



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

Facultad de Química

IDENTIFICACION, CARACTERIZACION E INVESTIGACION DE  
LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTIGENOS PROTEICOS  
DE SUPERFICIE EN Entamoeba histolytica.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
JOSE OLVERA SOTO

1983



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

- I.- INTRODUCCION.
- II.- GENERALIDADES.
- III.- REACTIVOS Y EQUIPO.
- IV.- METODOS.

A.- CULTIVO AXENICO DE Entamoeba histolytica.

- A.1.- Caldo nutritivo TY.
- A.2.- Solución de vitaminas y Tween 80.
- A.3.- Preparación del medio de cultivo TYI-S-33.
- A.4.- Pruebas de esterilidad.
- A.5.- Inoculación de los trofozoítos al medio de cultivo TYI-S-33.
- A.6.- Recolección, lavado y determinación de la viabilidad de los trofozoítos, mediante la técnica de exclusión con azul tripano.

B.- INVESTIGACION DE LA ALBUMINA SERICA BOVINA EN LOS TROFOZOITOS LAVADOS.

- B.1.- Obtención del antisuero anti-albúmina sérica bovina.
- B.2.- Lavado e investigación de la albúmina sérica

bovina, en trofozoítos de Entamoeba histolytica.

C.- USO DE MARCADORES RADIOACTIVOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE.

C.1.- Radioyodación con el isótopo  $^{125}\text{I}$ .

C.2.- Radiosulfonación con el isótopo  $^{35}\text{S}$ .

D.- OBTENCION Y SEPARACION DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE.

D.1.- Empleo de inhibidores enzimáticos.

D.2.- Homogenización de los trofozoítos.

D.3.- Centrifugación diferencial, para la separación de las proteínas de superficie.

E.- PURIFICACION PARCIAL E IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE MARCADAS CON  $^{125}\text{I}$  y  $^{35}\text{S}$ .

E.1.- Concentración de las proteínas de superficie.

E.2.- Cromatografía en columna, en Ultrogel ACA-34.

E.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS.

E.4.- Determinación del peso molecular, en las -  
proteínas de superficie.

F.- INVESTIGACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE  
Entamoeba histolytica, POR INMUNOFLUORESCENCIA.

F.1.- Obtención de los anticuerpos anti-Pico I y  
anti-Pico II.

F.2.- Técnica de la prueba de inmunofluorescencia  
indirecta.

G.- INVESTIGACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS -  
FRACCIONES DE SUPERFICIE DE Entamoeba histolyti-  
ca, FRENTE A SUECOS DE PACIENTES QUE PRESENTARON  
ABSCESO HEPÁTICO AMIBIANO.

G.1.- Técnica de doble difusión en gel de agarosa.

G.2.- Técnica de hemaglutinación pasiva indirecta.

V.- RESULTADOS.

VI.- DISCUSION.

BIBLIOGRAFIA.

ABREVIATURAS

- ASB---Albúmina sérica bovina.
- GRC---Globulos rojos de carnero.
- FMSF---Fenil metil sulfuro fluoruro.
- FM<sup>35</sup>SUMP---Fenil metionil sulfona uridin monofosfato (marcado con <sup>35</sup>S).
- SDS---Dodecil sulfato de sodio.
- SSI---Solución salina isotónica.
- SAFS---Solución reguladora de fosfatos salino.
- SAM---Solución reguladora para marcar.
- SAS---Solución reguladora de separación.
- SAD---Solución reguladora de dilución.
- SAR---Solución reguladora de rompimiento.
- SRFC---Solución reguladora de fosfatos concentrada.
- SRE--- Solución reguladora para electrodos.
- SRTM---Solución reguladora para el tratamiento de las muestras.
- SA---Solución de acrilamida.
- SPA---Solución de persulfato de amonio.
- SFP---Solución fijadora para proteínas.
- STP---Solución para tinción de proteínas.
- SDP---Solución para desteñir proteínas.
- SPPP---Solución para preservar la placa de poliacrilamida.
- TEMED---Tetrametilen diamino.

TYI-S-33---Medio de cultivo compuesto de infusión de extracto de levadura y tetracionato número 33.

Ultrogel ACA-34---Es una combinación de poliacrilamida y agarosa, se utiliza para la separación de proteínas, diferencia pesos moleculares entre 25,000 a 350,000 daltones.

## I.- INTRODUCCION.

Debido a la organización y actividad de la membrana plasmática de Entamoeba histolytica, es importante estudiar su estructura y funcionamiento, ya que de acuerdo a Calderón (1, 10) y Alan (2); las proteínas carbohidratos y fosfolípidos tienen un papel predominante en la determinación de la configuración inmunogénica de la célula.

En el estudio de los componentes estructurales de la membrana, ciertas proteínas de la superficie celular, son de suma importancia, con respecto al papel que desempeñan como antígenos, frente a un sistema inmune (3, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 43).

A causa de que existen en pequeñas cantidades estas proteínas medibles en microgramos, se dificulta el que puedan ser aisladas en forma relativamente pura, tal como se demostró en el estudio realizado por Papermaster (41), en la separación de las proteínas de membrana de las células de rana. En la actualidad hay varios métodos con una alta sensibilidad y resolución para el análisis de las proteínas celulares (11, 18, 24, 25, 27, 28, 29, 40, 41, 42), mediante estos métodos se puede obtener una separación y purificación satisfactoria de las proteínas de membrana plasmática.

Esta separación y purificación es compleja, porque -- las proteínas de membrana celular constituyen solamente del dos al cinco por ciento de la masa celular total, aproximadamente  $10^{-13}$  g./célula, como lo demostró Marchalonis, en -- linfocitos de tumores humanos (34).

Siguiendo las teorías de Acosta y Calderón (1), de -- que las moléculas superficiales de los trofozoítos de Entamoeba histolytica, deben de ser los primeros antígenos reco



nocidos por el sistema inmune del huésped, en el transcurso de la infección amibiana; si durante la enfermedad hay un rechazo efectivo contra los trofozoítos por el sistema inmune, su especificidad estará dirigida principalmente hacia los antígenos que están dispuestos externamente, es decir en la superficie de estos protozoarios. Para determinar esta función sera necesario, caracterizar a las moléculas que se encuentran en la cara externa de los trofozoítos y definir sus propiedades inmunogénicas.

Separando estos componentes de la membrana externa de los trofozoítos, el siguiente paso es inocularlos en animales de experimentación y estudiar posteriormente el papel que juegan los antígenos de membrana, en la viabilidad de estos parásitos durante la infección, como lo realizaron parcialmente Parkhause (42) y Calderón (1, 10, 40).

Los objetivos que se buscaron en estos estudios fueron los siguientes:

1.- Presentar dos métodos en la separación y purificación en el análisis de las proteínas de membrana celular de E. histolytica; el primero es un método de radioyodación, utilizado para marcar residuos de tirosina e histidina (14, 34, 37, 50). Y el segundo un método de comparación, utilizando para ello el compuesto  $FM^{35}SUMP$ , que identifica a los grupo amino libres de las proteínas, la ventaja de estos dos métodos, es que solamente el isótopo radioactivo se une a las proteínas de superficie de la cara externa de la membrana externa, sin que el compuesto atraviese dicha membrana y además identifica cantidades de proteínas medibles en microgramos (9, 12).

2.- Separar las proteínas de membrana marcadas por radioyodación y radiosulfonación, mediante una centrifugación diferencial, de acuerdo a la metodología descrita por Cross (12), seguida de una purificación parcial de las proteínas

de membrana, utilizando cromatografía en columna sobre Ultrogel ACA-34 (48).

La identificación de las proteínas de membrana externa de E. histolytica, se determinó mediante la presencia de radioactividad, en los picos que se obtuvieron de la cromatografía en columna, para confirmar que las proteínas que se separaron eran de superficie; se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (8, 20, 26).

3.- Otro de los objetivos es el de investigar, si las proteínas de membrana externa presentaban actividad biológica, frente a sueros de pacientes que presentaron absceso hepático amibiano. Un hecho importante para llevar a cabo estos estudios fue el que las proteínas de superficie fueran inmunogénicas, utilizando para ello las técnicas de doble difusión en gel de agarosa y hemaglutinación pasiva (30, 32-39, 49). Esta última técnica se utilizó para llevar a cabo una relación, entre el título que se obtuvo con 107 sueros de pacientes que presentaron absceso hepático amibiano, -- frente a un extracto total de trofozoítos y estos mismos sueros frente a las proteínas que se obtuvieron en columna de cromatografía.

## II.- GENERALIDADES.

Desde que se descubrió la amiba por Lösch en San Petersburgo en 1875, se han llevado a cabo observaciones y estudios sobre este parásito, enriqueciéndolas con investigaciones, nuevas técnicas y aportaciones, cada día más refinadas y sensibles para el estudio de Entamoeba histolytica.

Uno de los estudios más importantes fue la aportación de Diamond (17), ya que ayudó a subsiguientes investigaciones fue, la separación de las amibas de un medio mixto, para que se desarrollara como trofozoíto en un cultivo axénico, teniendo así la primera cepa de E. histolytica HK-9.

Las investigaciones que se están llevando en la actualidad, son sobre diferentes cepas, la mayor parte han sido aisladas de pacientes mexicanos (16). Estos estudios están principalmente enfocados a dos objetivos: el primero a la investigación de la estructura y comportamiento biológico de E. histolytica y el segundo comprende, los estudios destinados a determinar las reacciones huésped-parásito, ya sea en humanos o en animales de experimentación.

La razón de estas modalidades, en el estudio de la amibiiasis obedeció a un hecho de considerable importancia; la frecuencia alta de morbilidad y mortalidad, que es reportada cada año por varios países y principalmente el nuestro (19, 22).

El estudio que se presenta, está dirigido hacia el primer objetivo enunciado; la investigación de antígenos de superficie de la membrana externa de trofozoítos en la cepa HM-1 de E. histolytica y aplicar una metodología sensible para el estudio de estas proteínas, con el fin de aislarlas y determinar sus funciones.

Los componentes del medio de cultivo pueden ser contaminantes, en la separación de las proteínas de membrana en E. histolytica. La albúmina sérica bovina (ASB) es un componente del medio de cultivo para los trofozoítos, se ha demostrado que existe ASB adherida a la superficie del trofozoíto en cultivo axénico y la determinación de ésta por serología en pacientes que presentaron absceso hepático amibiano (21, 23, 38).

Para la identificación de proteínas de membrana se utilizaron dos técnicas; la metodología propuesta por Bretscher (9), para el marcado de proteínas de membrana celular con el compuesto  $\text{FN}^{35}\text{SUMP}$ , demostró que las proteínas separadas por cromatografía en poliacrilamida, representa aproximadamente el 15 por ciento de las proteínas de membrana que se marcaron con este radioisótopo.

En la separación de componentes de la membrana externa de E. histolytica, se han determinado glicoproteínas de diferente peso molecular, así como una lipopéptidofosfoglicana (24, 25, 46).

La segunda técnica que se utilizó fue, la incorporación del  $^{125}\text{I}$  a la membrana del trofozoíto, por la enzima lactoperoxidasa, determinándose  $3 \times 10^5$  moléculas de  $^{125}\text{I}$  adheridas a la superficie de la célula.

La microscopía electrónica y radiografía, demostraron que el  $^{125}\text{I}$  y  $^{35}\text{S}$  se asoció sólo a las proteínas de su superficie de membrana, sin afectar la viabilidad de las células (1, 34).

Otra de las técnicas que se utilizaron para la identificación de proteínas de superficie externa del trofozoíto fue, la inmunofluorescencia indirecta (8, 18, 20, 26).

Para estudiar su actividad biológica se utilizaron -

las técnicas de, doble difusión en gel de agarosa (29, 39) y la hemaglutinación pasiva (11, 30, 51).

Para saber la importancia que representaban las proteínas aisladas por nosotros, se determinó el título de 107 sueros por hemaglutinación pasiva, de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, frente a un extracto total de trofozoítos y los mismos sueros frente a las proteínas de membrana, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal (13). Esta relación nos da un panorama de la antigenicidad de las proteínas de membrana, con la antigenicidad total del total del trofozoíto.

### III.- REACTIVOS Y EQUIPO

Tripticasa.

Glucosa.

Extracto de levadura.

Acido L-ascórbico.

Clorhidrato de L-cisteína monohidratada.

Solución vitamínica Diamond TFS-1 40X.

Vitamina B<sub>12</sub>.

Acido tióctico.

Tween 80.

Suero bovino

Todos estos componentes del medio de cultivo para los trofozoítos son de la Casa Biofluidos INC. E.U.A.

#### EQUIPO:

- 1.- Bomba peristáltica P-3 PHARMACIA.
- 2.- Bomba para vacío.
- 3.- Cámara de electroforesis MULTIPHOR LKB 2117.
- 4.- Cámara de Neubauer.
- 5.- Centrífuga SORVAL con refrigeración modelo RC-5.
- 6.- Colector de fracciones LKB ULTRORAC II 2070.
- 7.- Columna de cromatografía LKB 2137.
- 8.- Espectrofótometro Beckman modelo 26.
- 9.- Espectrómetro de centelleo Packard Auto-Gamma 5110.
- 10.- Espectrómetro de centelleo Packard Auto-Betas.
- 11.- Flujo laminar marca VECO.
- 12.- Fuente de poder LKB 2103.
- 13.- Homogenizador Potter-Elvehjem.
- 14.- Incubadora Medi-Lab.
- 15.- Matraces Erlenmeyer de 250 ml. con tapón de rosca.

- 16.- Pipetas de 1, 5 y 10 ml. estériles desechables.
- 17.- Pipetas para globulos blancos.
- 18.- Registrador LKB para proteínas 2140.
- 19.- Tubos para centrifuga de plástico de 13 X 110 mm.
- 20.- Tubos de 15 X 125 mm. con tapón de rosca.
- 21.- Tubos para ultracentrifuga de nitrato de celulosa de 13 X 50 mm.
- 22.- Vasos de precipitado de 20 y 250 ml.
- 23.- Ultracentrifuga Beckman modelo L2-65.
- 24.- UVICOR LKB.

#### IV.- METODOS.

##### A.- CULTIVO AXENICO DE Entamoeba histolytica.

Par el cultivo axénico de E. histolytica, se utilizó el medio de cultivo TYI-S-33, el cual está constituido de las siguientes soluciones:

##### A.1.- Caldo nutritivo TY.

Tripticasa-----	2.0 g.
Extracto de levadura-----	1.0 g.
Glucosa-----	1.0 g.
Cloruro de sodio-----	0.200 g.
Fosfato de potasio monobásico-----	0.050 g.
Fosfato de potasio dibásico-----	0.100 g.
Acido L-ascórbico-----	0.020 g.
Clorhidrato de L-cisteína monohidratada--	0.100 g.
Citrato de amonio férrico-----	0.228 g.
Aforar con agua destilada a 87 ml.	

##### PROCEDIMIENTO.

Se disolvieron los reactivos en el orden presentado, con aproximadamente 50 ml. de agua destilada, se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 0.1 N., y después se llevó a un volumen de 87 ml. con agua destilada. El medio TY fue clarificado mediante filtración, a través de un papel filtro Whatman No. 1 y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Debido a las necesidades del estudio, por la gran cantidad de trofozoítos que se utilizaron, se prepararon -



870 ml. de caldo, que corresponden a diez partes del medio TYI-S-33 y enseguida se depositaron en matraces Elermeyer de 125 ml., 87 ml. de caldo TY para cada matraz. Este paso se hizo en condiciones estériles con la ayuda del flujo laminar VECO y un mechero.

El caldo se dejó en una incubadora a 37 °C, durante 24 hrs., sin que hubiera desarrollo de gérmenes.

#### A.2.- Solución de vitaminas y Tween 80.

a) Solución vitamínica de Diamond TPS-1 40 X.

b) Vitamina B<sub>12</sub> .- Se pesaron 40 mg. de vitamina B<sub>12</sub> y se disolvieron en 100 ml. de agua destilada, esta solución se almacenó en un frasco ámbar y a 4 °C.

c) Acido tióctico.- Se pesaron 100 mg. de ácido tióctico y se disolvieron en 100 ml. de alcohol absoluto.

d) Tween 80 al cincuenta por ciento.- Se pesaron 50 mg. de Tween 80 y se disolvieron en 10 ml. de alcohol absoluto.

#### PROCEDIMIENTO.

A 100 ml. de la solución (a), se le adicionaron 12 ml. de la solución (b), 40 ml. de la solución (c), 4 ml. de la solución (d) y 180 ml. de agua destilada. Esta solución se esterilizó mediante filtro Milipore, con una membrana de 0.22 um. y se colocó en pequeños frascos ámbar, almacenándose a 4 °C.

#### A.3.- Preparación del medio de cultivo TYI-S-33.

#### PROCEDIMIENTO.

Par cada 67 ml. de caldo TY, se adicionaron en condiciones estériles, 3 ml. de mezcla vitamínica-Tween 80 y 10 ml. de suero bovino.

#### A.4.- Pruebas de esterilidad.

Las pruebas que se llevaron a cabo, para determinar la existencia de un posible contaminante ya sea por bacterias o por hongos fueron las siguientes:

La primera fue incubar al medio TYI-S-33 durante 24 hrs. a 37 °C., habiendo transcurrido las 24 hrs. se procedió a inocular el medio TYI-S-33 a medios de cultivos enriquecidos para anaerobios y aerobios, con la ayuda de una asa bacteriológica. Estos medios se incubaron a 24 hrs. y 48 hrs. a 37 °C.

La segunda prueba fue inocular el medio TYI-S-33, a un tubo que contenía medio de Sabouraud, durante 72 hrs. a 37 °C.

En ambas pruebas no se presentó desarrollo de microorganismos.

#### A.5.- Inoculación de los trofozoítos al medio de cultivo.

La cepa de L. histolytica que se cultivó en el laboratorio, fue la cepa M-1 (proporcionada por la D. B. Margarita de la Torre, Centro Médico I.A.S.S.). Se usaron tubos de ensaye de 15 X 125 mm. con tapón de rosca; por lo general cada tubo contenía aproximadamente  $1 \times 10^6$  trofozoítos/10 ml.

El tubo que se utilizó para inocular cada matraz, se colocó en baño de hielo, por cinco minutos para desprender las células de las paredes del tubo, que contenían la cepa.

Se inocularon  $3 \times 10^5$  trofozoítos/3 ml. a matraces de 125 ml., que contenían 87 ml. del medio TYI-S-33. Después se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ ., durante 72 hrs.

A.6.- Recolección, lavado y determinación de la viabilidad de los trofozoítos, mediante la técnica de exclusión con azul tripano.

Después de haber obtenido un buen desarrollo de las células a las 72 hrs., los matraces se colocaron en un baño de hielo, para ayudar al desprendimiento de las células y se colocaron en tubos de centrifuga a 500 x g. y se lavaron las células, con solución salina de fosfatos a pH de 7.0 .

El procedimiento se repitió nueve veces con un volumen total de 60 ml. de la solución de fosfatos.

Al terminar con el lavado de las células, se comprobó la viabilidad de los trofozoítos, con azul tripano al 0.2 por ciento.

## B.- INVESTIGACION DE LA ALBUMINA SERICA BOVINA, EN LOS TROFOZOITOS LAVADOS.

B.1.- Obtención del antisuero anti-albúmina sérica bovina.

Se inculó suero bovino a una concentración de 2 mg. por ml., en conejos de 2 Kg. de raza Nueva Zelanda, con adyuvante completo de Freund, por vía intradérmica, cuatro veces durante un mes. A la quinta semana se sangró el conejo y se determinó la presencia de anticuerpos, mediante la prueba de doble difusión en gel de agarosa al 1 por ciento, en presencia del suero que se obtuvo del conejo frente al sue-

ro bovino que se le inoculó.

B.2.- Investigación de la albúmina sérica bovina, en trofozoítos de E. histolytica.

Los trofozoítos fueron lavados 3, 5, 7 y 9 veces, mediante centrifugación con solución amortiguadora de fosfatos inhibidores a pH 7 (SAFIP).

En cada uno de los lavados se investigó la presencia de albúmina sérica bovina, por la prueba de doble difusión en gel de agarosa al uno por ciento, utilizando para ello el suero anti-albúmina sérica bovina.

C.- USO DE MARCADORES RADIOACTIVOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE EXTERNA DE E. histolytica.

C.1.- Radioyodación con  $^{125}\text{I}$ .

El método que se utilizó para marcar radioactivamente las proteínas de superficie externa, con  $^{125}\text{I}$  fue el de la lactoperoxidasa (34, 37), descrito a continuación.

#### PROCEDIMIENTO.

A  $2 \times 10^8$  células viables/ml., que se lavaron nueve, se suspendieron en 3 ml. en solución SAFIP, en seguida se le adicionaron 30.0 ul. de 1.0 uCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (New England Nuclear Corp. Boston Mass.), 30.0 ul. de  $\text{KI } 2 \times 10^{-5} \text{ M.}$ , 20.0 ul. de lactoperoxidasa a una concentración de 2 mg. - por ml. y 10.0 ul. de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03 %, se incubaron durante

2.5 minutos a 4 °C., repitiéndose nuevamente la adición de la lactoperoxidasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubándose también a 4 °C. durante 2.5 minutos. Se detuvo la reacción con la adición de 5 ml. de KI 10<sup>-3</sup> M., en seguida se lavaron las células, con 30 ml. de solución reguladora de fosfatos inhibidores pH 7, tres veces centrifugando a 500 x g., durante tres minutos cada ocasión, el procedimiento necesitó aproximadamente de 40 a 50 minutos.

La viabilidad se determinó nuevamente con azul tripano al 0.2 %, obteniéndose un 97 % de viabilidad. En estas condiciones, la radioyodación fue exclusivamente de las proteínas de superficie externa, de acuerdo a la viabilidad observada.

#### C.2.- Radiosulfonación con <sup>35</sup>S.

El compuesto radioactivo que se utilizó fue, el fenil metionil sulfona uridin monofosfato, marcado con <sup>35</sup>S - (FM<sup>35</sup>SUMP), que se sintetizó en el Instituto de Química de la U.N.A.M., por el Dr. Benjamín Ortiz, de acuerdo a la metodología propuesta por Bretscher (9).

#### PROCEDIMIENTO.

##### C.2.1.- Preparación de soluciones.

Solución reguladora de separación (SAS); se prepararon 44 mM. de NaCl, 57 mM. de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM. de glucosa, en agua destilada, ajustándose a pH 8.

Solución reguladora para marcar radioactivamente (SAM); esta solución se preparó para la unión covalente del compues

to FM<sup>35</sup>SUMP, a las proteínas de superficie. Se prepararon - 50 mM. de H<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>, 23 mM. de KCl, 86 mM. de NaCl, 1 mM. de -- MgSO<sub>4</sub>, 20 mM. de glucosa y se ajustó a pH 9.3 con NaOH 0.5 N.

Solución amortiguadora de dilución (SAD); se disolvieron 5 mM. de KCl, 80 mM. de NaCl, 1 mM. de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM. de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM. de glucosa en agua destilada y se ajustó el pH a 7.4 .

#### PROCEDIMIENTO.

Se tomaron  $2 \times 10^8$  trofozoítos/ml., lavados y comprobada su viabilidad, se resuspendieron en 3 ml. de SAM a 4°C., después se colocaron en un vaso de precipitado de 20 ml. de 8 cm. de diámetro, en donde la suspensión de trofozoítos no alcanzó una altura de 3 mm., para una adecuada oxigenación.

El vaso de 20 ml. se colocó en baño María a 30°C. durante cinco minutos, antes de adicionar el compuesto radioactivo. Al tener la suspensión de trofozoítos la misma temperatura que el baño María, se adicionó el compuesto FM<sup>35</sup>SUMP, dejándose reaccionar durante cinco minutos, después la suspensión se lavó con 40 ml. de SAD a 4°C., mediante centrifugación a 500 x g., durante tres minutos para eliminar el FM<sup>35</sup>SUMP presente, que no reaccionó.

Después se resuspendieron en 1 ml. de SAD y se determinó nuevamente la viabilidad de las células, mediante la técnica de azul tripano, la cual fue de 97 %.

D.- OBTENCION Y SEPARACION DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE DE TROFOZOITOS DE E. histolytica, MARCADAS CON <sup>125</sup>I y <sup>35</sup>S.

D.1.- Adición de inhibidores enzimáticos.

PROCEDIMIENTO.

Se prepararon soluciones de FMSF, EDTA y N-etil maleimida a una concentración de 1 mM., estas soluciones se añadieron a la suspensión de  $2 \times 10^8$  trofozoítos por ml. Se -- adicionó 0.5 ml. de cada uno de los inhibidores a la suspensión de trofozoítos.

D.2.- Homogenización de los trofozoítos.

Los trofozoítos se resuspendieron en 3 ml. de SAR y se fragmentaron las células en un homogenizador Potter-Elvehjem, durante 10 minutos a  $4^{\circ}$  C., utilizando para ello un baño de hielo.

D.3.- Centrifugación diferencial para la separación de las proteínas.

El homogenado se centrifugó a 15, 000 x g., en una -- centrífuga refrigerada SORVAL, durante 15 minutos. En esta primera centrifugación se obtuvo la separación de mitocondrias y partículas de peso molecular alto, al que llamamos precipitado (1); el sobrenadante (1) que se obtuvo fue separado. El precipitado (1) se resuspendió en 5 ml. de SAR y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, obteniéndose así el sobrenadante (2), que se separó del precipitado (2). El sobrenadante (1) se mezcló con el sobrenadante (2).

Utilizando una ultracentrífuga Beckman L-2 65B, la -- mezcla del sobrenadante (1) y (2), se centrifugó a 165 000

x g. durante dos horas, se obtuvo así el precipitado (3), constituido de partículas ribosomales principalmente y en el sobrenadante (3), las partículas solubles que pertenecen a la superficie externa de membrana celular.

E.- PURIFICACION PARCIAL E IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE MARCADAS CON  $^{125}\text{I}$  y  $^{35}\text{S}$ .

E.1.- Concentración de las proteínas de superficie.

PROCEDIMIENTO.

Las proteínas procedentes del sobrenadante (3), fueron concentradas mediante un AMICON, utilizando una membrana de 10 000 X, hasta tener una concentración de 9.5 mg./ml. esta concentración se determinó en un espectrofotómetro - Beckman modelo 26, a 280 nm. Esta concentración fue para las proteínas marcadas con  $^{125}\text{I}$ .

Para las proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$ , se obtuvo una concentración de 0.2 mg./ml.

E.2.- Cromatografía en columna, en Ultrogel ACA-34.

PROCEDIMIENTO.

El Ultrogel ACA-34, distingue pesos moleculares entre 25 000 a 350 000 daltones, esta dextrana fue desaeurada al vacío, con solución amortiguadora de fosfatos salina pH 7, durante dos horas.



Se montaron simultáneamente dos columnas de cromatografía LKB (2117), de igual volumen para ser utilizadas con las proteínas marcadas con el isótopo correspondiente. Se les mantuvo en equilibrio durante dos días con SAFS pH 7.

Se les determinó el volumen vacío con azul dextrana 2 000 al 0.5 por ciento.

Se depositaron las proteínas concentradas por el AMICON, respectivamente en cada columna y se recogieron las fracciones mediante un colector LKB ULTRORAC (2070), a un volumen de 3 ml. de eluyente por cada cinco minutos. Estas fracciones proteicas fueron detectadas por un LKB UVICOR a 280 nm. y registradas por un graficador LKB.

A cada tubo se le determinó la radioactividad de acuerdo a la emisión que tenían. En el caso del isótopo  $^{35}\text{S}$ , se tomó una alícuota de 0.2 ml. de cada tubo y se colocó en frascos Packard de 27 X 60 con tapón de rosca, se le adicionó 10 ml. de líquido centellante INSTAGEL. Se leyó en un aparato Packard para radiaciones beta.

Los tubos que tenían las proteínas marcadas con  $^{125}\text{I}$ , se colocaron en el contador Packard Auto-Gamma 5110 y se leyeron directamente las radiaciones gamma.

### E.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (39).

#### E.3.1.- Preparación de soluciones.

Solución amortiguadora de fosfatos concentrada -- (SAFC); 0.2 M., se ajustó a pH 7.1.

Para ello se pesaron 39 g. de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 10 g. de SDS, esto se llevó a 5 lt., con agua destilada.

Solución reguladora para electrodos (SAE); esta -

solución se preparó con una parte de SAFC, por una parte de agua destilada.

Solución reguladora para el tratamiento de la muestra (SATM); se tomaron 5 ml. de SAFC, 1 ml. de 2-mercapto-etanol y 1 g. de SDS, esto se aforó a 100 ml. con agua destilada.

Solución de acrilamida (SA); se pesaron 22.2 g. de acrilamida (B. DH. Chemical Ltd. England), 0.6 g. de BIS - (B.D.H.), se aforó a 100 ml. con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar, a 4 °C.

Solución de persulfato de amonio (SPA); se pesó 0.150 g. de persulfato de amonio, se disolvieron en 10 ml. con agua destilada, se colocó en un frasco ámbar y se almacenó a 4 °C.

Se preparó azul de bromofenol al 0.25 por ciento (P/V).

Solución fijadora para las proteínas (SFP); se pesaron 57 g. de ácido tricloroacético, 17 g. de ácido sulfosalicílico, se disolvieron en 150 ml. de metanol y se aforó a 350 ml. con agua destilada.

Solución para tinción de proteínas (SFTF); se pesaron 1.25 g. de azul de Coomassie R-250 y se disolvieron en 227 ml. de ácido acético glacial, se filtro a través de papel Whatman No. 1 y se almacenó en un frasco ámbar.

Solución para destenir proteínas (SDF); a 1.5 lt.

de etanol se le adicionaron 500 ml. de ácido acético y se --  
llevó a 5 lt. con agua destilada.

Solución preservativa para las placas de poliacri-  
lamida (SPPP); a 300 ml. de etanol se le adicionaron 100 ml.  
de ácido acético, más 100 ml. de glicerol y se aforó a 1 lt.  
con agua destilada

E.3.2.- Preparación de las placas de poliacrilami-  
da, en SDS al 5 por ciento.

#### PROCEDIMIENTO.

En un matraz de 250 ml. se colocaron 14.9 ml. de agua  
destilada, 53 ml. de AFC, 14 ml. de SA, se agitó durante -  
cinco minutos, después se desaereo durante tres minutos, --  
usando para esto una bomba de vacío, procurando no hacer --  
burbujas, en seguida se adicionaron 3.2 ml. de SPA y 0.1 ml.  
de TEMED, se agitó rápidamente y con ayuda de un embudo y  
una pipeta Pasteur adaptada, se colocó la solución en un --  
molde de vidrio de 24 X 11 cm. Después de haber llenado el  
molde con la solución, se dejó reposar diez minutos a tem-  
peratura ambiente y 15 minutos a 4 °C., al polimerizarse la  
acrilamida, se dejó en una cámara húmeda, para ser usada -  
después de 12 hrs.

E.3.3.- Electroforesis de las proteínas eluidas -  
por cromatografía sobre columna de Ultrogel ACA-34.

#### PROCEDIMIENTO.

La electroforesis se llevó a cabo en un MULTIPHOR LAB (2117). La placa de poliacrilamida se colocó en la cámara de electroforesis LKB, a una temperatura de 4 °C.

Se efectuó un precorrimiento de la placa sin colocar las muestras, durante 30 minutos y a 150 mA.

E.4.- Determinación del peso molecular, en las proteínas de superficie.

#### PROCEDIMIENTO.

Para la determinación del peso molecular se utilizaron dos métodos, la cromatografía en columna y la cromatografía en gel de poliacrilamida.

La cromatografía en columna se basa en el volumen eluido y el tiempo que tarda la proteína en separarse. Se utilizaron proteínas de peso molecular conocido, a una concentración de 2 mg/ml.; catalasa de peso molecular de 240 000, citocromo c de 11 000 y albúmina bovina de 66 000 daltones, para obtener una gráfica que nos permita determinar el peso molecular de nuestras proteínas.

Para la cromatografía en gel de poliacrilamida se utilizaron las mismas proteínas de peso molecular conocido y a la misma concentración.

Los eluidos, así como las proteínas de peso molecular conocido, fueron tratadas con SRTM y a una temperatura de 60 °C., durante 30 minutos, se adicionaron 0.01 ml. de azul de bromofenol al 0.25 %. Después se colocaron en la placa de poliacrilamida y esta en la cámara de electroforesis.

El tiempo de corrimiento de las proteínas fue de 4 hrs a 150 mA. Al finalizar el corrimiento, la placa se colocó -

en una caja metálica, se adicionó SFP y se dejó reaccionar esta solución durante 1.hr., la solución fue separada y en seguida se adicionó STP, dejándola durante 2 hr., se separó y se adicionó SDP, cambiando continuamente esta solución hasta que quedaron solamente las bandas de proteínas teñidas por el colorante.

F.- INVESTIGACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE Entamoeba histolytica, POR INMUNOFLUORESCENCIA.

F.1.- Obtención de los anticuerpos anti-Pico I y anti-Pico II, marcados con  $^{125}\text{I}$  y los anticuerpos del Pico I, marcado con  $^{35}\text{S}$

PROCEDIMIENTO.

Se inocularon conejos Nueva Zelanda de 2 Kg., con las proteínas de los picos eluidos por la columna de Ultrogel - ACA-54, a una concentración de 2 mg./ml. con adyubante completo de Freund, durante cuatro semanas, haciendo una inoculación por semana, a la quinta semana se sangró al conejo para determinar si había anticuerpos presentes en el suero, contra estas proteínas.

F.2.- Técnica de la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

PROCEDIMIENTO.

Se obtuvieron  $1 \times 10^6$  trofozoítos/ml., con las que se llevó a cabo una dilución 1:1 000. Se tomó una gota y se co

loó en portaobjetos, previamente limpio y desengrasado, éste se colocó en una estufa a 37 °C., hasta que se secó la gota. Sobre la gota seca se colocó el suero anti-Pico I, - haciendo lo mismo con el anti-Pico II y el pico marcado con <sup>35</sup>S y un control sin antisuero. Los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda a 37 °C., durante 30 minutos. Después se lavaron con SAFS a pH 7.2, tres veces durante 10 minutos con agitación y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Una vez secos se les colocó el suero fluoresceinado y se dejaron nuevamente en la cámara húmeda, durante 15 minutos a 37 °C. Se lavó nuevamente con agitación y se colocó el azul de Evans al 5 por ciento, durante 20 minutos. Se lavaron las laminillas con agua destilada y se dejaron secar, se les adicionó glicerina al 90 por ciento, libre de fluoresceína. Por último se colocó un cubreobjetos sobre la tinción y se selló el perímetro de éste con barniz.

G.- INVESTIGACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS -  
FRACCIONES DE SUPERFICIE DE Entamoeba histolytica,  
FRENTE A SUBROS DE PACIENTES QUE PRESENTARON ABSCE-  
SO HEPÁTICO AMIBIANO.

G.1.- Técnica de doble difusión en gel de agarosa.

La técnica que se utilizó fue la de doble difusión en gel de agarosa, ésta se preparó con agarosa al 1.5 por ciento, de esta solución se tomaron 3 ml. y se colocaron en un portaobjetos, se dejó que solidificara, después se hicieron cinco perforaciones formando un pentágono y otra en el cen-

tro.

Con ayuda de capilares, se colocaron en cada perforación diferentes antígenos y en el centro el suero proveniente de un paciente que presentó absceso hepático amibiano.

Se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda, durante 48 hrs. a 4 °C.

## G.2.- Técnica de hemaglutinación indirecta.

### PROCEDIMIENTO.

Se sangró a un carnero en la yugular, la sangre se depositó en un frasco conteniendo solución ALSEVER estéril y se almacenó a 4 °C. De esta suspensión se tomaron 2 ml. y se lavaron tres veces con solución salina isotónica (SSI) y se preparó una dilución de esta suspensión al 2 por ciento.

Los antígenos que se usaron para sensibilizar a los globulos rojos de carnero (GRC), fueron los siguientes y a una concentración de 2 mg./ml.

- a) Extracto crudo total de trofozoítos de la cepa H.-1.
- b) Proteínas del Pico I, marcadas con  $^{125}\text{I}$ .
- c) Proteínas del Pico II, marcadas con  $^{125}\text{I}$ .
- d) Proteínas del Pico I, marcadas con  $^{35}\text{S}$ .

Estas proteínas se hicieron reaccionar, con 107 sueros diferentes, de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

### G.2.1.- Preparación de soluciones.

Suero de conejo normal, éste se inactivó a 56 °C., durante 30 minutos, después de absorberse con un volumen igual de GRC empaquetados, en seguida se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

Se almacenó una noche a 4 °C., al transcurrir este tiempo, se centrifugó y se separó el suero de conejo absorbido. Este suero se utilizó para hacer las diluciones del suero problema por último se hizo una dilución de este suero 1:1 000 en SAFS a pH 6.4.

Se preparó una solución de ácido tánico al 1 %, dicha solución se almacenó a 4 °C. y al ser utilizada se hacia una dilución de 1:20 000 para tanizar a los GRC.

Solución amortiguadora de fosfatos salina (SAFS), a pH 6.4 ; se preparó de la siguiente manera:

- a)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a una concentración de 0.15 M.
- b)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a una concentración de 0.15 M.

Se tomaron 62.8 ml. de la solución (a), más 32.4 ml. de la solución (b) y se adicionaron 100 ml. de SSI.

Solución amortiguadora de fosfatos salina pH 7.2, se preparó de la siguiente manera:

- a)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a una concentración de 0.15 M.
- b)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a una concentración de 0.15 M.

Se tomaron 24 ml. de la solución (a), más 76 ml. de la solución (b), además de 100 ml. de SSI.

#### PROCEDIMIENTO.

Se tomaron 3 ml. de la suspensión de GRC al 2 % en



SAFSa pH 7.2 y se mezclaron con 3 ml. de ácido tánico al 1:20 000 después se incubaron a 37 °C., durante 10 minutos en seguida se centrifugó el paquete de GRC a 600 x g., durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante y se lavó con SAFS a pH 6.4 .

El anticuerpo reaccionó con el antígeno unido a los GRC tanizados de la siguiente manera.

Se prepararon los tubos con los siguientes componentes:

Tubo No. 1, se colocaron 4 ml. de SAFS a pH 6.4 más un ml. de antígeno y un ml. de GRC tanizados (tubos problema).

Tubo No. 2, se tomaron 5 ml. de SAFS a pH 6.4 más un ml. de GRC tanizados (tubo control).

Los tubos se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida se lavó el paquete de GRC con SAFS pH 6.4 y se resuspendieron al final con un ml. de SAFS pH 6.4 .

Quedando así una solución al 2 % (con suero de conejo absorbido e inactivado)

Por último se hicieron las diluciones seriadas del suero problema, para determinar el título de anticuerpos presentes, contra cada uno de los antígenos que se utilizaron.

V.- RESULTADOS.

Para la determinación de la albúmina sérica bovina en los trofozoítos, se utilizó la prueba de doble difusión en gel de agarosa, como se muestra en la figura uno.

Fig. No. 1

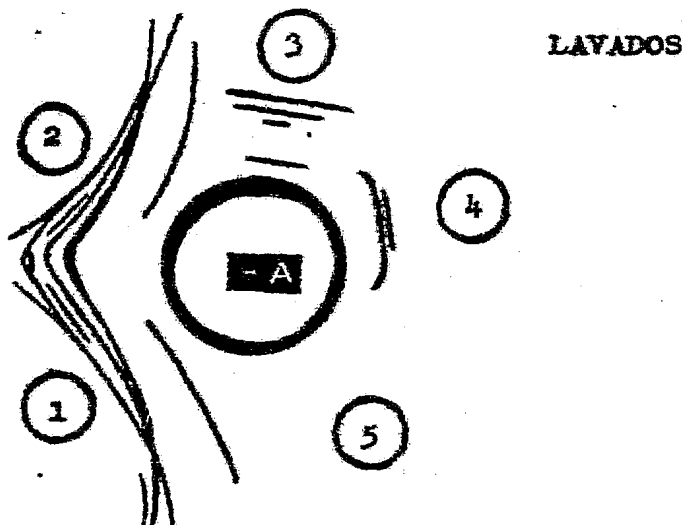


Fig. No. 1 .- Pozo central anti-albúmina sérica bovina (-A), en los pozos periféricos; (1) extracto de trofozoítos homogenizados sin lavar, (2) lavados una vez, (3) lavados 5 veces, (4) lavados 7 veces y (5) lavados 9 veces.

El efecto de los inhibidores de proteasas añadidos a extractos de trofozoítos, se observa en la figura 2.

Fig. No. 2

EXTRACTO DE TROFOZOITOS  
SIN INHIBIDORES



A

EXTRACTO DE TROFOZOITOS  
CON LA MEZCLA DE  
INHIBIDORES



B

Fig. No. 2 .- En el corrimiento (A) por electroforesis en gel de poliacrilamida, la separación de las proteínas no es posible, debido a una desnaturalización de las mismas.

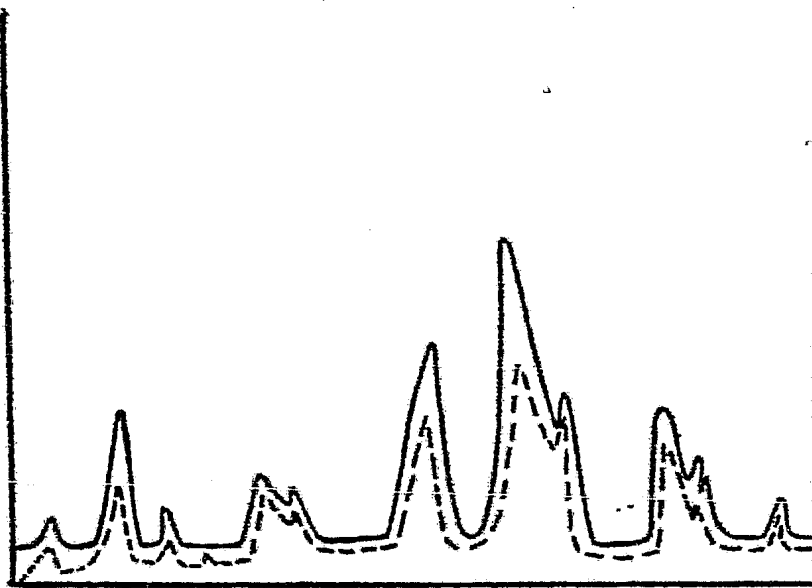
En el corrimiento (B), se le adicionó al extracto de trofozoítos los inhibidores, FMSF, EDTA y N-etil maleimida, observándose la separación de las proteínas.

Otra prueba que se hizo para determinar el efecto de los inhibidores fue, la cromatografía en columna de las proteínas totales de los trofozoítos; previamente marcados con el isótopo correspondiente.

GRAFICA No. 1

ABS. A 280 nm.

RADIOACTIVIDAD



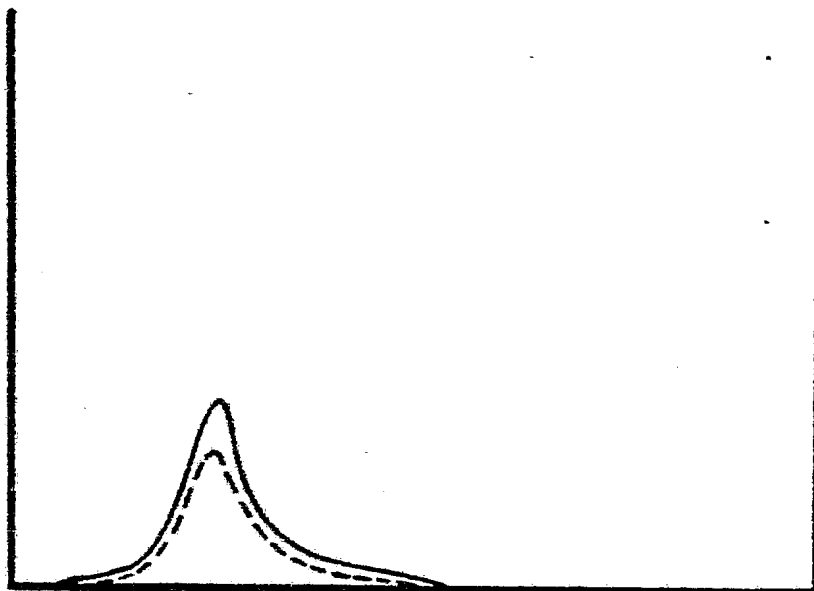
FRACCIONES

Gráfica No. 1 .- Muestra una variedad de picos correspondientes a las proteínas, esta variedad se debió a que no se le adicionó inhibidores a los trofozoítos. La línea continua representa la determinación de las proteínas a 280 nm. y la línea punteada la radioactividad.

GRAFICA No. 2

ABS. A 280 nm.

RADIOACTIVIDAD



Gráfica No. 2 .- Muestra los efectos de los inhibidores sobre las enzimas endógenas de los trofozoítos, principalmente de proteasas. Obteniéndose solamente un sólo pico, como es en el caso de las proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$ . La línea punteada representa la radioactividad y la continua la determinación de las proteínas a 280 nm.

La tabla No. 1, muestra la distribución de la radioac-  
tividad residual, expresada en por ciento de radioactividad.

De los diferentes isótopos que se utilizaron para la  
identificación de las proteínas de superficie.

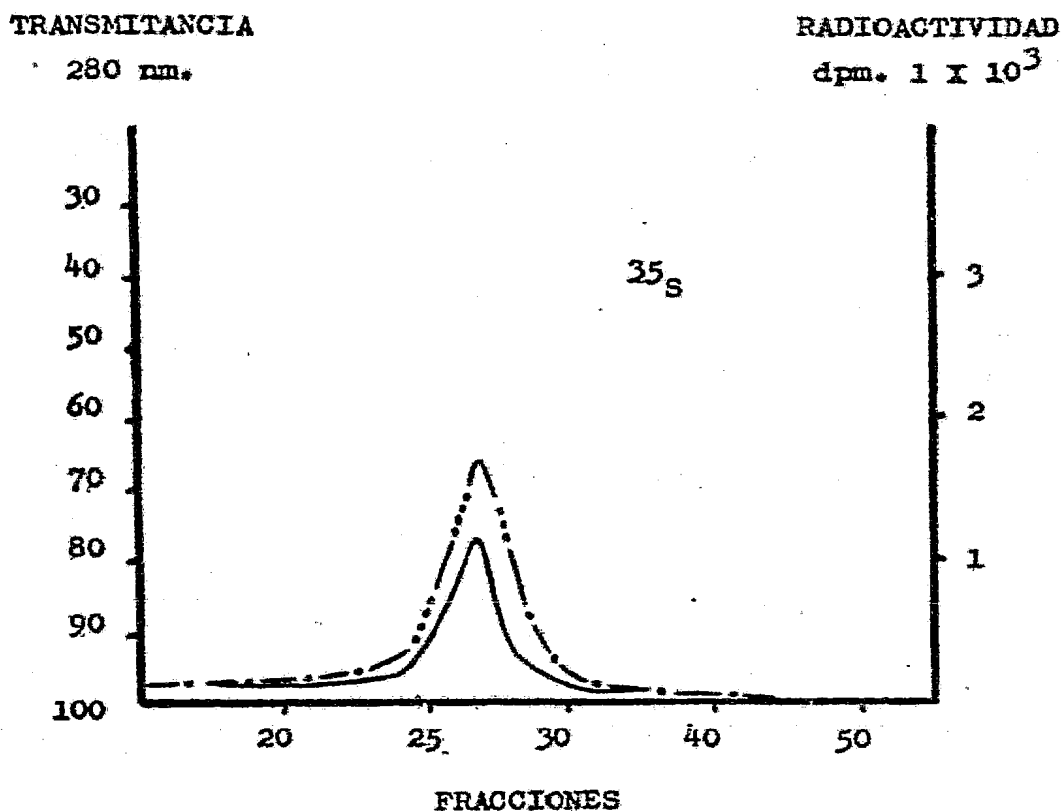
TABLA No. 1

FRACCIONES % DE RADIOACTIVIDAD EN  
CADA FRACCION OBTENIDA.

FRACCIONES	% DE RADIOACTIVIDAD EN CADA FRACCION OBTENIDA.	
	$^{125}\text{I}$	$^{35}\text{S}$
CELULAS HOMOGENIZADAS	100	100
1o. Sobrenadante a 15 000 x g.	71	60
1o. Sedimento a 15 000 x g.	28	37
2o. Sobrenadante a 15 000 x g.	9	5
2o. Sedimento a 15 000 x g.	14	28
Sobrenadantes combinados a 15 000 x g.	79	63
Sobrenadante a 165 000 x g.	67	48
Pico I de exclusión en Ultrogel ACA-34	43	47
Pico II de exclusión en Ultrogel ACA-34	21	0
Eluidos restantes	0	0

La separación de las fracciones proteicas radioactivas, que se obtuvieron en cromatografía en columna se muestran en las gráficas 3 y 4.

GRAFICA No. 3



Gráfica No. 3.- Cromatografía en columna, de las proteínas de membrana, marcadas con el isótopo <sup>35</sup>S, mediante el compuesto FM<sup>35</sup>SUMP. La presencia de las proteínas fue determinada a 280 nm. y la radioactividad fue medida por las emisiones beta, en d.p.m., en un contador Packard.

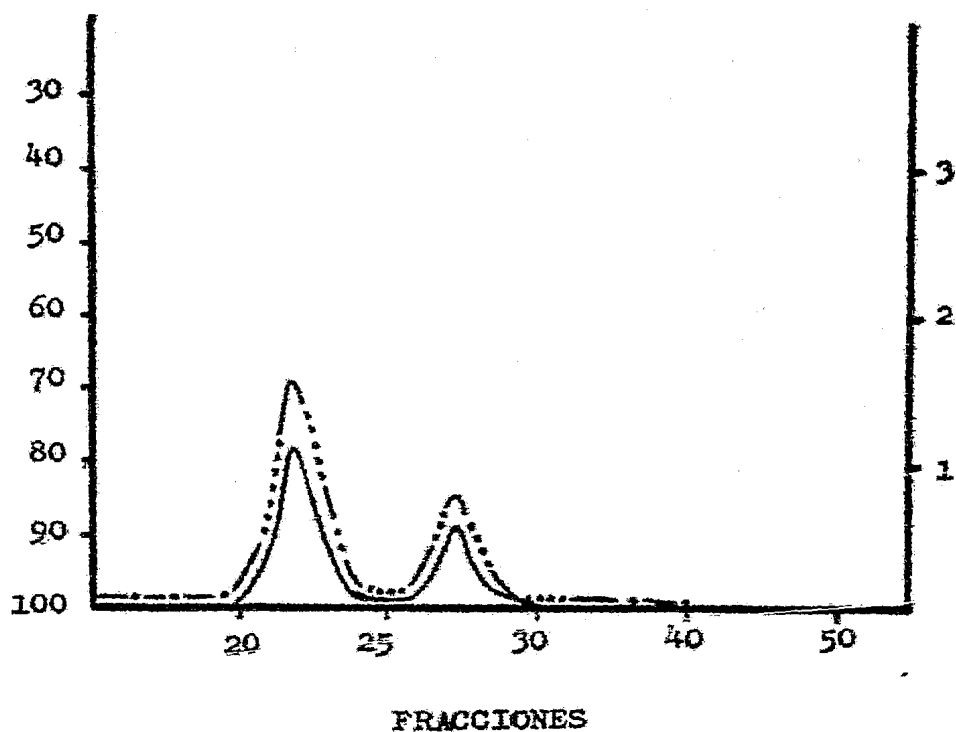
GRAFICA No. 4

TRANSMITANCIA

280 nm.

RADIOACTIVIDAD

dpm.  $1 \times 10^5$



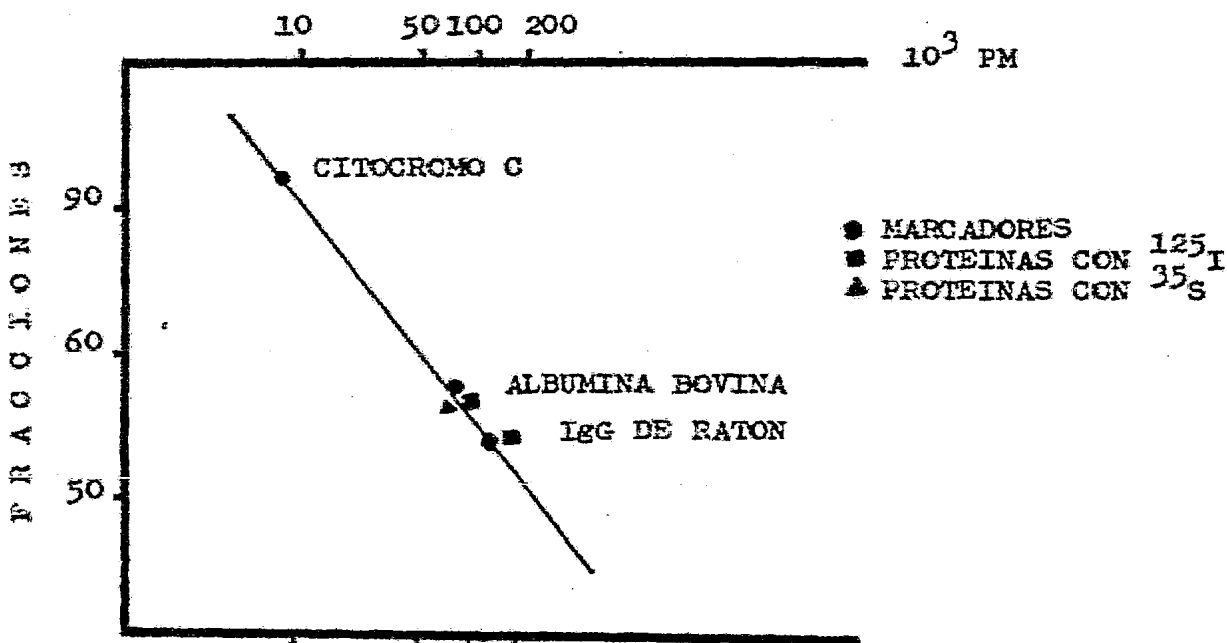
Gráfica No. 4 .- Cromatografía en columna sobre Ultrgel ACA-3<sup>4</sup>, de las proteínas de membrana marcadas con <sup>125</sup>I, mediante la técnica de la lactoperoxidasa. Las proteínas en los eluidos se determinaron a 280 nm. y la radioactividad - en d.p.m., fueron leídas en un contador Auto-Gamma Packard (— radioactividad y --- mg. de proteína)



La determinación del peso molecular de los picos obtenidos por cromatografía en columna, se llevó a cabo mediante dos métodos; por cromatografía en columna en Ultrogel --ACA-34 y por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Utilizando para estos dos métodos, patrones de proteínas de peso molecular conocido, como se muestra en la gráfica NO. 5 y la figura No. 3.

GRAFICA No. 5



Gráfica No. 5.- Muestra la determinación del peso molecular, de las fracciones marcadas con los isótopos radioactivos, obtenidos por cromatografía en columna.

FIGURA No. 3

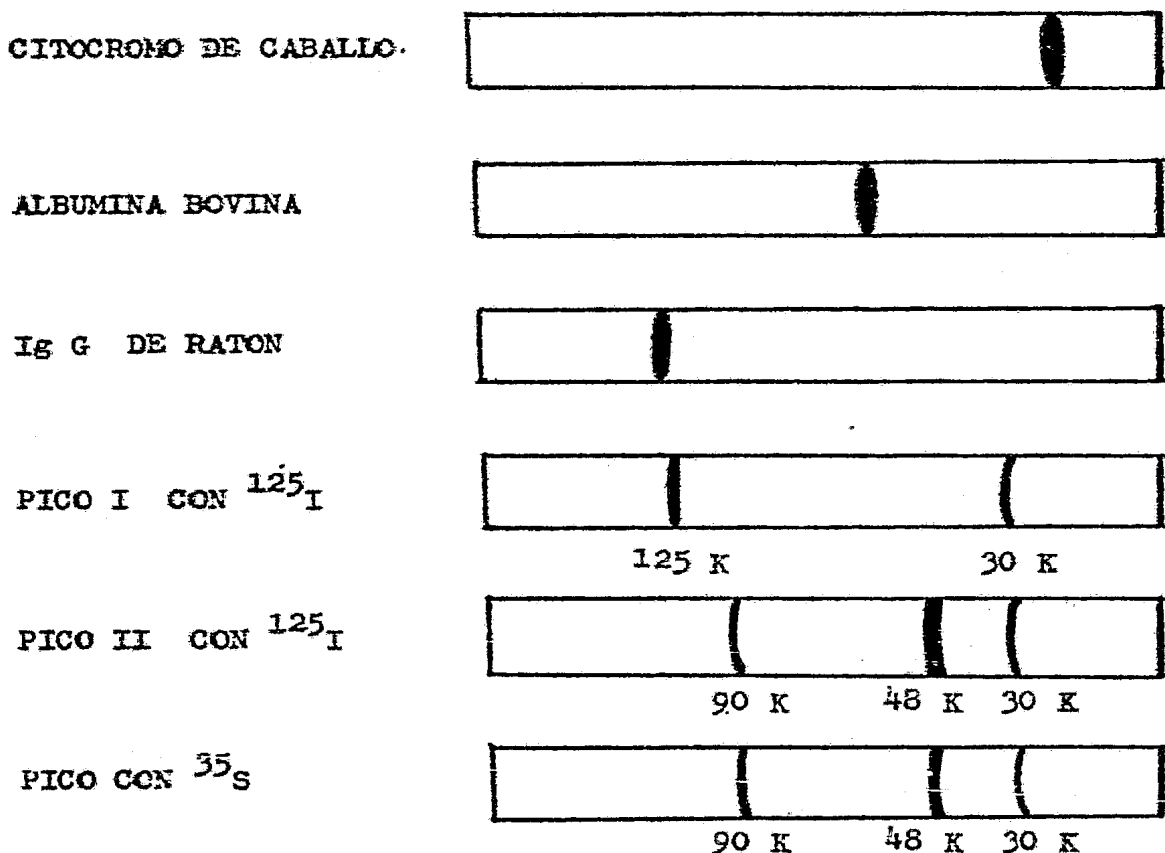


Figura No. 3 .- Detreminación del peso molecular del Pico I , Pico II marcados con  $^{125}\text{I}$  y el pico marcado con  $^{35}\text{S}$ . Los marcadores fueron; citocromo c, con peso molecular de 11 000, albúmina sérica bovina de 68 000 y IgG de ratón de 126 000 daltones.

Las figuras 4 y 5, muestran los resultados obtenidos en la investigación de la actividad biológica de los picos que se obtuvieron por cromatografía en columna, así como - las fracciones que se separaron, durante la extracción de las proteínas solubles de superficie de E. histolytica, -- frente a un suero de paciente con diagnóstico de absceso - hepático amibiano, mediante la técnica de doble difusión - en agarosa.

FIGURA No. 4

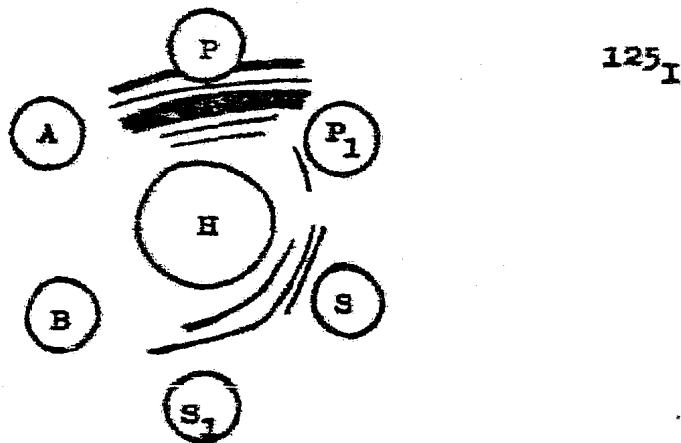


Figura No. 4 .- Muestra la acción de antígenos amibia nos frente a un suero de paciente que presentó absceso hepá tico amibiano. Pozo central suero de paciente (H), (P) pre- cipitado a 15 000 x g., (P<sub>1</sub>) precipitado a 165 000 x g., (S) fracción del Pico I con <sup>125</sup>I, (S<sub>1</sub>) fracción del pico II con <sup>125</sup>I, (A) medio de cultivo y (B) albúmina sérica bovina.

FIGURA No. 5

35g

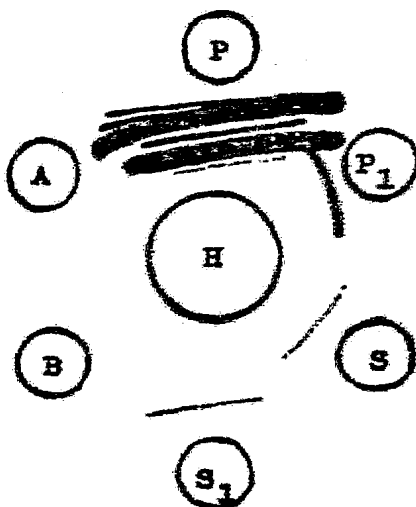


Figura No. 5 .- En el pozo central se colocó suero del paciente que presentó absceso hepático amibiano (H), (P) precipitado a 15 000 x g., (P<sub>1</sub>) precipitado a 165 000 x g., (S) sobrenadante a 165 000 x g., (S<sub>1</sub>) es el pico eluido por cromatografía, (A) medio de cultivo y (B) albúmina sérica bovina.

Las proteínas del Pico I y II, además del que se obtuvo al marcar con  $^{35}\text{S}$ , fueron utilizadas para determinar el título de anticuerpos, contra el suero de paciente con diagnóstico de absceso hepático amibiano. Comparativamente con el título obtenido con un homogenado total de la amiba, mediante la técnica de hemaglutinación pasiva. Los resultados se muestran en la tabla No. 2.

TABLA No. 2

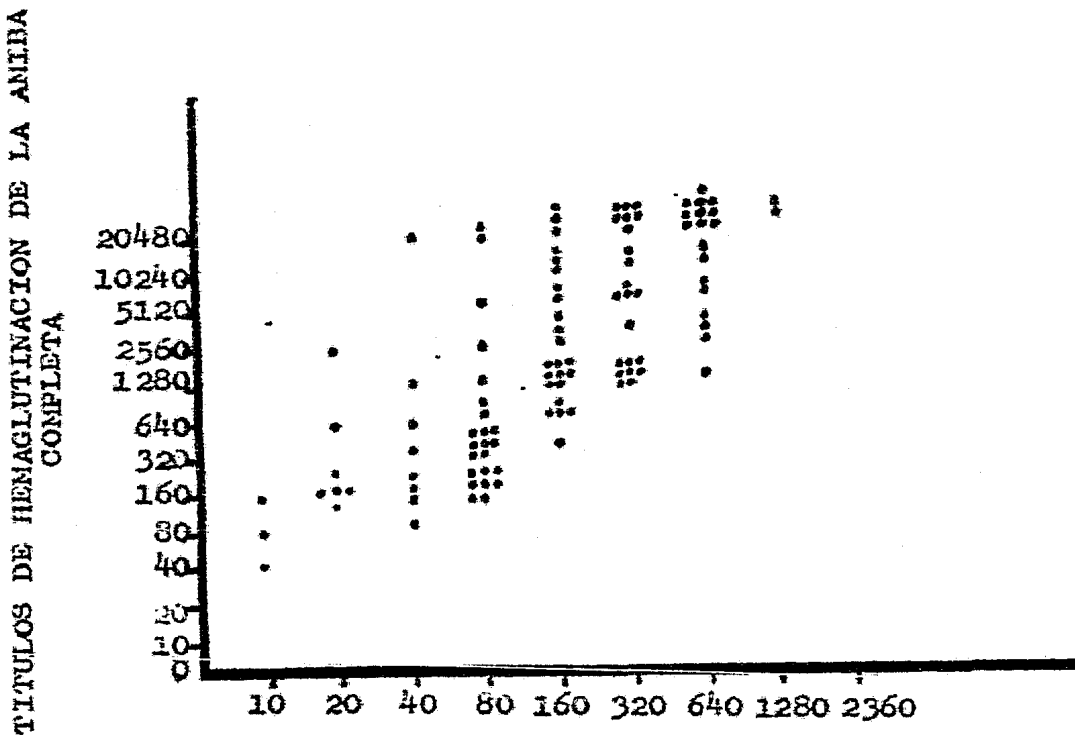
SUERO	TITULO DE LA AMIBA COMPLETA	PICO I	PICO II	PICO $^{35}\text{S}$
1	1:1280	1:160	1:80	1:160
2	1:160	1:40	0	0
3	1:20480	1:320	1:40	1:40
4	1:10240	1:320	1:40	1:40
5	1:160	1:20	0	0
6	1:160	1:10	1:10	1:10
7	1:320	1:80	1:10	1:10
8	1:40	1:10	1:10	1:10
9	1:160	1:20	1:10	1:10
10	1:2560	1:20	0	0
11	1:160	1:20	0	0
12	1:80	1:40	0	0
13	1:1280	1:320	1:80	1:40
14	1:620	1:20	1:10	1:10
15	1:2560	1:80	0	0
16	1:160	1:20	1:10	1:10
17	1:5120	1:620	1:80	1:20
18	1:620	1:160	1:40	1:40
19	1:320	1:80	0	0
20	1:20480	1:320	1:40	1:80
21	1:5120	1:320	1:20	1:20
22	1:2560	1:320	1:20	1:20
23	1:2560	1:640	1:80	1:80

SUERO	TITULO DE LA AMIBA COMPLETA	PICO I	PICO II	PICO <sup>35</sup> S
24	1:20480	1:320	1:80	1:80
25	1:20480	1:1280	1:320	1:320
26	1:1280	1:40	0	0
27	1:20480	1:160	1:40	1:40
28	1:20480	1:640	1:40	1:40
29	1:20480	1:640	1:40	1:40
30	1:20480	1:80	1:10	1:10
31	1:20480	1:40	0	0
32	1:20480	1:80	1:10	1:10
33	1:1280	1:320	1:40	1:40
34	1:160	1:10	0	0
35	1:160	1:40	1:10	1:10
36	1:1280	1:320	1:40	1:40
37	1:320	1:40	0	0
38	1:1280	1:320	1:80	1:80
39	1:1280	1:160	1:20	1:40
40	1:20480	1:320	1:80	1:160
41	1:1280	1:320	1:80	1:80
42	1:20480	1:160	1:160	1:160
43	1:640	1:80	1:40	1:40
44	1:640	1:160	1:40	1:40
45	1:20480	1:160	1:40	1:80
46	1:2560	1:160	1:40	1:40
47	1:160	1:80	0	0
48	1:20480	1:640	1:40	1:40
49	1:5120	1:160	1:80	1:80
50	1:1280	1:320	1:80	1:80
51	1:5120	1:320	1:80	1:80
52	1:20480	1:320	1:40	1:40
53	1:1280	1:80	1:10	1:10
54	1:1280	1:160	1:40	1:40
55	1:1280	1:160	1:40	1:40
56	1:20480	1:640	1:80	1:80
57	1:160	1:80	1:160	1:160
58	1:20480	1:160	0	0
59	1:10240	1:160	1:40	1:40
60	1:1280	1:160	1:160	1:160
61	1:5120	1:320	1:80	1:80
62	1:1280	1:640	1:80	1:160
63	1:5120	1:640	1:80	1:80
64	1:320	1:80	1:80	1:80
65	1:160	1:160	1:20	1:20

SUERO	TITULO DE LA AMIBA COMPLETA	PICO I	PICO II	PICO <sup>35</sup> S
66	1:2560	1:160	1:40	1:40
67	1:160	1:40	0	0
68	1:320	1:180	1:40	1:40
69	1:1280	1:160	1:40	1:40
70	1:80	1:10	0	0
71	1:160	1:20	0	0
72	1:160	1:80	0	0
73	1:320	1:80	1:40	1:40
74	1:160	1:80	0	0
75	1:640	1:160	1:40	1:40
76	1:160	1:80	1:20	1:20
77	1:160	1:80	1:20	1:20
78	1:1280	1:160	1:40	1:80
79	1:10240	1:640	1:40	1:40
80	1:1280	1:160	1:40	1:40
81	1:1280	1:320	1:40	1:40
82	1:10240	1:160	1:20	1:20
83	1:640	1:40	0	0
84	1:5120	1:320	1:20	1:40
85	1:20480	1:2560	1:640	1:640
86	1:640	1:160	1:40	1:40
87	1:20480	1:640	1:40	1:40
88	1:320	1:80	1:10	1:10
89	1:5120	1:160	1:40	1:40
90	1:320	1:80	1:20	1:20
91	1:10240	1:160	1:40	1:40
92	1:320	1:160	1:80	1:80
93	1:20480	1:640	1:80	1:80
94	1:320	1:80	1:40	1:40
95	1:640	1:80	1:40	1:40
96	1:10240	1:640	1:80	1:80
97	1:10240	1:320	1:80	1:80
98	1:20480	1:160	1:40	1:40
99	1:20480	1:160	1:20	1:20
100	1:160	1:80	1:40	1:40
101	1:20480	1:1280	1:640	1:640
102	1:1280	1:320	1:40	1:40
103	1:5120	1:80	0	0
104	1:20480	1:640	1:40	1:40
105	1:2560	1:640	1:40	1:40
106	1:5120	1:640	1:40	1:40
107	1:20480	1:320	1:10	1:10

Las gráficas 5, 6 y 7 son los resultados de los títulos de hemaglutinación, utilizando las proteínas del Pico I, II y el que se marcó con  $^{35}\text{S}$ . En relación a los resultados obtenidos con el antígeno extracto total de amibas, determinados con la técnica de hemaglutinación indirecta.

GRAFICA No. 5

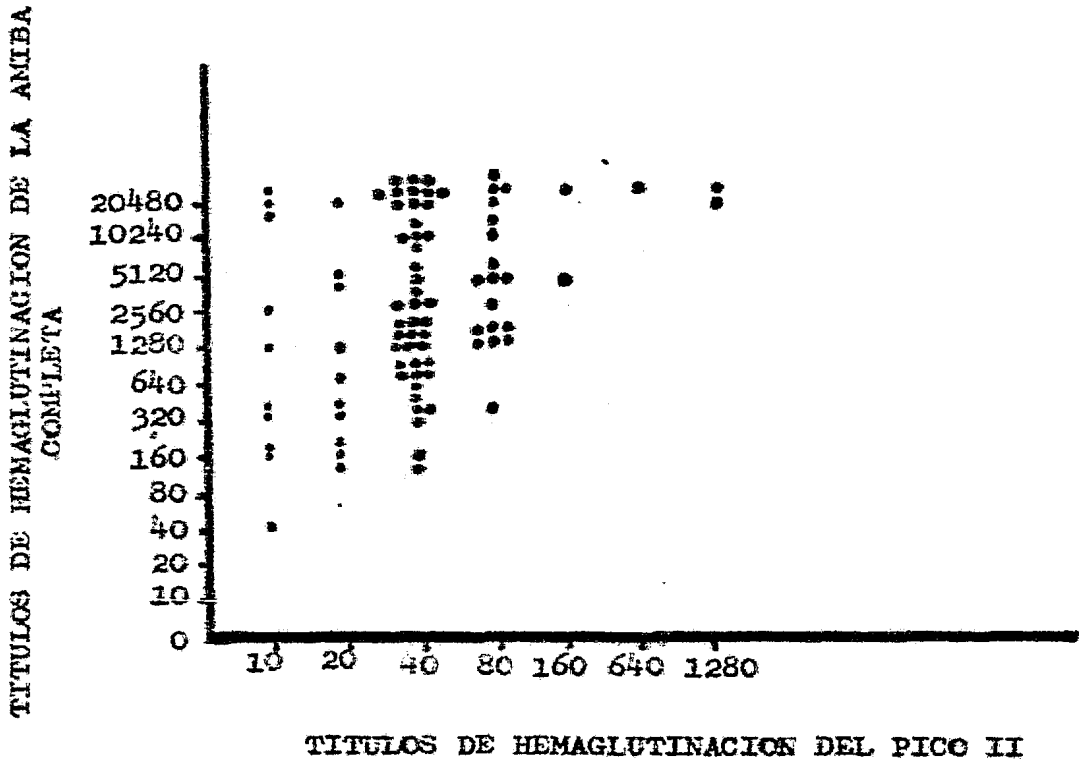


TITULOS DE HEMAGLUTINACION DEL PICO I

Gráfica No. 5.- Globulos rojos de carnero fueron fofrados con proteínas del Pico I y otro paque de GRC, con las proteínas del extracto total de amibas. Se correlacionaron estos títulos de hemaglutinación obtenidos, utilizando sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

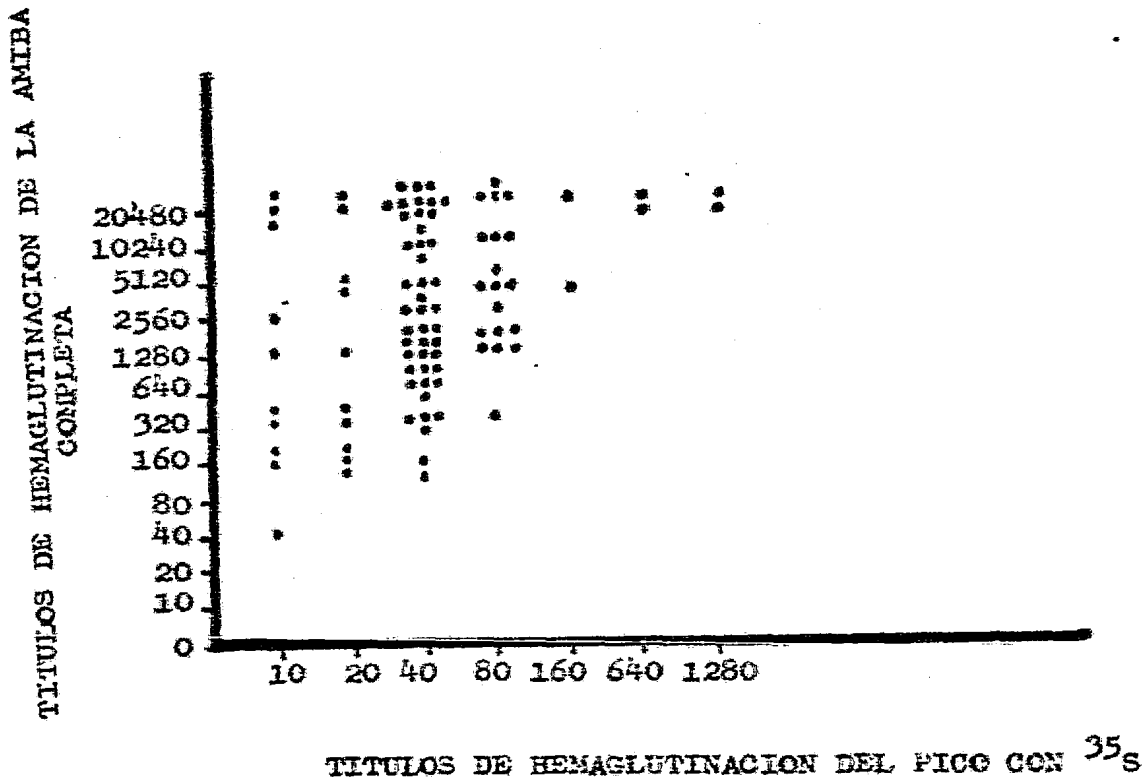


GRAFICA No. 6



Gráfica No. 6 .- Esta gráfica muestra los resultados, de la relación entre las proteínas del Pico II, frente a los títulos obtenidos con el extracto total de trofozoítos.

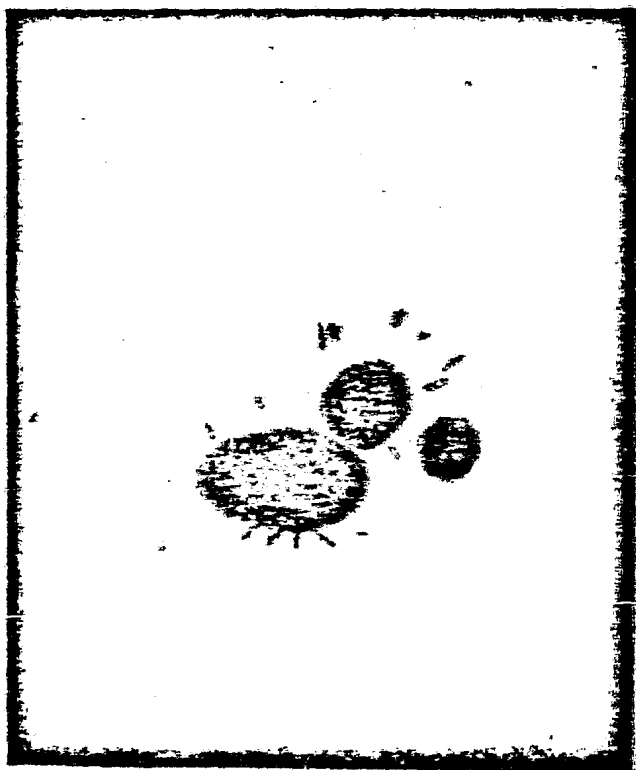
GRAFICA No. 7



Gráfica No. 7 .- Son los resultados entre los títulos obtenidos por hemaglutinación indirecta, del pico marcado con <sup>35</sup>S y el extracto total de trofozoítos.

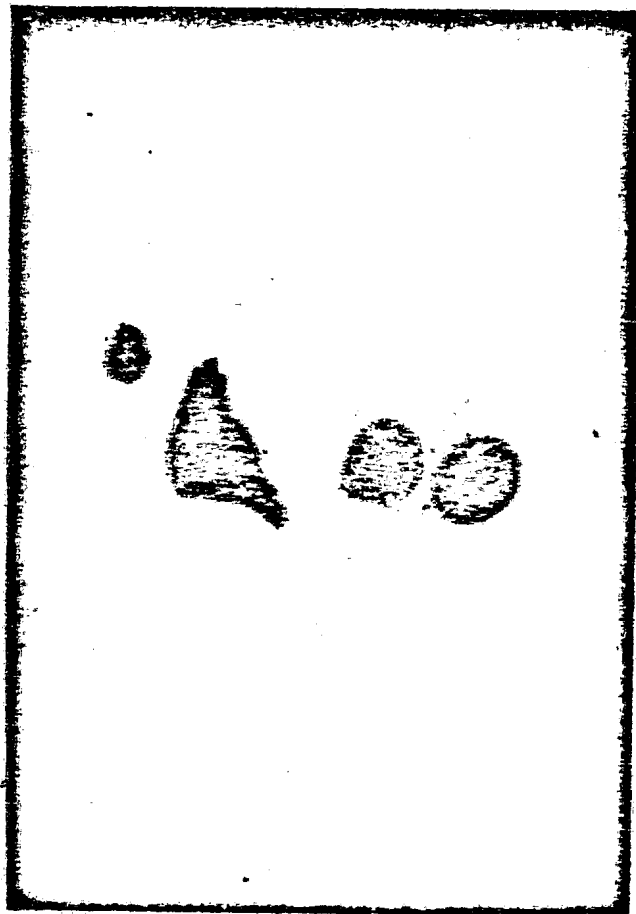
En la fotografía No. 1, muestra la afinidad de los anticuerpos por las proteínas del Pico I marcadas con  $^{125}\text{I}$ , - que están dirigidas hacia la superficie de la membrana del trofozoíto. La técnica que se utilizó fue, inmunofluorescencia indirecta.

FOTOGRAFIA No. 1



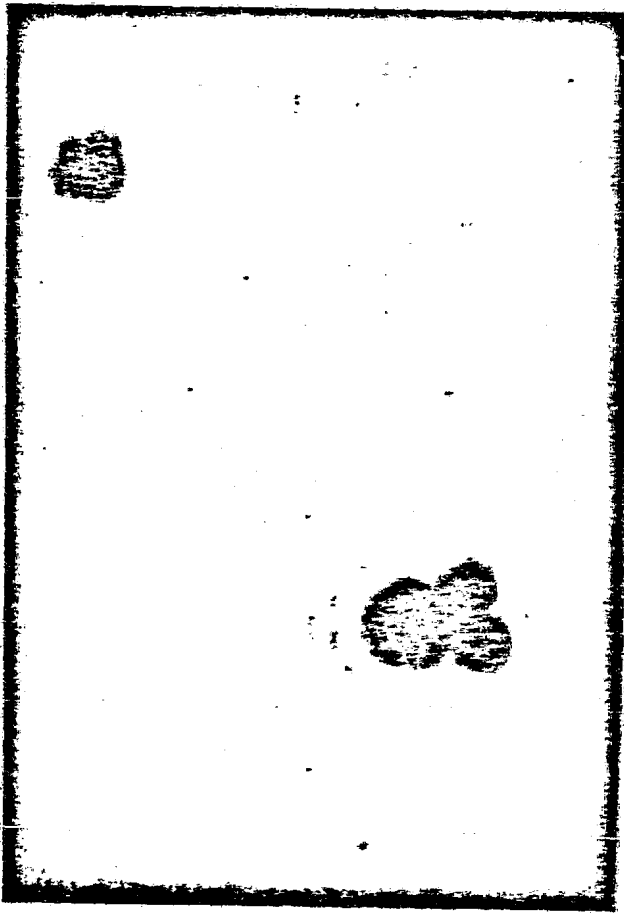
Fotografía No. 1 .- Las proteínas del Pico I, se inocularon a conejos, los anticuerpos obtenidos se incubaron con trofozoitos de la cepa HM-1, durante 30 minutos. Se adicionó después IgG de conejo fluoresceínado y se contrastó con azul de Evans al 0.5 % .

FOTOGRAFIA No. 2



Fotografía No. 2 .- Los anticuerpos que se obtuvieron del Pico II marcados con  $^{125}\text{I}$ , se utilizaron para la investigación de los antígenos de superficie, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La fotografía muestra la unión de estos anticuerpos sobre la superficie del trofozoíto (color amarillo), el colorante de contraste fue, azul de Evans al 0.5 % .

FOTOGRAFIA No. 3



Fotografía No. 3 .- Utilizando los anticuerpos producidos por las proteínas del pico marcado con  $^{35}\text{S}$ , se logró determinar mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que estas proteínas pertenecen a la superficie externa de la membrana del trofozoíto. En la fotografía se observa, la afinidad que tienen ciertos anticuerpos sobre la superficie del trofozoíto.

## VI.- DISCUSION

Durante la separación de los antígenos proteicos de membrana en E. histolytica, se ha observado la adsorción de la albúmina sérica bovina (32), fue por ello que procedimos a lavar exhaustivamente los trofozoítos y detectar esta separación del contaminante, por la técnica de doble difusión en gel de agarosa (39). La separación de este contaminante se efectuó sin lesionar la viabilidad de las células y se logró después de nueve lavados fig. No. 1. Este es un aspecto muy importante, ya que de no tener la seguridad de la separación de este contaminante, podría tomarse como una proteína estructural de membrana externa, al llevar a cabo la separación de ésta última.

Por otra parte, de acuerdo a los estudios realizados por Calderón (1, 40), es necesaria la adición de inhibidores enzimáticos, principalmente de proteasa, que contrarresten la acción de enzimas proteolítica endógenas, que son liberadas durante la homogenización de los trofozoítos, pudiendo desnaturalizar proteínas de membrana externa de la amiba y con esto determinantes antigénicos de la misma. La acción de estos inhibidores se muestran en la fig. No. 2.

Además se hizo cromatografía en columna con Ultrogel ACA-34, que diferencia pesos moleculares entre 25 000 a - 350 000 daltones, de las proteínas totales de la amiba gráficas 1 y 2, llegando a la conclusión de que sin la adición de inhibidores enzimáticos, hay destrucción de las células, trayendo como consecuencia la unión del isótopo radioactivo con las proteínas internas del trofozoíto.

En la identificación de las proteínas de membrana, se utilizó la técnica propuesta por Bretscher (9), cuyo funda-

mento es la unión covalente de los grupos amino libres, de las proteínas básicas al compuesto  $FM^{35}SUMP$ . Comparativamente se utilizó la técnica de radioyodación (34), modificada por Calderón (10). Los dos compuestos radioactivos no atraviesan la membrana citoplasmática y además no alteran la viabilidad de los trofozoítos.

La separación de las proteínas solubles de membrana externa, se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Cross (12), nuestros resultados mostraron que durante la separación de la membrana externa, los antígenos proteicos conservaron su actividad biológica, frente a sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

Si comparamos la unión de los isótopos radioactivos, se observó que con el compuesto  $FM^{35}SUMP$  solamente se obtuvo un pico Tabla No. 1, probablemente se debió a que el reactivo es muy lábil y no alcanza a reaccionar con todas las proteínas, en general con las proteínas básicas presentes (4), ya que se encuentran éstas en concentraciones bajas, como lo muestra la gráfica No. 3.

Por otra parte fue el pico que presentó una antigenicidad biológica débil, frente a los sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano.

Las proteínas de membrana separadas por Calderón (1), mostraron pesos moleculares de 67 000, 60 000, 43 000, -- 24 000 y 18 000 daltones, esta variedad de proteínas comparativamente con los resultados obtenidos por nosotros pueden ser explicados debido a que en la metodología que seguimos solamente se obtuvieron las proteínas solubles de membrana externa, marcadas con los isótopos radioactivos, eliminando así las proteínas que no presentaron radioactividad como se muestra en las gráficas No. 1 y No. 2.

Se investigó la heterogeneidad de los picos obtenidos

por cromatografía en columna, mediante la electroforesis de las proteínas por gel de poliacrilamida; gráfica No. 5. Estos picos presentaron diferentes tipos de proteínas. En el Pico I marcado con  $^{125}\text{I}$ , se obtuvieron proteínas de peso molecular de 30 000 y 125 000 daltones, en el Pico II marcado también con  $^{125}\text{I}$ , se obtuvieron proteínas de 30 000, 48 000 y 90 000 daltones. En el pico marcado con  $^{35}\text{S}$ , se obtuvieron proteínas de 30 000, 48 000 y 90 000 daltones, como se observa en la figura No. 3.

De acuerdo a la identidad de las proteínas del pico marcado con  $^{35}\text{S}$  y el Pico II marcado con  $^{125}\text{I}$ , además de los títulos obtenidos por hemaglutinación pasiva, se piensa que se trate del mismo pico.

En el estudio inmunológico que se llevó a cabo durante la separación de las proteínas, por inmunodifusión en gel de agarosa frente a sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, con esta técnica se observó el reconocimiento de los anticuerpos frente a los antígenos de membrana del trofozoíto, presentando bandas de precipitación definidas, figuras No. 4 y No. 5.

También se hizo la titulación de los sueros de pacientes que se le diagnóstico absceso hepático amibiano, mediante la técnica de hemaglutinación pasiva, utilizando para ello los antígenos de los Picos I, II con  $^{125}\text{I}$  y el pico marcado con  $^{35}\text{S}$ , con el propósito de llevar una correlación de estos títulos, con un extracto total de trofozoítos. Determinando el coeficiente de correlación lineal obtuvimos los siguientes resultados: para el Pico I fue de 0.72, para el Pico II y el pico marcado con  $^{35}\text{S}$ , fue de 0.42.

El resultado para el Pico I de 0.72 es bastante aceptable, lo cual muestra que las proteínas de membrana que separamos juegan un papel importante en la inmunogenicidad -- con respecto a la antigenicidad total de la amiba. El otro



resultado de correlación para los pico I y el marcado con  $^{35}\text{S}$ , aunque es bajo no deja de ser importante, ya que estas proteínas también son reconocidas por algunos sueros.

Para reafirmar que las proteínas que se aislaron pertenecen a la superficie externa de membrana del trofozoíto, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta, como se muestra en las fotografías No. 1, No. 2 y No. 3.

Hemos llegado a la conclusión de que los antígenos de membrana externa de E. histolytica, aisladas y purificadas parcialmente en este estudio, son importantes por ser inmunogénicas de acuerdo a la correlación lineal obtenidas por los picos I, II y el que se marcó con  $^{35}\text{S}$ .

Con esta premisa podríamos más adelante llevar a cabo la separación de las proteínas que se identificaron por -- electroforesis en poliacrilamida, mediante una técnica más sensible, como es la cromatografía por electroenfoque con el fin de llevar a cabo una purificación y que además nos permita obtener todas las proteínas solubles viables y mas adelante determinar el título de cada una de ellas, frente a los diferentes sueros.

Como se ha descrito esta metodología, sólo se ha llevado a cabo con la cepa E. histolytica HM-1, por ser la más patógena. El siguiente paso es llevar la misma metodología utilizando diferentes cepas de amibas, separar las proteínas que sean comunes entre las cepas e investigar el papel que juegan en la inmunidad protectora del huésped (31, 35, 36, 45).

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ACOSTA V., HECTOR, M. LOURDES MUÑOZ Y JESUS CALDERON. "Caracterización de las moléculas de superficie de E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.), 9 (Supl. 1): 183 (1978).
- 2.- ALAM, S.: "Immunogenecity of E. histolytica antigen fraction". Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 68 (1974), 379.
- 3.- ALEY S., B., A. W. SCOTT AND Z. COHN. "Isolation of the plasma membrane of E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx), 10 (Supl. 1): 110 (1979).
- 4.- ALI, K. AND E. MEEROVICH. "Studies on the purification of E. histolytica antigens by gel filtration". I. Microbiology. 16 (1970), 485.
- 5.- ARROYO B., ANGEL, T. A. CARABEZ Y J. H. RUIZ. "Composición de la pared celular de quistes de Entamoeba invadens". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 99 (1978).
- 6.- ARROYO B., ANGEL. Simposio: "Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en hamster lactante". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 311 (1978).
- 7.- BERGQUIST N., R. "Membrane dynamics of E. histolytica and Giardia lamblia, studied with reflection contrast microscopy and the carbon immunoassay". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 95 (1982).
- 8.- BOURGUIGNON L., Y., K. TOKUYASU AND S. JINGER. "The campping of lymphocytes and others cells studied by an improved method for immunofluorescence staining of frozen sections".

J. Cell. Physiol. 95 (1978), 239.

9.- BRETSCHER M., S. "Human erythrocyte membranes specific labelling of surface proteins". J. Molecular Biology. 58 - (1971), 775.

10.- CALDERON, J., M. LOURDES NUÑOZ AND M. ACOSTA. "Surface redistribution and release of antibody induce cape in Entamoeba? J. Exp. Med. 151 (1980), 184.

11.- CLUSEN, J. "Immunochemical techniques for the identification and estimation for macromolecules". Laboratory Techniques in Bioch. and Mol. Biol. Amsterdam and London; North-Holland. 1 (1969).

12.- CROSS M., G. "Identification, purification and properties of clone-specific glycoproteins antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei". Parasitology 71 - (1975), 393.

13.- CROXTON E., F. Elementary Statistic with Applications in Medicine and Biological Sciences. Dover Publications, Inc. New York, 1969.

14.- DAVID G., S. "Solid state lactoperoxidase: A highly -- stable enzyme for simple gentle iodination of proteins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 48 (1972), 464.

15.- DAVID, S. AND LESLIE H. "Trypanosoma cruzi cell surface proteins identification of one major glycoproteins". Febs. Letters. 1 (1979), 100.

16.- DE LA TORRE, M., L. LANDA AND BERNARDO SEPULVEDA. "Avance en los métodos en el cultivo de T. histolytica". Arch. - Invest. Méd. (Méx.), 1 (Supl. 1): 14 (1970).

17.- DIAMOND L., S. "Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica like amoebae". J. Parasit. 54 (1968), 1047.

18.- DWANE E., W., H. DAMSKY AND A. CLAYTON. "Studies on the function of cell surface glycoproteins". J. Cell Biology. 80 (1979), 385.

19.- ELDSON D., R. "The epidemiology of amoebiasis". Adnan in Parasitology. 6 (1968), 62.

20.- GOLDMAN, M. AND L. CANNON. "Antigenic analysis of E. histolytica by means of fluorescent antibody V. comparison of 15 strains of entamoeba with information of their pathogenicity to guinea pigs". Amer. Trop. Med. Hyg. 16 (1967), 245.

21.- GARCIA-TAMAYO, F., BERTHA HASHIMOTO-YANEZ Y JESUS KUMATE. "Proteínas propias y del medio de cultivo en los trofozoítos de E. histolytica obtenidos axénicamente". Arch. Invest. Méd. (Méx.), 11 (Supl. 1): 159 (1980).

22.- GUTIERREZ G., T. Manual de infectología, 6a. Ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México. 56 (1978), 65.

23.- HASHIMOTO-YANEZ, B., FERNANDO GARCIA-TAMAYO Y JESUS KUMATE. "Anticuerpos anti-albúmina bovina en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano". Arch. Invest. Méd. (Méx.), 11 (Supl. 1): 229 (1980).

24.- ISIBASI, A., SANCHEZ, M., FERNANDO GARCIA Y JESUS KUMATE. "Serología con polisacárido de E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 285 (1978).

- 25.- ISIBASI, A., M. CRUZ, ANTONIO RAMIREZ Y JESUS KUMATE. "Inmunquímica de una lipopéptidofesfoglicana extraída de trofozoítos de la cepa HK-9, cultivada en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua". Arch. Invest. Méd. -- (Méx.) 13 (Supl. 3): 51 (1982).
- 26.- JOHNSON, G., J. MOLBOROW AND J. DORLING. "Immunofluorescent and immunoenzimatic techniques. In. Handbook of Experimental Immunology". D. M. Weir, editor. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford. 15 (1978), 11.
- 27.- JULIANO R., L. AND M. BEJAR-BAUNIELER. "An evaluation of technique for labelling the surface proteins of culture mamalian cells". Biochem. et Biophysic, Acta 375 (1975), 249.
- 28.- KAZUYASU, N., AHIKO U., N. SHIGEO AND N. YASUHARU. -- "Proteins exposed on the outer surface of the plasma membrane of AH-66 hepatoma ascites cells". J. Biochem. 85 (1979) 183.
- 29.- KEVIN, P. AND M. FREDERIC. "Chemical cross-linking: Reagents and problems is studies of membrane extructure". Ann. Rev. Biochem. 46 (1977), 523.
- 30.- KESSEL J., F., W. LEWIS, P. MOLINA AND J. TURNER. -- "Indirect hemaglutination and complement fixation test in amibiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14 (1965), 540.
- 31.- ORTIZ-ORTIZ, L. Simposio: "Inducción de la inmunidad protectora antiambiiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 351 - (1978).
- 32.- ORTIZ O., L., R. N. CAPIN, G. RUTH Y G. ZAMACONA. "Un nuevo método de hemaglutinación para determinar anticuer--

- pes contra E. histolytica." Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 -- (Supl. 1): 351 (1978).
- 33.- MAIZEL J., V., Jr. "Polyacrilamide in electrophoresis of viral proteins". Methods in Virology. 5 (1971), 179.
- 34.- MARCHALONIS J., J., R. CONE AND V. SANTER. "Enzymatic iodination a probe for accesible proteins of normal and neoplastic lymphocytes". Biochem. J. 124 (1971), 921.
- 35.- MARTINEZ-PALOMO, A. Simposio: "Inducción de inmunidad protectora antiambiiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 321 - (1978).
- 36.- MENDOZA J., L., L. ARCOS, L. O. ORTIZ Y L. L. DIAZ . "Protein biosynthesis by E. histolytica in culture". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 71 (1982).
- 37.- MORRISON, M. AND B. G. SISCO. "Catalysis of iodination by lactoperoxidase". Biochemistry. 9 (1970), 2995.
- 38.- NOYA, G., L. WARREN AND R. DOLD. "Serum proteins in the plasma membrane of E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11 (Supl. 1): 109 (1980).
- 39.- OUCHTERLONY, O. Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Ann. Arbor: Science, 1968.
- 40.- MUÑOZ M., L., HECTOR ACOSTA AND JESUS CALDERON. "Redistribution of antigen the surface on E. histolytica and -- their characterization immunochemistry". Arch Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 183 (1978).
- 41.- PAPERMASTER D., S., B. SCHNEIDER AND M. ZORN. "Immuno-

- 42.- PARKHAUSE, M., M. CID Y JESUS CALDERON. "Identificación de antígenos de membrana de E. histolytica en pacientes con amebiasis". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 211 (1978).
- 43.- PARKHAUSE R., M., M. PHILIFF, B. OGILVE. Changing surfaces on parasit nematodes. VII International Bioph. Congress and III Pan-American Biochem. Congress. General Simposia. Méx., D.F. 1981.
- 44.- REVILLA L., R. Y V. NAVARRO. "Comparación de aminoácidos en las proteínas totales de dos cepas de E. histolytica en cultivo axénico". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 129 (1978).
- 45.- SANCHEZ M., N., FERNANDO GARCIA Y JESUS AUMATE. "Inmunológica de proteínas inmunógenas de E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9 (Supl. 1): 149 (1978).
- 46.- SHIGEO, N., KAZUYASU N. AND Y. NAKAMURA. "Isolation and partial characterization of the major glycoproteins from the membrane plasma of AH-66 hepatoma cells". Biochem. et Biophys. Acta, 579 (1979), 88.
- 47.- SULLIVAN LOPEZ, FRED J., F. MENDOZA Y LIBRADO ORTIZ. "Anticuerpos monoclonales contra E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 295 (1982).
- 48.- SAWHNEY, S., P. CHAKRAVATI P. AND V. VINAYAN. "Immunogenicity of axenic E. histolytica antigen and its fractions". Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. Hys. 6 (1979), 356.
- 49.- TRUJILLO, J., E. SIGOVIA AND S. GALLEGOS. "Detección a largo plazo de anticuerpos antiamebianos por contraimmune-

electroforesis y hemaglutinación indirecta". Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13 (Supl. 3): 311 (1982).

50.- WALTER P., S., P. SMITH AND BERNARD D. "Extracellular labelling of growing secreted polypeptide chains Bacillus subtilis with Diaziodosulfanilic Acid". Biochem. 18 (1979), 188.