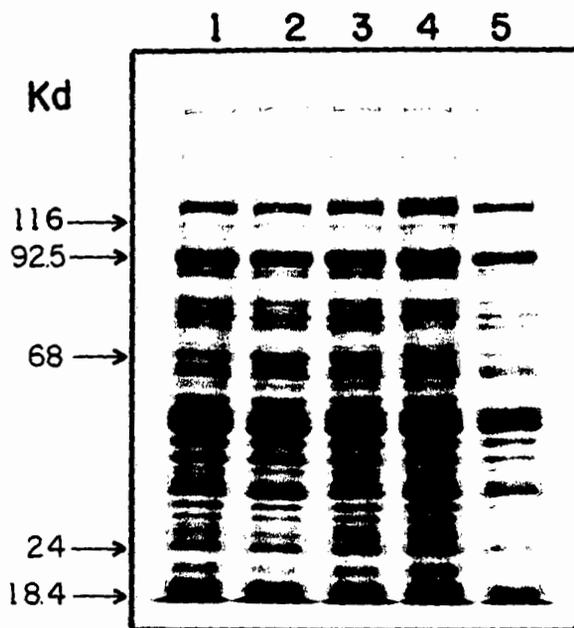
A-3



B-3

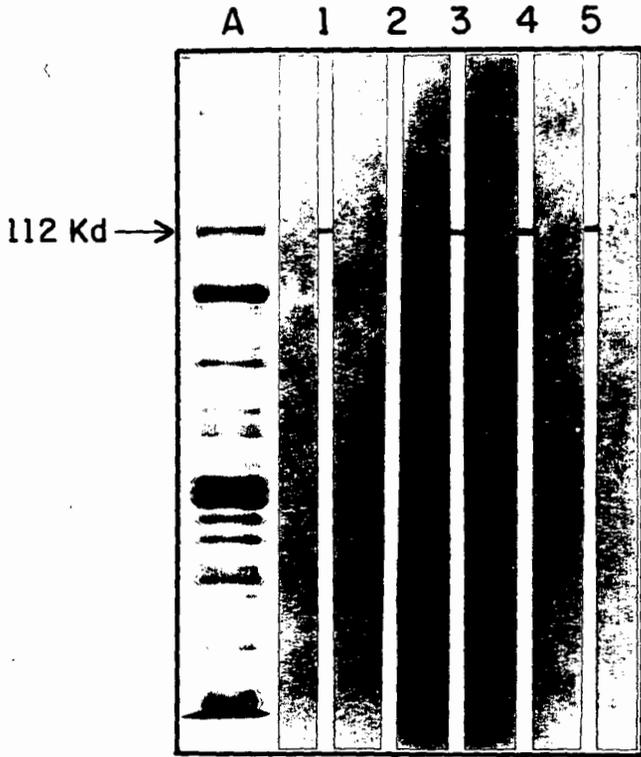
#### FIGURA 4

Patrón electroforético de proteínas totales de clonas de E. histolytica. Las proteínas se corrieron en gel plano de poliacrilamida al 7.5% y se tiñeron con el colorante azul de Coomassie. En cada carril se usaron 150 µg de proteína total, cuya concentración fue determinada usando la técnica de Lowry. (1) Clona A. (2) Clona L-6. (3) Clona T6-3. (4) Clona C9. (5) Clona C923. En el lado izquierdo se señala el peso en Kd de proteínas usadas como marcadores de peso molecular conocido.



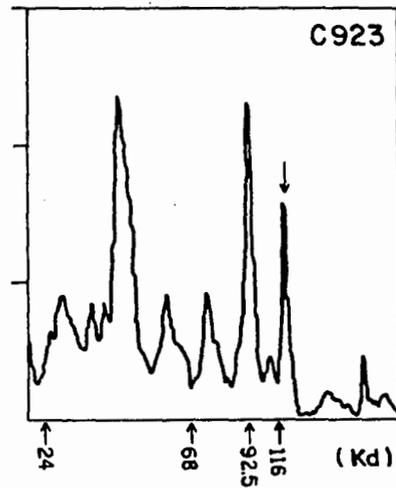
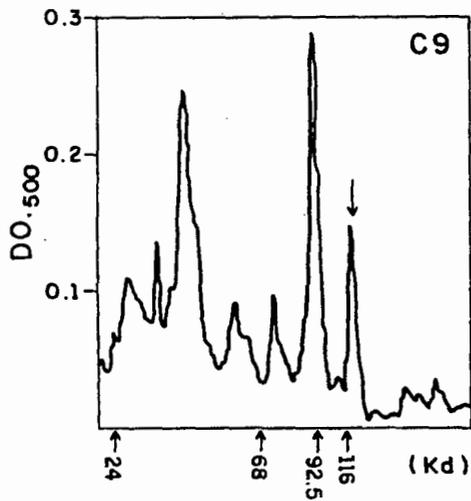
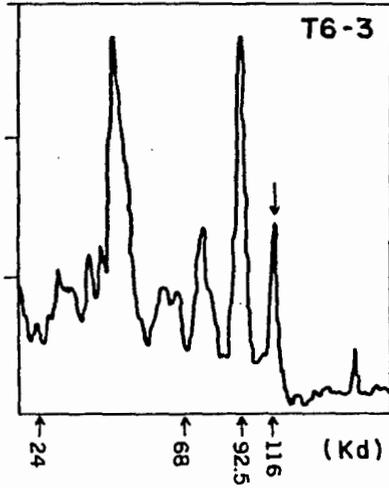
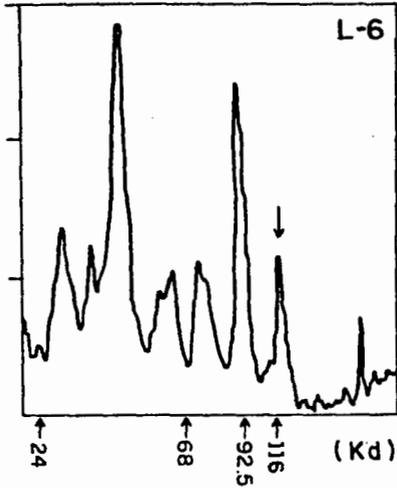
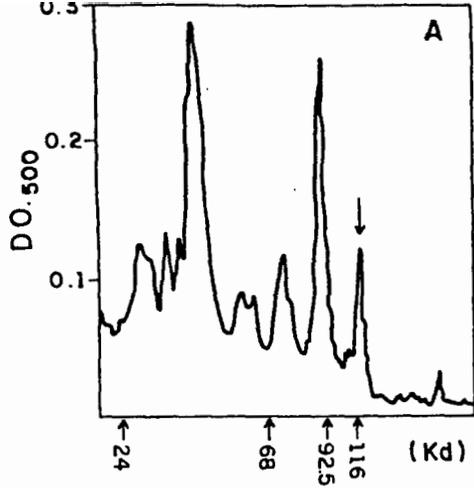
## FIGURA 5

Inmuno-electrotransferencia de proteínas totales de clonas de E. histolytica. El revelado de las tiras de papel de nitrocelulosa se efectuó con el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis, el cual se obtuvo del sobrenadante de cultivo in vitro de hibridomas. El título del anticuerpo determinado con la técnica de ELISA fue de 128. (A) Patrón electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas totales (150 µg) de la clona A. La flecha señala la proteína de 112 Kd reconocida por el anticuerpo monoclonal. (1) Clona A. (2) Clona L-6. (3) Clona T6-3. (4) Clona C9. (5) Clona C923. Las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida al 7.5% y para la inmunotransferencia se usaron 300 µg por carril de proteína total de cada clona ambiana.



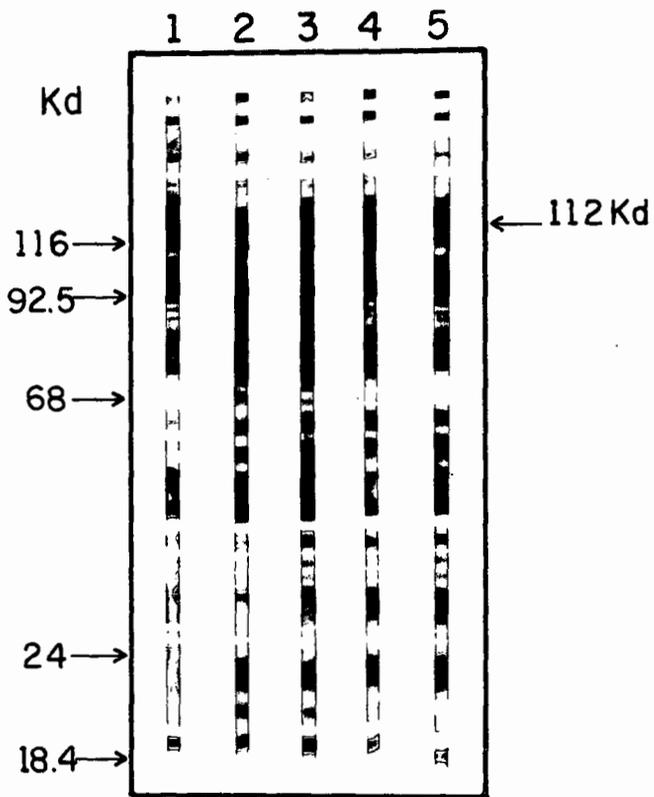
## FIGURA 6

Análisis densitométrico de proteínas totales de clonas de E. histolytica. Las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida al 7.5% y se tiñeron con el colorante azul de Coomassie. La densitometría se realizó a la longitud de onda de 500 nm. La flecha dentro de los cuadros señala la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal. En la parte inferior de los cuadros se muestran los pesos en Kd de proteínas de peso molecular conocido.



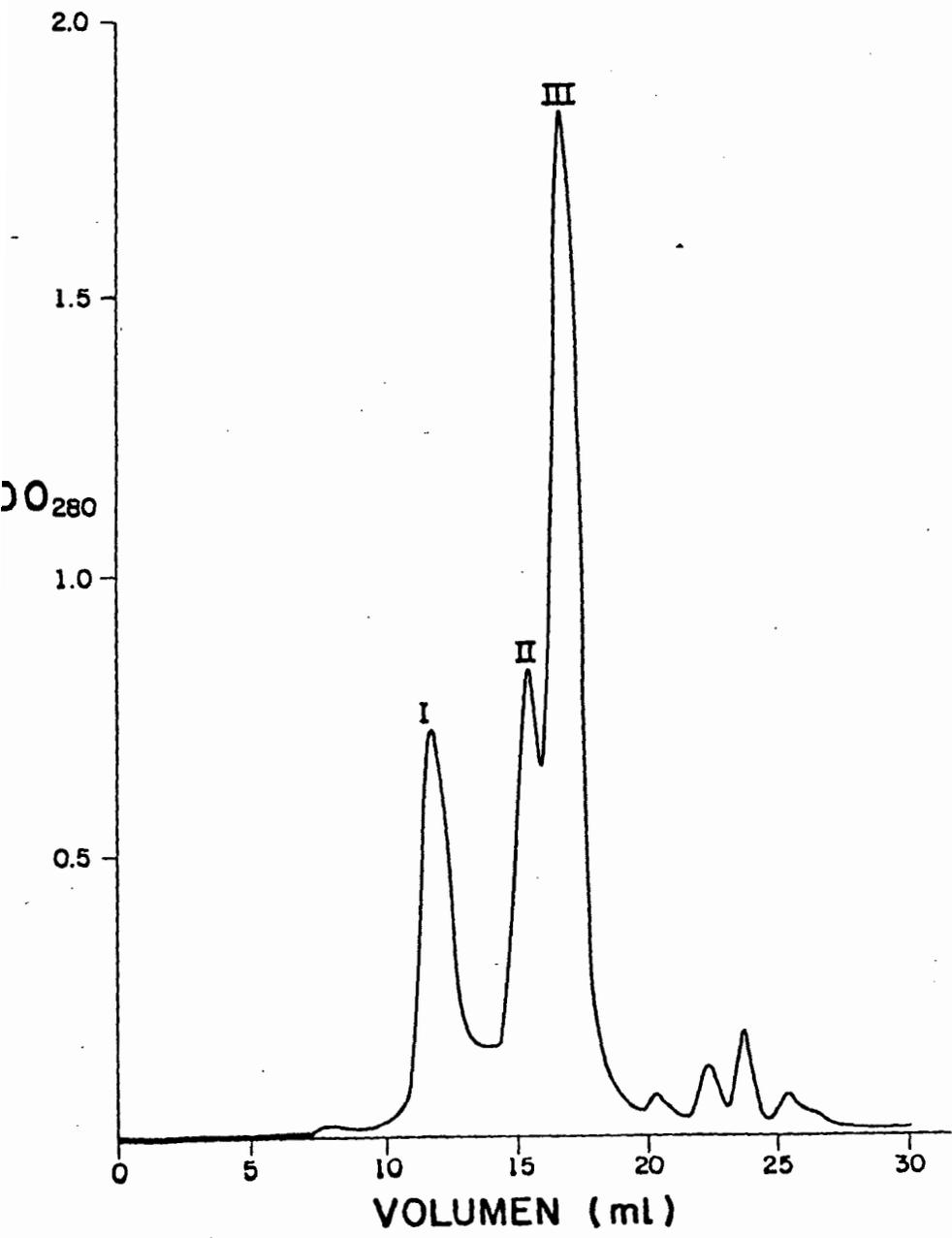
## FIGURA 7

Inmunolectrotransferencia de proteínas de clonas de E. histolytica. Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida al 7.5% y se utilizaron 300 ug por carril. El revelado de las tiras se realizó con un antisuero anti-amiba obtenido de un conejo inmunizado con trozoitos enteros de la clona A. La dilución del antisuero para el revelado fue de 1:100. (1) Clona A. (2) Clona L-6. (3) Clona T6-3. (4) Clona C9. (5) Clona C923. En el lado izquierdo se presentan los pesos en Kd de proteínas de peso molecular conocido y en el lado derecho se señala la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis.



### FIGURA 8

Cromatograma de la separación de proteínas de líquido ascítico empleando la columna de exclusión molecular Superose 6. El volumen de líquido ascítico inyectado a la columna fue de 200  $\mu$ l. Los tres principales picos de elución se presentan con números romanos.

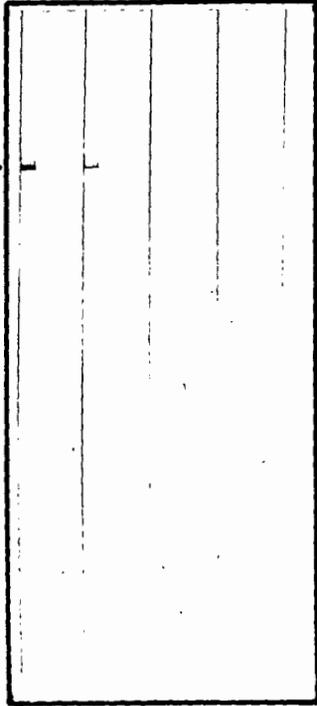


## FIGURA 9

Identificación del pico de la cromatografía de exclusión molecular que contiene al anticuerpo monoclonal. Tiras con proteína total de la clona A de E. histolytica se incubaron con líquido ascítico y con los tres primeros picos obtenidos de la cromatografía de exclusión molecular del líquido ascítico (figura 8). (1) Líquido ascítico. (2) Pico I. (3) Pico II. (4) Pico III. (5) PBS-Tween con leche descremada al 5% (control negativo). La dilución final tanto del líquido ascítico como de los picos eluidos fue de 1:300 en PBS-Tween con leche descremada al 5%.

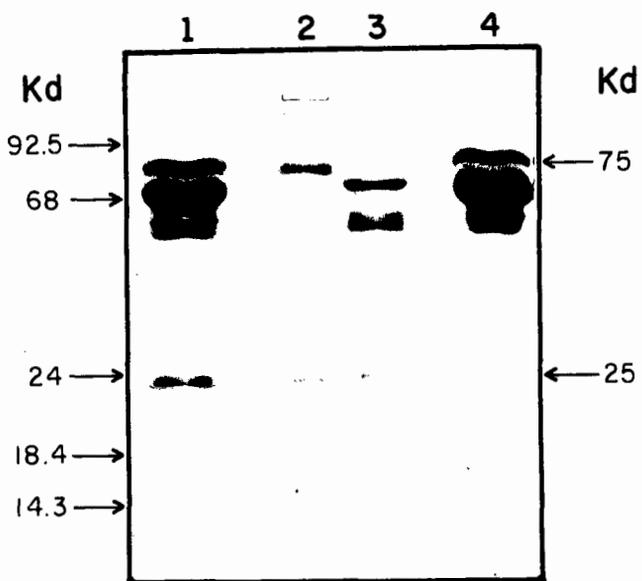
1 2 3 4 5

112 Kd →



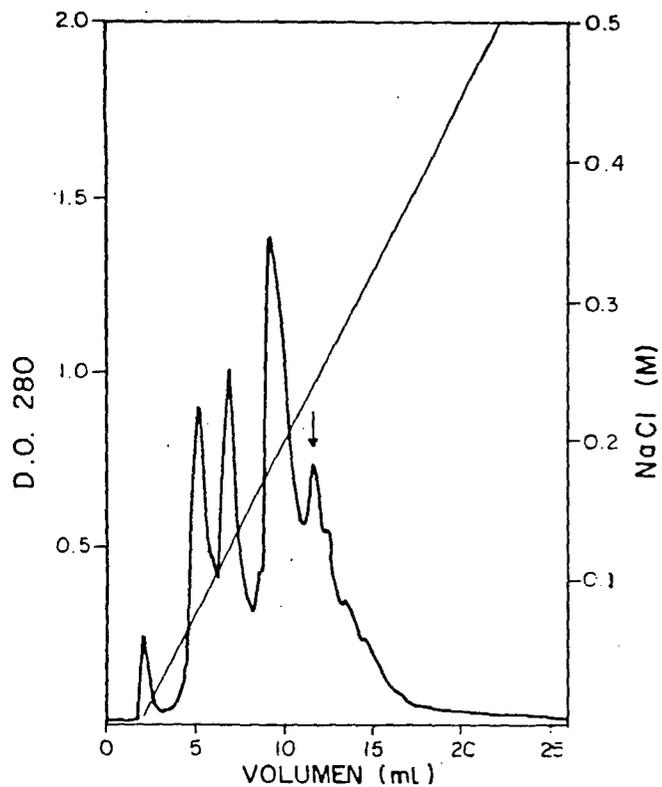
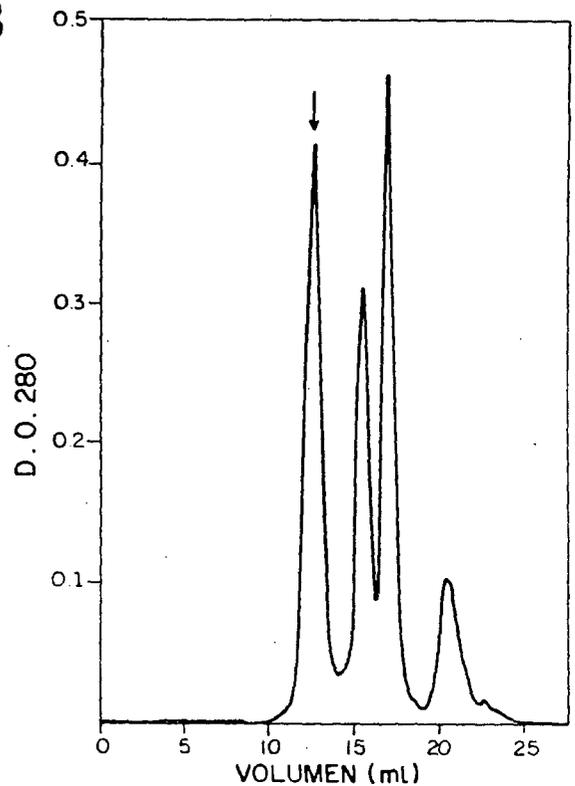
#### FIGURA 10

Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 10% de líquido ascítico y de los tres primeros picos de la cromatografía de exclusión molecular del mismo. (1) Líquido ascítico. (2) Pico I. (3) Pico II. (4) Pico III. En el lado izquierdo se presentan los pesos de los marcadores de peso molecular y en el lado derecho se señalan los de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal. La tinción se realizó con azul de Coomassie.



## FIGURA 11

Patrones de elución de la cromatografía de intercambio aniónico del líquido ascítico y de la cromatografía de exclusión molecular del pico eluido de la columna de intercambio aniónico que contenía al anticuerpo monoclonal. Las flechas señalan los picos donde el anticuerpo monoclonal fue detectado. (11A) Cromatografía de intercambio aniónico del líquido ascítico. A la columna se inyectaron 500  $\mu$ l de líquido ascítico diluido 1:1 con Tris-HCl 20 mM, pH 7.6. La línea diagonal representa el gradiente de NaCl empleado en la elución de las proteínas. (11B) Cromatografía de exclusión molecular del pico eluido de la columna de intercambio aniónico donde se detectó al anticuerpo monoclonal. El volumen de muestra utilizado fue de 200  $\mu$ l.

**A****B**

## FIGURA 12

Patrón electroforético del pico de la cromatografía de intercambio aniónico que contenía al anticuerpo monoclonal y de los tres primeros picos de la de exclusión molecular (figura 11). (1) Pico eluido de la columna de intercambio aniónico donde se detectó al anticuerpo monoclonal. (2) Primer pico de la cromatografía de exclusión molecular del pico eluido en (1). (3) Segundo pico. (4) Tercer pico. En el lado izquierdo se muestran los pesos de los marcadores de peso molecular y en el lado derecho se indican los de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal. Las proteínas se corrieron en gel de poliacrilamida al 10% y la tinción se hizo con azul de Coomassie.

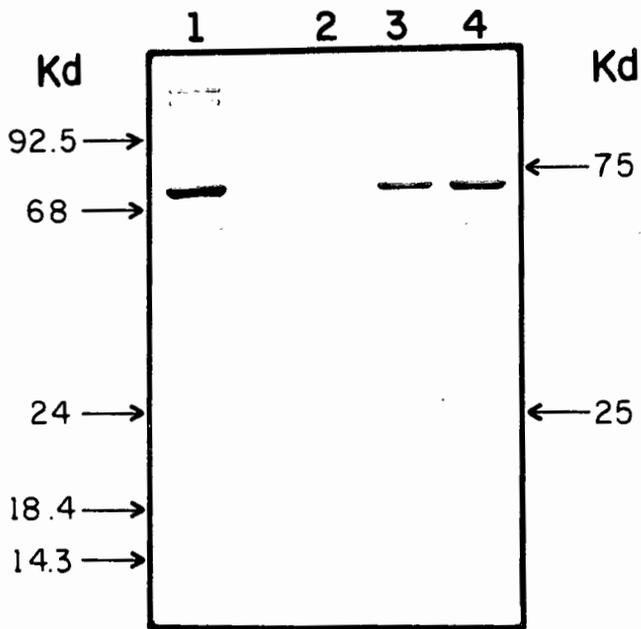
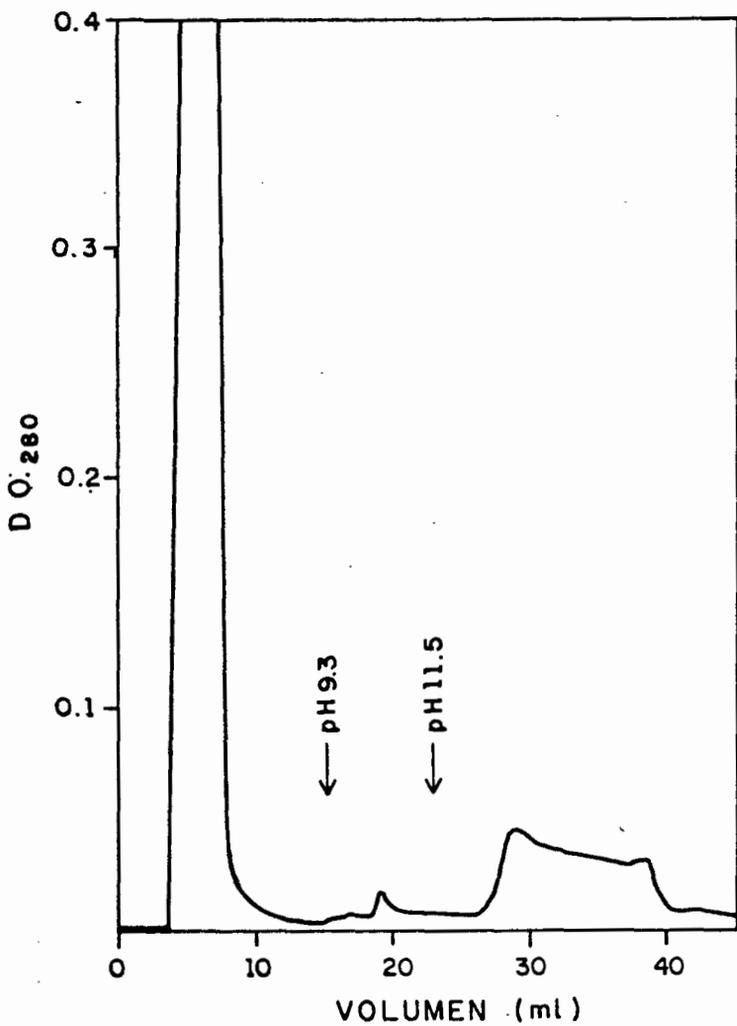


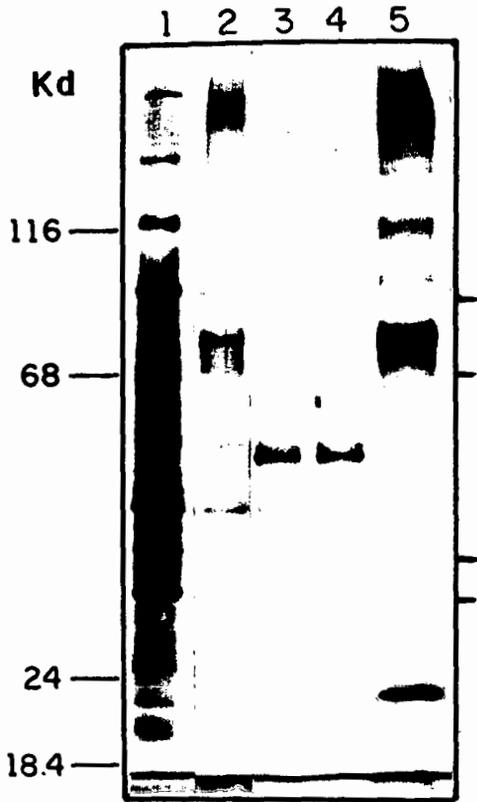
FIGURA 13

Patrón de elución de la cromatografía de afinidad empleando la columna con el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal acoplado. Las flechas indican dónde se aplicaron los diferentes amortiguadores, así como su respectivo pH.



#### FIGURA 14

Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 7.5% de muestras obtenidas de diferentes pasos de la cromatografía de afinidad. (1) Proteínas totales de la clona A de E. histolytica obtenidas usando la técnica de extracción de proteínas para la cromatografía de afinidad. (2) Fracción eluida de la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado al aplicar el amortiguador de elución después de pasar la muestra de proteína total de amiba. En el lado derecho de la figura se indican las proteínas mencionadas en el texto. (3) Proteínas eluidas de la columna que tenía acoplado sólo el anticuerpo anti-ratón después de pasarse las proteínas totales de amiba. (4) Proteínas desprendidas de la columna que tenía acoplado sólo el anticuerpo anti-ratón después de aplicar el amortiguador de elución antes de pasar la muestra de proteína amibiana. (5) Proteínas desprendidas de la columna con el complejo anticuerpo anti-ratón-anticuerpo monoclonal acoplado cuando aquélla se trató con el amortiguador de elución antes de pasar la muestra de proteínas totales de amiba. El amortiguador de elución utilizado en (2), (3), (4) y (5) fue dietilamina 50 mM, pH 11.5 con DOC al 0.5%. Las proteínas se visualizaron en el gel usando la técnica de tinción con plata.



## FIGURA 15

Inmuno-electrotransferencia de la fracción eluida de la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado. (1) Proteína amibiana total obtenida con la técnica de extracción de proteínas para la cromatografía de afinidad y transferida a papel de nitrocelulosa. El revelado se efectuó con el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. (2) Tira con proteínas de la fracción eluida de la columna de afinidad con el anticuerpo monoclonal acoplado y revelada con el anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis. (3) Tira con mismas proteínas transferidas que en (2), pero incubada con medio de cultivo sin anticuerpo monoclonal. Las tiras en (2) y (3) se incubaron previamente con antisuero anti-ratón de cabra a una dilución de 1:100 en PBS-Tween con leche descremada al 5%. El anticuerpo monoclonal inhibidor de la fagocitosis proviene de sobrenadante de cultivo in vitro de hibridomas. Las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida al 7.5%.

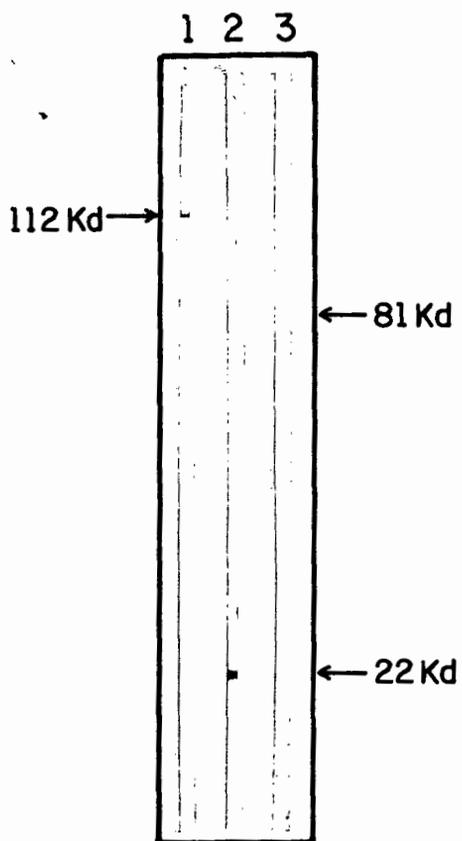
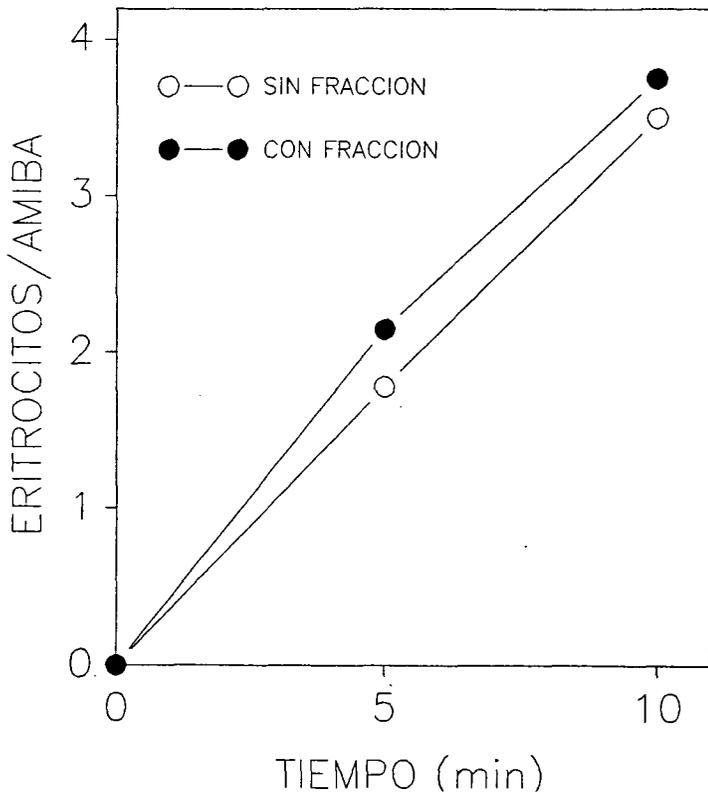


FIGURA 16

Ensayo de inhibición de la eritrofagocitosis. (●-) Eritrocitos incubados con 100  $\mu$ l de la fracción eluida de la columna con el anticuerpo monoclonal acoplado. (○-) Eritrocitos incubados con 100  $\mu$ l de amortiguador de dietilamina 50 mM, pH 11.5 con DOC al 0.5%, neutralizado a aproximadamente pH 8 con Tris-HCl 1 M. Los trofozoítos empleados en los ensayos son de la clona A y las incubaciones se realizaron a 37°C.





**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias**

Expediente .....

Número ..... 636/85 .....

Sr. Arturo Chavoya Peña  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de Tesis "Identificación de antígenos de -  
Entamoeba Histolytica que participan en la Fagocitosis" pa-  
ra obtener la Licenciatura en Biología, con Orientación Bio-  
médica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora  
Galindo.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Octubre 30 de 1985

El Director

  
Ing. Edmundo Poncé Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El M. en C. Juan Mora Galindo, -Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

Guadalajara, Jal., Octubre 27 de 1988

Dr. Carlos Astengo Osuna,  
Director de la Facultad de Ciencias,  
Universidad de Guadalajara,  
P r e s e n t e.

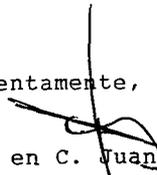
Estimado doctor:

Por este medio comunico a usted que el sr. ARTURO CHAVOYA PEÑA, Pasante de la Licenciatura en Biología, con número de registro 78278854, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulado: **Identificación de un antígeno de Entamoeba histolytica que participa en la fagocitosis;** realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

Así mismo le informo que el manuscrito de la Tesis cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo, para ser impreso y proceder al examen correspondiente.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

M. en C.  Mora Galindo.