



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

Estudio por Inmunofluorescencia de la Interacción de *E. Histolytica* con Anticuerpos Monoclonales



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ARACELI BEATRIZ NAVARRETE ALONSO
MEXICO D.F., 1986.



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 está 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

	Pag.
LISTA DE FIGURAS	i
ABREVIATURAS	ii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
1.- <u>E. histolytica</u>	2
Generalidades	2
Taxonomía	2
Ciclo biológico	2
Quista	3
Trofozoito	3
Factores de virulencia	3
Inmunidad	4
2.- <u>Anticuerpos monoclonales</u>	5
III. ANTECEDENTES	7
IV. OBJETIVOS	10
V. MATERIAL	11
VI. METODOS	13
Cultivo de <u>E. histolytica</u> , <u>E. invadens</u> , Laredo y -	
<u>E. moshkovskii</u>	13
Obtención de eritrocitos de conejo	13
Preparación de la fracción de Ig G	14
Conjugación de Ig G a isotiocianato de fluoresceína.	15
Estudio de la reactividad de anticuerpos monoclonales por inmunofluorescencia indirecta en amibas fijadas en suspensión	16

Alteración de la distribución topográfica inducida- por fagocitosis	17
Inducción de "capping" con suero inmune de conejo y análisis por inmunofluorescencia indirecta	18
VII. RESULTADOS	19
a) Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para el análisis de <u>E. histolytica</u>	19
Fijación	19
Disminución de autofluorescencia	23
Determinación de la concentración óptima de anti- cuerpos	23
Tiempo de incubación con ligandos	23
Período de observación de las preparaciones	23
b) Localización topográfica de antígenos de mem -- brana en <u>E. histolytica</u> utilizando anticuer- pos monoclonales	24
c) Distribución heterogénea en el contenido de anti- genos de superficie en las poblaciones de <u>Enta- moeba histolytica</u>	24
d) Estudio de la reactividad de anticuerpos monoclo- nales anti- <u>E. histolytica</u> con otras especies de <u>Entamoeba</u>	33
e) Alteración de la distribución topográfica indu- cida por fagocitosis	33
f) Inducción de "capping" por suero inmune	38
VIII. DISCUSION	41

IX. CONCLUSIONES	44
X. BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfología de trofozoitos fijados con diferentes soluciones fijadoras	21
Figura 2	Trofozoitos fijados con glutaraldehído ...	22
Figura 3	Topografía de antígenos de superficie definidos por anticuerpos monoclonales en <u>E. histolytica</u> HM1:IMSS	24
Figura 4	Localización topográfica de antígenos de membrana en trofozoitos de <u>E. histolytica</u> cepa HK9	28
Figura 5	Frecuencia de tinción con la cepa HM1:IMSS de <u>E. histolytica</u>	30
Figura 6	Distribución de frecuencia de los patrones de tinción mostrados por anticuerpos monoclonales en <u>E. histolytica</u> HK9	32
Figura 7	Reactividad de anticuerpos monoclonales anti- <u>E. histolytica</u> con otras especies de <u>Entamoeba</u>	35
Figura 8	Alteración de la distribución de antígenos de superficie, inducida por fagocitosis ..	37
Figura 9	Inducción de "capping" empleando suero inmune de conejo	40

ABREVIATURAS

Ac. (s)	anticuerpo (s)
Ac. Mo. (s)	anticuerpo monoclonal (s)
AF	amortiguador fosfatos ácido y básico de potasio 100 mM, pH 7.2
AFS	amortiguador fosfatos ácido y básico de potasio 15 mM, pH 7.0 y Cloruro - de sodio 154 mM
AFS-A	amortiguador fosfatos ácido y básico de potasio 15 mM, pH 7.0 y Cloruro - de sodio 175 mM
AVS-A	amortiguador ácido barbitúrico-barbi- turato de sodio 17 mM, pH 7.2; NaCl - 175mM, MgCl ₂ ·6H ₂ O 2.4 mM y CaCl ₂ ·2H ₂ O 3.7 mM
BSA	albúmina sérica bovina
FA-GA	formaldehído-glutaraldehído
PFA-GA	paraformaldehído-glutaraldehído
GARG-FITC	inmunoglobulina G de chivo anti-immuno- globulina de conejo, conjugada con fluo- resceína
GAMG-FITC	inmunoglobulina G de chivo anti-immuno- globulina de ratón, conjugada con fluo- resceína
Ig	inmunoglobulina
pFDA	p-fenilendiamina

I. RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue: definir la distribución topográfica de los antígenos reconocidos por diferentes anticuerpos monoclonales, determinar si existía reactividad cruzada de los monoclonales con otras especies de Entamoeba, inducir fagocitosis y analizar el patrón de tinción de algunos monoclonales tratando de definir si la localización de los antígenos superficiales se alteraba después de dicho proceso. Se estandarizó la inducción de redistribución de antígenos superficiales (capping) utilizando suero inmune, para posteriormente aplicarlo al estudio de moléculas de superficie empleando anticuerpos monoclonales.

Se analizaron 8 anticuerpos monoclonales, los cuales mostraron reactividad con la membrana plasmática de E. histolytica, definiendo 3 patrones diferentes de distribución topográfica. Uno de los 8 anticuerpos reaccionó con E. histolytica, únicamente cuando los trofozoitos fueron permeabilizados.

Dos anticuerpos mostraron dos patrones de reconocimiento, excluyentes entre sí, sobre la población celular.

Los resultados sugieren que algunas moléculas de la membrana plasmática de E. histolytica se encuentran distribuidas naturalmente de manera heterogénea, algunas presentando características topográficas bien definidas y, aunque solo sea respecto al contenido y distribución de algunos antígenos, la población de E. histolytica está constituida por diferentes subpoblaciones.

Ninguno de los 8 anticuerpos mostró reactividad cruzada con otras especies de Entamoeba, lo cual indica que son especie-específicos.

Sólo un anticuerpo sufrió trastornos en su distribución topográfica después de la fagocitosis, sugiriendo que posiblemente esta implicado en este proceso.

Fue posible inducir redistribución de moléculas de superficie utilizando una capa simple de anticuerpos poliespecíficos en concentraciones elevadas.

II. INTRODUCCION

1.- E. histolytica

Generalidades

La amibiasis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoario Entamoeba histolytica. En algunos casos este parásito vive como comensal en el lumen del intestino sin causar daño aparente (amibiasis asintomática), sin embargo, por mecanismos no bien establecidos puede llegar a invadir la mucosa intestinal produciendo disenteria (amibiasis intestinal) e incluso diseminarse a otros órganos como el hígado (amibiasis invasiva).

Este parásito fué encontrado por primera vez por Losch en 1875, en un paciente que sufría disenteria crónica asociada con la presencia de amibas en las heces. Fué hasta 1887 que Kartulis demostró el papel patógeno de las amibas y describió la existencia de lesiones hepáticas amibianas.

La amibiasis es uno de los problemas de salud más serios que afecta a nuestro país, debido a su elevada frecuencia y al alto índice de mortalidad que ocasiona; sin embargo, no solamente es un problema nacional sino cosmopolita, ya que aproximadamente el 10% de la población mundial se encuentra infectada por este parásito (1) y un 15% de estos padece amibiasis invasiva (2).

La situación en México es muy seria, ya que últimamente la población rural ha migrado hacia las zonas urbanas en donde viven bajo condiciones que favorecen el ataque por E. histolytica, como son: hacinamiento, malnutrición y hábitos higiénicos inadecuados. Esto se demuestra claramente en un estudio realizado en 46 comunidades mexicanas, en donde se encontró que el 5.95% de los pacientes presentaba anticuerpos contra E. histolytica, lo cual pone de manifiesto el carácter endémico de la enfermedad. Dicho estudio mostró una frecuencia más elevada en niños entre 5 y 10 años de edad (3).

Taxonomía

La E. histolytica pertenece al género Entamoeba de la clase Rizopoda. Este género agrupa a un gran número de especies parasitarias, dentro de las cuales E. histolytica es la más importante desde el punto de vista clínico.

Ciclo biológico

El ciclo biológico de la amiba es muy simple. El quiste formado en el intestino grueso es expulsado con las heces, al ser ingerido por un nuevo huésped, se desenquista a nivel del intestino delgado y libera una amiba metaquistica

tetranucleada, que tras sufrir una división nuclear, produce ocho amibas uninucleadas (trofozoitos), estas pasan al intestino grueso en donde pueden permanecer en estado de comensal o penetrar la mucosa intestinal y alcanzar el hígado (amibiiasis invasiva).

Quiste

Los quistes son cuerpos redondos u ovoides, con una rígida cubierta de quitina. Los estadios maduros son la forma infectiva, presentan cuatro núcleos pequeños a diferencia de los inmaduros que solo presentan un núcleo que abarca casi la tercera parte del citoplasma.

Trofozoito

El trofozoito es la forma vegetativa del parásito y la menos resistente, es una célula sumamente dinámica y pleomórfica, su forma y movilidad son muy susceptibles a los cambios en el medio ambiente fisicoquímico; entre sus características más notables se encuentran: su elevada capacidad fagocítica y pinocítica, su capacidad de adherencia y su movilidad continua por la emisión de pseudópodos.

Factores de Virulencia

Los mecanismos citopatogénicos de E. histolytica son aun desconocidos, entre los factores que correlacionan con su patogenicidad se encuentran: la capacidad eritrofagocítica (4), la susceptibilidad a ser aglutinada por concanavalina A y la carga eléctrica de su superficie (5). Estas dos últimas observaciones sugieren que las cepas patógenas son estructuralmente diferentes de las no patógenas.

Se ha investigado la secreción de enzimas líticas como medios de diseminación del parásito y ha podido detectarse una actividad de colagenasa en trofozoitos de E. histolytica, la cual se ha propuesto que juega un papel importante en el proceso de invasión tisular (6).

Han sido realizados algunos estudios en un intento por definir si en E. histolytica existen toxinas como las encontradas en ciertas bacterias (Clostridium botulinum, Cl. tetani, etcétera). Se ha demostrado que los sonicados de trofozoitos presentan componentes que resultan tóxicos para eritrocitos de mamífero. Bos y col. (7) y Lushbaugh y col. (8) aislaron una toxina intracelular de trofozoitos de E. histolytica cultivados axénicamente, encontrando que la actividad citotóxica estuvo restringida a proteínas en un rango de peso molecular de 25,000 a 35,000 daltones y a concentraciones de proteína tan pequeñas como 2-4 ug/ml; no obstante el papel patógeno de la toxina permanece incierto.

La virulencia de las cepas patógenas de E. histolytica puede variar con algunas condiciones de cultivo, como:

a) asociación con bacterias (9) o protozoarios, proceso que no ha sido del todo comprendido, pues por un lado las bacterias pueden impedir el contacto y la adherencia de los trofozoitos a la superficie de las células del epitelio intestinal, formando una capa continua que recubre la mucosa ; y por otra parte, pueden proveer directa o indirectamente a través de la ruptura de componentes extracelulares , ciertos nutrientes , incluyendo el hierro, necesarios para el crecimiento de las amibas en el intestino.

b) número de subcultivos: en relación a este punto se sabe que el cultivo axénico prolongado de E. histolytica, ha producido una pérdida invariable de la virulencia (10). Se ha demostrado que el pasaje seriado de cultivos amibianos, a través del hígado de hámsters, produce una recuperación en la virulencia de los cultivos axénicos (11).

c) adición de colesterol al medio de cultivo, y d) pasaje seriado en animales experimentales : respecto a estos puntos se ha demostrado que la virulencia de amibas que perdieron su patogenicidad por cultivo prolongado, puede ser restaurada por la adición de colesterol al medio, estableciéndose un grado aún mayor de virulencia por pasajes sucesivos a través del hígado de hámsters (12).

Inmunidad

La respuesta inmune humoral en la amibiasis, se caracteriza por la pronta aparición de anticuerpos circulantes específicos, principalmente de la clase Ig G subclase 2. Los niveles de Ig A están frecuentemente elevados en el suero de pacientes con absceso hepático amibiano, aunque en menor proporción que aquellos de Ig G.

El sistema del complemento es otro mecanismo que participa en la defensa contra E. histolytica. El suero humano sin anticuerpos anti-amiba detectables, puede inducir lisis de aproximadamente el 49% de la población celular cuando se usa en dilución 1:3. Bajo estas condiciones, se ha demostrado que el proceso de lisis es dependiente del complemento, activado por vía alterna (13, 14). Otro ejemplo de la participación del complemento se muestra en un estudio realizado en hámsters, que fueron depletados de complemento con factor de veneno de cobra (proteína análoga a C_{3b} que activa el complemento por vía alterna), se encontró que cuando a estos animales se les inoculaban amibas virulentas, las lesiones hepáticas producidas eran más severas (15).

Se ha observado que algunos trofozoitos se vuelven resistentes a la lisis por complemento si son tratados

constantemente con dosis crecientes de suero humano normal. Sin embargo esta resistencia no es permanente, ya que si se suspende el tratamiento, las amibas retornan a su estado normal (16).

Poco se sabe sobre la inmunidad celular en la infección amibiana. Ortiz-Ortiz y col. (17) encontraron que los pacientes con absceso hepático amibiano muestran reacciones de hipersensibilidad retardada y producen el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) solo cuando la enfermedad ha remitido. Aparentemente, la amiba ejerce una actividad supresora sobre la respuesta inmune celular del huésped.

2.- Anticuerpos monoclonales

El estudio de los componentes antigénicos de los parásitos se ha facilitado gracias a la introducción de la tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, descubierta por Kohler y Milstein (18). Los anticuerpos monoclonales se obtienen por la fusión de líneas celulares de mieloma con la capacidad de crecer permanentemente en cultivo, con un linfocito B de un animal inmunizado, que presenta una vida media limitada pero es capaz de producir anticuerpos bien definidos. De tal fusión se obtienen líneas híbridas permanentes que pueden crecer indefinidamente en cultivo de tejidos y como tumores transplantables, con la capacidad de producir el anticuerpo específico expresado por la célula progenitora normal.

El mayor interés de esta técnica deriva de dos aspectos fundamentales: 1) Los anticuerpos monoclonales producidos por una clona, son reactivos biológicos homogéneos, monoespecíficos y no una mezcla heterogénea de anticuerpos que cambia con cada animal inmunizado y aún con cada sangrado del mismo animal. 2) La técnica es idealmente adecuada para la preparación de anticuerpos puros usando antígenos no purificados.

La aplicación de los anticuerpos monoclonales en las diferentes áreas de la biología se ha extendido, particularmente en el campo de la Inmunoparasitología resultan de gran utilidad, ya que permiten el estudio más detallado de los determinantes antigénicos de importancia médica. Además, facilitan los estudios seroepidemiológicos y la elucidación de los mecanismos de resistencia en infecciones experimental y clínica.

Un ejemplo de la aplicación de los monoclonales en este campo es la inhibición "in vitro" de los parásitos y la identificación de antígenos protectores para el huésped. Yoshida y col. (19) produjeron un anticuerpo monoclonal contra un antígeno dominante de la superficie de los esporozoitos de Plasmodium berghei, que fué capaz de proteger a ratones, disminuyendo la infectividad de los parásitos.

Epstein y col. (20) obtuvieron doce anticuerpos monoclonales dirigidos contra merozoitos de E. knowlesi, dos de ellos aglutinaron marcadamente a los parásitos "in vitro", bloqueando simultáneamente la reinvasión de los eritrocitos por los merozoitos.

III. ANTECEDENTES

Uno de los principales objetivos en el estudio de E. histolytica es la caracterización de componentes antigénicos, ya que su definición facilitaría la comprensión de los procesos biológicos de la amiba y la participación de la respuesta inmune del huésped infectado.

Los primeros intentos por caracterizar los antígenos de la amiba dieron resultados poco satisfactorios pues las muestras se obtenían de cultivos mixtos (trofozoitos en asociación con bacterias del tracto intestinal del hombre o con otros protozoarios) lo que dificultaba la interpretación de los resultados. No fue sino hasta que se hizo posible el cultivo axénico de E. histolytica (21), que lograron hacerse hallazgos importantes en cuanto al estudio de su mosaico antigénico, ya que se eliminan antígenos extraños de organismos asociados

Inicialmente se consideró que la proteína amibiana más inmunogénica se originaba esencialmente de una fracción microsomal, después del rompimiento de los trofozoitos (22). Posteriormente se sugirió que los antígenos significativos estaban localizados en el citoplasma de la amiba, asociados con vesículas que probablemente eran de naturaleza lisosomal (23). Actualmente se sabe que el intercambio entre las membranas interna y superficial de los trofozoitos es muy rápido, por lo tanto los determinantes antigénicos pueden localizarse en las membranas plasmática y citoplásmica recicladas. Esto podría explicar la inmunogenicidad efectiva de las fracciones lisosomal y ribosomal (24) y la localización de componentes antigénicos sobre la superficie del parásito (25).

La membrana plasmática de E. histolytica es muy compleja en cuanto a su composición, se han identificado al menos doce glucoproteínas en fracciones aisladas de la misma (26). Los trofozoitos en cultivo, presentan en la cara externa de su membrana una cubierta superficial apenas detectable, que puede demostrarse con el uso de reactivos citoquímicos (27). Esta cubierta posiblemente contenga algunos antígenos amibianos que son reconocidos como extraños por el huésped durante el establecimiento de la amibiasis invasiva. Por otra parte, como ya se mencionó, la acción patógena de E. histolytica depende del contacto directo de los trofozoitos con las células del huésped, de esta forma la virulencia de la amiba, puede relacionarse con la composición y propiedades de dicha cubierta.

Uno de los métodos más ampliamente usados para el estudio de la membrana plasmática de la amiba es el de criofractura, de esta forma se han podido visualizar componentes localizados en la región hidrofóbica de la membrana, encontrándose que la cara interna de la misma, o fase F, que está en contacto con

el ectoplasma, se encuentra cubierta por una población abundante y heterogénea de partículas de membrana, muchas de las cuales parecen ser proteínas integrales. En comparación, la fase E complementaria, tiene una población menos abundante de partículas membranales (28).

En relación a la membrana, también se ha observado que ocurre una rápida redistribución de ciertos componentes de superficie en la amiba, seguida de la interacción con una gran variedad de ligandos tales como concanavalina A, anticuerpos poliespecíficos y ferritina catiónica. Normalmente, la distribución de receptores y antígenos sobre la superficie de la célula es uniforme, pero a ciertas temperaturas y concentración de ligandos, los determinantes superficiales se mueven sobre la membrana plasmática y se acumulan en la parte posterior de la célula o uroide (29). Este fenómeno, conocido como "capping", posiblemente le permita a la amiba evadir la respuesta inmune del huésped.

Se ha reportado que para que ocurra el entrecruzamiento de receptores es necesario agregar una segunda capa de anticuerpos y que este proceso es dependiente de la temperatura y actividad metabólica (30). Por otra parte Calderón y col. (31) pudieron inducir "capping" de antígenos de superficie con una sola capa de anticuerpos contra E. histolytica, utilizando concentraciones elevadas de inmunoglobulina.

La composición de los "caps" ha sido identificada (32), encontrándose que existe una similitud notable entre los pesos moleculares de las principales proteínas identificadas en los "caps" puros y las proteínas inmunoprecipitadas a partir de la superficie celular. Los resultados sugieren que el "capping" ocurre entre los antígenos de la superficie que están más accesibles a la interacción con el anticuerpo, por lo que los antígenos superficiales principales, son liberados de la célula acarreado a los anticuerpos que resultan nocivos para su viabilidad.

En un intento por identificar los antígenos amibianos que estimulan la producción de anticuerpos en la amibiasis invasiva, Krupp (33) realizó un estudio inmunolectroforético con trofozoitos de E. histolytica crecidos axénicamente y el suero de pacientes procedentes de diferentes áreas geográficas. Encontró que los sueros reconocían principalmente 14 antígenos; al hacer un estudio comparativo con las diferentes cepas de E. histolytica, observó que el patrón de reconocimiento esencialmente era el mismo, lo que sugería que existe una anatomía básica para las diferentes cepas, constituida por estos antígenos.

El cultivo prolongado de la amiba, puede ser otra fuente de diferencia antigénica, ya que quizá resulte en aparición o desaparición de ciertos antígenos (34).

Chang y col. (35), explotaron la inmunolectroforesis doble, debido a su mayor resolución, encontrando arriba de 32 picos de precipitinas para las cepas axénicas de E. histolytica. Todos estos estudios demuestran que la diferentes cepas del parásito presentan un gran número de antígenos en común, en especial aquellos que inducen una respuesta inmune humoral por parte de los pacientes infectados.

Hasta la fecha, la resolución de los métodos utilizados en el análisis antigénico de E. histolytica, no ha sido muy satisfactoria, ya que se emplean anticuerpos poliespecíficos como reactivos detectores, con los cuales se obtienen resultados muy complejos y difíciles de interpretar.

Afortunadamente la tecnología de anticuerpos monoclonales, surge como una alternativa para abordar el estudio de los antígenos de la membrana plasmática de E. histolytica, pues permite obtener reactivos monoespecíficos homogéneos, bien definidos y de abastecimiento permanente.

IV. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1).- Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia para estudiar la interacción de diferentes anticuerpos monoclonales anti-amiba con E. histolytica.
- 2).- Determinar la localización topográfica de los antígenos de membrana reconocidos por algunos anticuerpos monoclonales anti-E. histolytica en trofozoitos fijados.
- 3).- Definir la frecuencia de distribución de las especificidades mostradas por los anticuerpos monoclonales sobre la población celular.
- 4).- Determinar si existe reactividad cruzada de los monoclonales con otras especies de Entamoeba.
- 5).- Inducir fagocitosis y analizar el patrón de tinción revelado por algunos monoclonales, tratando de definir si se modifica el patrón de distribución de los antígenos de membrana reconocidos por estos anticuerpos.
- 6).- Estandarizar la inducción de "capping" en E. histolytica, utilizando suero inmune, para aplicarlo en el futuro al análisis de moléculas de superficie con anticuerpos monoclonales.

V. MATERIAL

Reactivos

Acetona, Dextrosa, Etanol absoluto, Citrato férrico amoniacal, Formaldehido al 37%, Glicerol, Cloruro de magnesio, Paraformaldehido, Fosfato monobásico de -- potasio, Fosfato dibásico de potasio, Citrato de --- sodio, Hidróxido de sodio de J. T. BAKER.

Albúmina sérica bovina, Acido bórico, Bórax, Cloruro de calcio, Acido cítrico, L-cisteína, p-fenilendi- amina, Poli-l-lisina, Azida de sodio de SIGMA.

Glicina, Cloruro de sodio de MERCK.

Biosate peptona BBL

Glutaraldehido al 25% ALDRICH

Acido barbitúrico BIO RAD

Isotiocianato de fluoresceína MILES BIOCHEMICALS

Suero de caballo QUIMICA FOSFATOS

Suero de ternera BIOPRODUCTS

Mezcla Vitamínica de Diamond (Diamond vitamin tween 80 mixture) WORTH AMERICAN BIOLOGICAL

Película para fotografía TRI X PAN de KODAK

Material biológico

Trofozoitos de: E. histolytica cepas HIM1:IMSS y HK9, E. invadens, E. moshkovskii y Larado

Suero de chivo anti-inmunoglobulina de ratón y conejo

Suero de chivo anti-inmunoglobulina de ratón y conejo

Conejo albino de Nueva Zelanda

Ratones Balb/c

Sobrenadante de hibridomas productores de anticuerpos
monoclonales

Equipo

Agitador magnético THOMAS

Balanza analítica SARTORIUS

Balanza granataria SARTORIUS

Baño maria RIOSSA

Harvard Trip balance OHAUS

Campana de flujo laminar BELCO GLASS

Celda de Amicon

Cru-5000 Centrifuge IEC

Colector de fracciones Ultrorac (LKB)

Incubador de 37°C PRECISION

Microscopio de epifluorescencia ZEISS

Microscopio invertido OLYMPUS TOKYO

Pipetas automáticas PIPETMAN

Potenciómetro BECKMAN

Uvicord II ultraviolet absorptiometer control (LKB)

VI. METODOS

Cultivo de Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens, Entamoeba moshkovskii y Laredo

Los trofozoitos de E. histolytica de las cepas HM1:IMSE y HK9 fueron cultivados axénicamente por incubación a 37°C en el medio TYI-S-33, suplementado con 15.1% de suero de ternera y 1.5% de la mezcla vitamínica de Diamond (21).

Los trofozoitos de E. invadens, E. moshkovskii y Laredo se cultivaron a 22°C en el medio axénico TYI-S-33, suplementado con 15.1% de suero de caballo y 1.5% de la mezcla vitamínica de Diamond.

Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento fueron cosechados, desprendiendo las células adheridas a las paredes del tubo por incubación en agua-hielo; durante 5 minutos para E. histolytica y Laredo, y 10 minutos para E. moshkovskii y E. invadens. La pastilla se obtuvo por centrifugación en frío durante 3 minutos a 500 x g para E. moshkovskii y a 250 x g para las especies restantes.

Obtención de eritrocitos de conejo

Los eritrocitos fueron obtenidos por punción de la vena marginal de la oreja, recogidos en una solución 1:1 de Alsever estéril (Dextrosa, 110mM; citrato de sodio dihidratado, 32 mM; ácido cítrico monohidratado, 2.6 mM; cloruro de sodio, 72mM, pH de 6.1) y almacenados a 4°C al menos una semana antes de su uso.

Antes de utilizar los eritrocitos, el Alsever se eliminó por centrifugación a 250 x g por 5 minutos y fueron lavados con AFS.

Preparación de la fracción de Ig G

Al suero de chivo anti-inmunoglobulina de ratón, diluido 1:5 en amortiguador boratos 50 mM pH 8.5, se le adicionó lentamente por goteo un volumen equivalente de sulfato de amonio saturado pH 7.2 (SAS), manteniendo en agitación a 4°C. La mezcla se dejó en reposo 30 minutos, enseguida fué centrifugada a 4°C por 15 minutos a 10,000 x g. El precipitado fué resuspendido en un volumen equivalente al inicial en amortiguador boratos, se precipitó nuevamente con SAS a una concentración final de 33%, dejando reposar 30 minutos en frío, posteriormente se centrifugó otros 15 minutos a 10,000 x g. La pastilla fué resuspendida en 2 ml de amortiguador boratos y dializada contra 100 volúmenes de amortiguador boratos por 72 horas, realizando dos cambios diarios de solución.

La fracción de inmunoglobulinas obtenida se aplicó a una columna de DE-52 de 0.5 x 8 cm previamente equilibrada con amortiguador fosfatos, 17.5 mM pH 6.3. La elución se llevó a cabo con la misma solución a una razón de flujo lenta. Los eluatos con una D.O.₂₈₀ mayor de 0.1, fueron reunidos y concentrados por ultrafiltración en una celda de Amicon para obtener una concentración de proteína de 10 mg/ml.

La concentración de proteína se determinó por la lectura de la D.O.₂₈₀ de una alícuota de la solución concentrada, diluida con NaOH 0.1 N, mediante la siguiente ecuación (36):

$$\text{Conc. de proteína mg/ml} = \frac{\text{D.O.}_{280} \text{ (Factor de dilución)}}{1.644}$$

Conjugación de Ig G a isotiocianato de fluoresceína

La conjugación se realizó siguiendo el método de Johnson (37). A 20 ml de solución proteínica concentrada a 10 mg/ml se le adicionaron 3 ml de amortiguador de carbonatos, 500 mM pH 9.5. Inmediatamente fueron disueltos 4 mg de FITC en 1 ml de amortiguador de carbonatos. La solución de proteína alcalina (29 ml) se mezcló con la solución del fluorocromo, incubando en la obscuridad 20 horas a 4°C. El material proteínico desnaturalizado fué sedimentado por centrifugación a 4°C a 10,000 x g por 30 minutos. El sobrenadante fué aplicado a una columna de DE-52 preequilibrada con amortiguador fosfatos, 17 mM pH 7.0 . La elución se inició con 20 ml de amortiguador fosfatos (pico 0), posteriormente con 20 ml de NaCl 125 mM en amortiguador fosfatos (pico a) y finalmente con 20 ml de NaCl 250 mM en amortiguador fosfatos (pico b).

Los picos a y b fueron concentrados individualmente por ultrafiltración en una celda de Amicon para obtener una concentración aproximada de proteína de 10 mg/ml, ajustando la osmolaridad a 200 mM con cloruro de sodio.

Las relaciones molares fluoresceína/proteína (F/P) y la concentración de proteína se determinaron por la lectura de la D.O. 280 y D.O. 495 de una muestra del conjugado diluida 1/40 con NaOH 0.1 N, empleando la siguiente ecuación (38):

$$\text{mg proteína/ml} = \frac{\text{D.O. } 280 - (0.35 \times \text{D.O. } 495)}{1.4}$$

$$\text{F/P} = \frac{2.87 \times \text{D.O. } 495}{\text{D.O. } 280 - (0.35 \times \text{D.O. } 495)}$$

Estudio de la reactividad de anticuerpos monoclonales por inmunofluorescencia indirecta en amibas fijadas en suspensión

Se colectaron entre 1-2 millones de trofozoitos en AFS-A y se mezclaron en una relación 1:1 con la solución fijadora (formaldehído 3.7% - glutaraldehído 0.0075% en AFS) (39). La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, mezclando constantemente para obtener una fijación uniforme. Posteriormente se lavaron 3 veces con AF, centrifugando a 250 x g por 3 minutos.

Con el propósito de disminuir la autofluorescencia debida a la fijación, los trofozoitos se incubaron con una solución de azul de Evan's (40) al 0.025% v/v en AF, durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó lavando 2 veces con AF.

A tubos cónicos conteniendo $5-10 \times 10^4$ trofozoitos, se agregaron 100 μ l de cada anticuerpo monoclonal (sobrenadante de hibridoma sin diluir o líquido ascítico diluido 1:40 en AF) y fueron incubados 1 hora a temperatura ambiente, lavando posteriormente 3 veces con AF.

La pastilla de cada tubo se resuspendió en 50 μ l de GAMG-FITC, diluida 1/20 en AF. La mezcla se incubó en la obscuridad 60 minutos a temperatura ambiente, el anticuerpo libre se eliminó lavando 3 ocasiones con AF.

Para evitar la extinción de la fluorescencia durante la observación, la pastilla fue resuspendida en la solución remanente en el tubo y se le agregó una gota de p-FDA (41) al 0.1% en glicerol-AFS (9:1), se colocó una gota de esta suspensión sobre un portaobjetos y fue observada al microscopio de fluorescencia. Las fotografías de las preparaciones se tomaron con película TRI X PAN.

Alteración de la distribución topográfica inducida por fagocitosis

Una suspensión conteniendo 6×10^5 trofozoitos de E. histolytica HM1:IMES más 1.2×10^7 eritrocitos de conejo (200 eritrocitos por amiba), en 2 ml de AVS-A fué incubada durante 10 minutos a 37°C ; simultáneamente se incubó un control de trofozoitos sin eritrocitos (control sin fagocitosis).

A la suspensión celular diluida a 5 ml con AVS-A se le agregó un volumen equivalente de formaldehído-glutaraldehído (3.7% - 0.0075% en AFS), la mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fué centrifugada por 3 minutos a $250 \times g$ y lavada por 3 ocasiones con AF.

Para disminuir la autofluorescencia provocada por el fijador, la pastilla fué resuspendida en azul de Evan's al 0.025% en AF, incubando 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavó 2 veces con AF por centrifugación durante 3 minutos a $250 \times g$.

La pastilla de cada tubo se resuspendió en 600 μl de AF, distribuyéndose en 6 tubos pequeños a los cuales se agregaron 100 μl de cada anticuerpo monoclonal. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 60 minutos, eliminando el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados con AF.

Se añadieron 50 μl de GAMG-FITC diluida 1/20 en AF por tubo. La mezcla se incubó en la obscuridad 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente fué lavada 3 veces con AF.

La pastilla fué resuspendida en el amortiguador remanente en el tubo, se agregó una gota de p-FDA en glicerol y se mezcló. Finalmente, se colocó una gota de esta suspensión sobre un portaobjetos y fué observada al microscopio de fluorescencia.

Inducción de "capping" con suero inmune de conejo y análisis por inmunofluorescencia indirecta

Se colectaron 1×10^6 trofozoitos de E. histolytica HMI:IMSS en 10 ml de suero inmune de conejo diluido 1/5 en AVS-A. La mezcla se incubó en agua-hielo por 10 minutos, eliminando el exceso de anticuerpo por centrifugación a 250 x g, durante 3 minutos a 4°C, ensaguida se lavaron 2 veces con AVS-A frío. La pastilla fue resuspendida en 14 ml de AVS-A conteniendo 2.2% de BSA, incubando posteriormente a 37°C por diferentes tiempos.

A tubos conteniendo 5 ml de formaldehído-glutaraldehído (3.7%-0.025%), se agregaron 500 µl de la suspensión celular incubada a 37°C a los tiempos: 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 30.0, 45.0 y 60.0 minutos de incubación, mezclando rápidamente para evitar la agregación celular. Los tubos fueron incubados 15 minutos a temperatura ambiente. El fijador se eliminó por centrifugación a 250 x g por 3 minutos, realizando después 3 lavados con AF.

A fin de bloquear los grupos aldehído libres después de la fijación, los trofozoitos fueron incubados con una solución de glicina (100 mM pH 7.2) durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavando posteriormente 2 ocasiones con AF.

Para disminuir la autofluorescencia provocada por la fijación, los trofozoitos fueron incubados con azul de Evan's al 0.025% en AF, por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó por centrifugación a 250 x g por 3 minutos, realizando 2 lavados con AF.

La pastilla fue resuspendida en 50 µl de GARG-FITC diluida 1/25 en AF. La incubación se llevó a cabo en la obscuridad, una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 250 x g y se lavó 3 veces con AF.

El paquete celular se resuspendió en la solución remanente en el tubo, se agregó una gota de p-FDA al 0.1% en glicerol-AFS (9:1) y se mezcló. Por último, una gota de la suspensión se colocó sobre un portaobjetos y fue observada al microscopio de fluorescencia.

VII. RESULTADOS

a) Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia indirecta para el análisis de E. histolytica

Para llevar a cabo el ensayo de inmunofluorescencia se probaron diferentes condiciones:

Fijación el propósito de realizar la fijación era preservar intacta la morfología celular, de tal forma que la detección de antígenos superficiales en E. histolytica, fuese lo más próxima a la que presentan las células nativas. Para ello se emplearon siete soluciones fijadoras (Tabla 1), con los cuales se encontraron claras diferencias, desde las que provocaron marcada lisis celular hasta las que mantuvieron intacta la morfología (Figura 1).

Tabla 1

FIJADOR	MORFOLOGÍA	AUTOFLUORESCENCIA
1) Acetona	pésima	-
2) Formaldehído 3.7%	mala	-
3) PFA 4%-CA 0.03%	regular	+ ^a
4) Glutaraldehído 1%	muy buena	++++
5) FA 3.7%-CA 0.1%	buena	+++
6) FA 3.7%-CA 0.025%	buena	++ ^b
7) FA 3.7%-CA 0.0075%	buena	+ ^c

- no presentó autofluorescencia

+ grado relativo de autofluorescencia

a. utilizando azul de Evan's desapareció

b. con concentraciones elevadas de azul de Evan's se abatió

c. con azul de Evan's fué eliminada

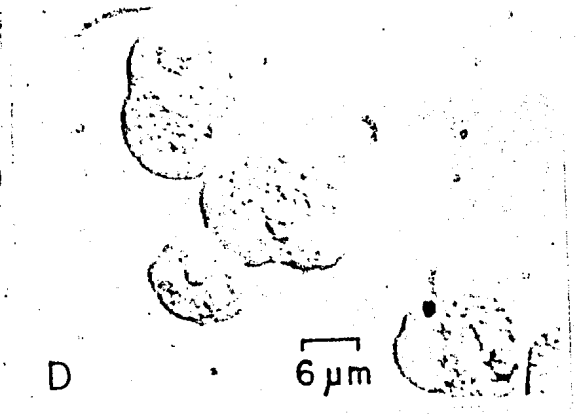
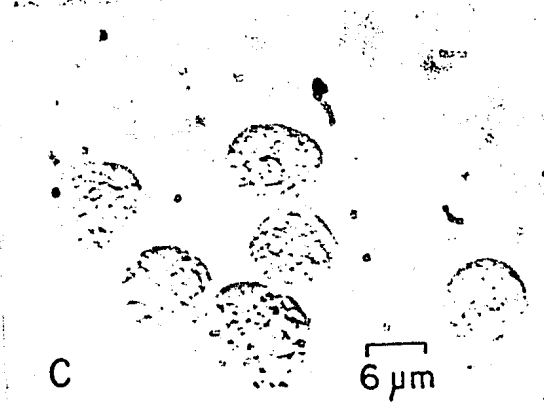
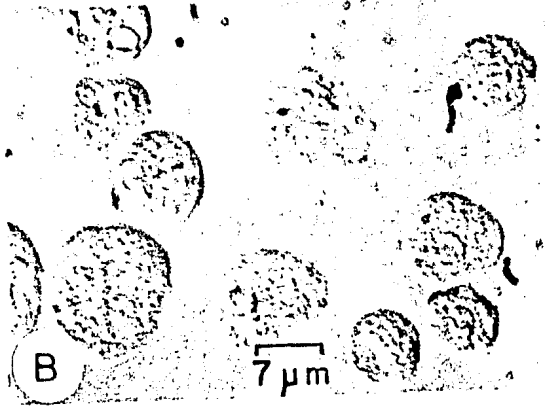
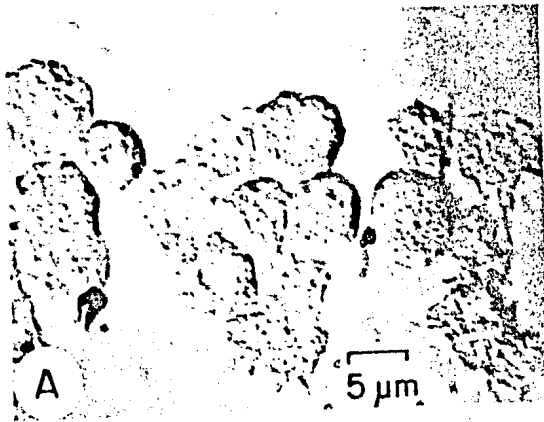
Figura 1.- Patrón morfológico presentado por los trofozoitos de E. histolytica HM1 después de la fijación con diferentes soluciones fijadoras.

Panel A. Trofozoitos fijados con acetona. En la imagen se puede observar que las células tratadas con este disolvente fueron totalmente dañadas, presentando marcada lisis celular.

Panel B. Células fijadas con formaldehído. Es evidente que los trofozoitos así tratados, adquirieron una forma redondeada, no pudiéndose apreciar las estructuras internas.

Panel C. Fijación con PFA-GA. Mediante este tratamiento la morfología celular tampoco fué conservada adecuadamente, observándose una apariencia muy granulosa del citoplasma.

Panel D. Fijación con FA-GA. Los trofozoitos tratados con este fijador mantuvieron su forma ameboide característica, además fué posible distinguir estructuras internas como el núcleo.



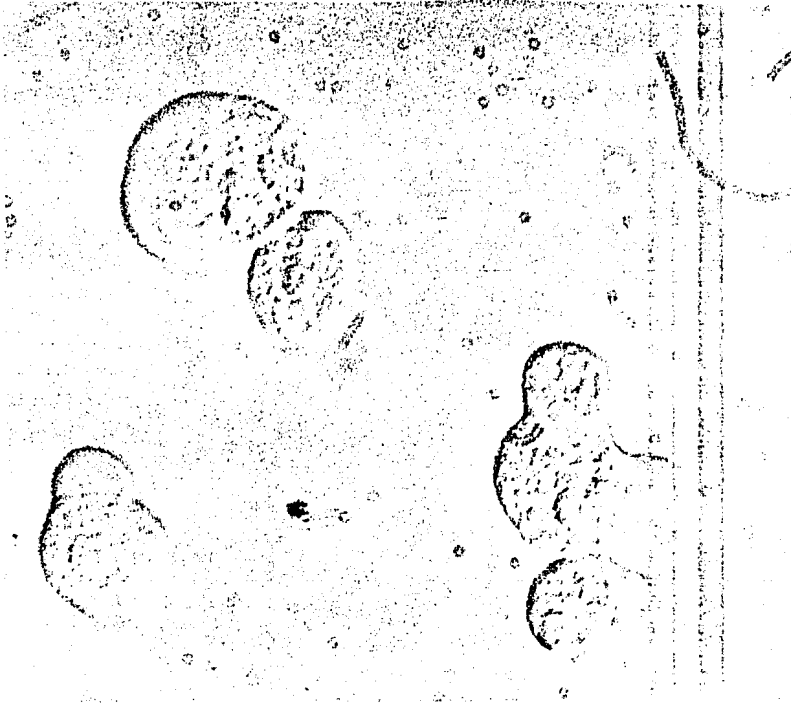


Figura 2.- Esquema morfológico observado en los trofozoitos de E. histolytica HMI:IMSS después de la fijación con glutaraldehído. Claramente se observa que las células tratadas con este método conservaron su forma, pudiéndose apreciar el contenido intracelular. La fotografía corresponde a una imagen ampliada 1600X.

Disminución de autofluorescencia en inmunofluorescencia, uno de los factores que más dificultan la detección de antígenos, es la autofluorescencia, ocasionada principalmente por la fijación. Como se observa en la tabla 1, los fijadores que mejor preservaron a las células, fueron también los que provocaron mayor o menor grado de autofluorescencia. Se eligió aquella mezcla (solución 7) que nos mantuvo lo mejor posible la morfología celular y al mismo tiempo dió el menor grado de autofluorescencia, de tal forma que esta última pudiera ser eliminada mediante el uso del colorante azul de Evan's, ampliamente utilizado para este tipo de problemas (40). Este reactivo colorea a las células de rojo, lo cual intensifica la fluorescencia específica en color verde dando mayor contraste.

Determinación de la concentración óptima de anticuerpo este tipo de ensayos, estaba estandarizado para realizarse con anticuerpos poliespecíficos, en donde la concentración de inmunoglobulinas es muy elevada, por esta razón se hizo necesario establecer la cantidad de sobrenadante de hibridoma y líquido ascítico para que reaccionara con los antígenos portados por la célula, ya que en estos reactivos la concentración de inmunoglobulina es menor, por lo tanto no debe desperdiciarse. En el caso de los sobrenadantes de hibridoma, se probaron diferentes volúmenes, encontrándose que un volumen de 100 µl es suficiente para poder detectar los antígenos reconocidos por los monoclonales. Para el líquido ascítico se ensayaron diferentes diluciones elegidas arbitrariamente, se observó que con la dilución 1/40 podían obtenerse buenos resultados.

En lo que se refiere al anticuerpo fluorescente, considerando que posee un grado de conjugación adecuado (F/F 2-3), debe utilizarse en la concentración mínima con la cual sea posible revelar al primer anticuerpo unido a la célula y al mismo tiempo no se favorezca la unión inespecífica del mismo (42). Se probaron diferentes diluciones del mismo observándose que la dilución 1/20 para la GAMG-FITC y 1/25 para la GARG-FITC son adecuadas para lograr estos fines.

Tiempo de incubación con ligandos en los ensayos de inmunofluorescencia, el tiempo de incubación está en función de la temperatura. Pudo observarse que ambos anticuerpos (monoclonal y fluorescente) se unieron óptimamente al incubarlos con los trofozoitos fijados, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Periodo de observación de las preparaciones en un intento por establecer como se va perdiendo la fluorescencia específica en las preparaciones conforme pasa el tiempo, se observaron las laminillas a diferentes tiempos, encontrándose que a medida que avanza el tiempo se va extinguiendo la fluorescencia de las células, aun cuando se utilizó pFDA para evitar este problema, además empiezan a mostrarse

autofluorescentes, lo que dificulta la observación. Por estas razones lo más conveniente es observarlas inmediatamente después de realizadas.

b) Localización topográfica de antígenos de membrana en E. histolytica, utilizando anticuerpos monoclonales

Para localizar los antígenos respecto a su orientación en la membrana plasmática de la ameba, se realizó un análisis por inmunofluorescencia de la reactividad de los anticuerpos monoclonales con trofozoitos íntegros.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron los siguientes: A14A12, A57, A8, C6, D4, D10, D12 y F9; los cuales fueron obtenidos empleando como antígeno, fracciones purificadas de membrana plasmática de E. histolytica.

La localización topográfica se realizó con dos cepas de E. histolytica HM1:IMSS y HK9, virulenta la primera y de baja virulencia la segunda.

En la cepa HM1:IMSS se revelaron 3 diferentes patrones de tinción:

1) Una distribución homogénea en la superficie de la membrana, observándose como una línea continua bien delimitada (Figura 3E) revelada con los anticuerpos A14A12, A8, C6, D4, D10 y F9.

2) De 2 a 3 zonas fluorescentes a manera de parches, distribuidos sobre la superficie de la ameba (Figura 3C) revelada consistentemente con el monoclonal A57.

3) Como un microagregado sobre la superficie de la membrana (Figura 3D) mostrada por los anticuerpos monoclonales A8, C6, D4, D10 y F9.

El anticuerpo monoclonal D12 no mostró reactividad en estas condiciones.

Respecto a la topografía observada para los antígenos de membrana de la cepa HK9, se encontraron los mismos patrones de tinción, sustituyendo la distribución a manera de un microagregado (monoclonales D4, D10 y F9) por un patrón disperso y heterogéneo (moteado) sobre la superficie de la membrana (Figura 4).

c) Distribución heterogénea en el contenido de antígenos de superficie en las poblaciones de E. histolytica

Debido a que algunos anticuerpos mostraron heterogeneidad en cuanto al patrón de tinción revelado, se determinó la frecuencia de cada patrón de reconocimiento en las poblaciones de E. histolytica HM1:IMSS y HK9.

Figura 3. - Distribución topográfica de los antígenos de membrana, reconocidos por acs. mos. anti-E. histolytica en trofozoitos de la cepa HM1:IMSS. La topografía fué definida por IFI en amibas fijadas con FA-GA.

Panel A. Control negativo: exposición con un ac. mo. contra un antígeno del sistema nervioso del acocili.

Panel B. Tinción homogénea de la membrana, mostrada por los acs. mos. A14A12, D4, D10 y F9. En el caso de los anticuerpos A8 y C6 sólo un 25% de la población celular presentó esta distribución.

Panel C. Topografía revelada por el ac. mo. A57, a manera de 2 ó 3 zonas fluorescentes bien definidas.

Panel D. Microagregado fluorescente único de aproximadamente 2 μ m, definido por los acs. mos. A8, C6, D4, D10 y F9.

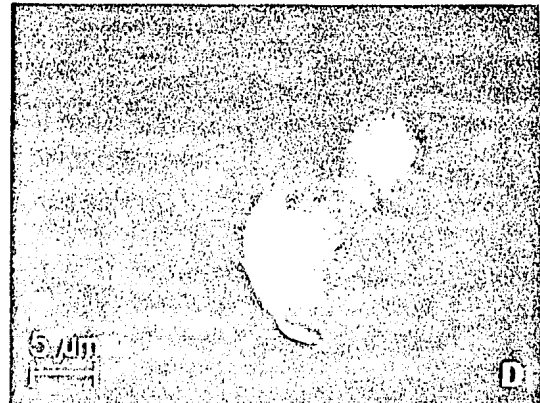
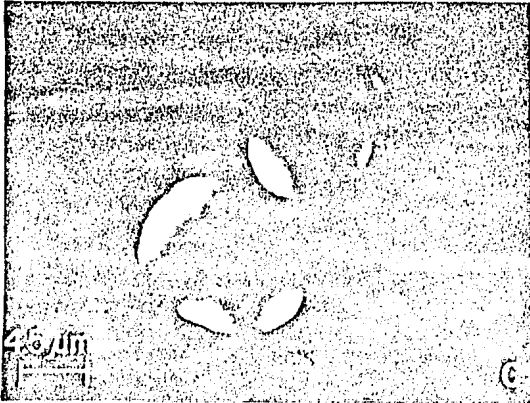
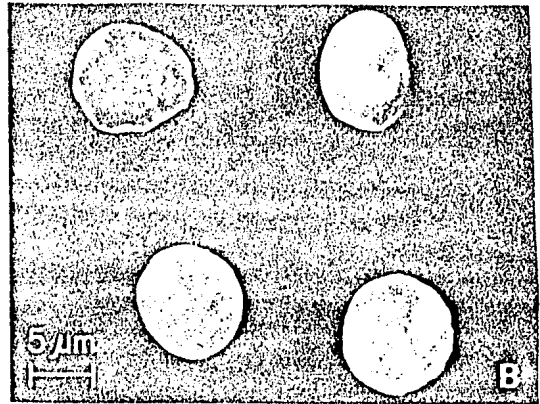
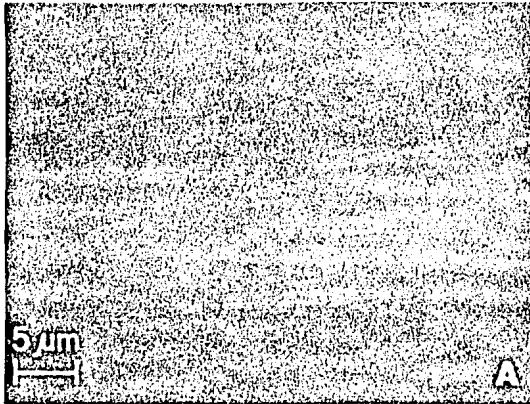


Figura 4.- Localización topográfica de antígenos de superficie, reconocidos por acs. mos anti-amiba, en trofozoitos de E. histolytica HK9 fijados con FA-CA. El ensayo fue realizado por IFI.

Panel A. Imágen revelada por exposición a un ac. mo. con especificidad por un antígeno del sistema nervioso del acocil. Representa la basal de los ensayos.

Panel B. Distribución homogénea de 1 antígeno, que se observa como una línea continua bien delimitada definida por los acs. A14A12, D4, D10 y F9.

Panel C. Patrón de reconocimiento del anticuerpo A57, en forma de 2 ó 3 zonas fluorescentes a manera de parches.

Panel D. Patrón disperso y heterogéneo sobre la superficie de los trofozoitos y tinción continua de la membrana, mostrado por los acs. mos. D4, D10 y F9.

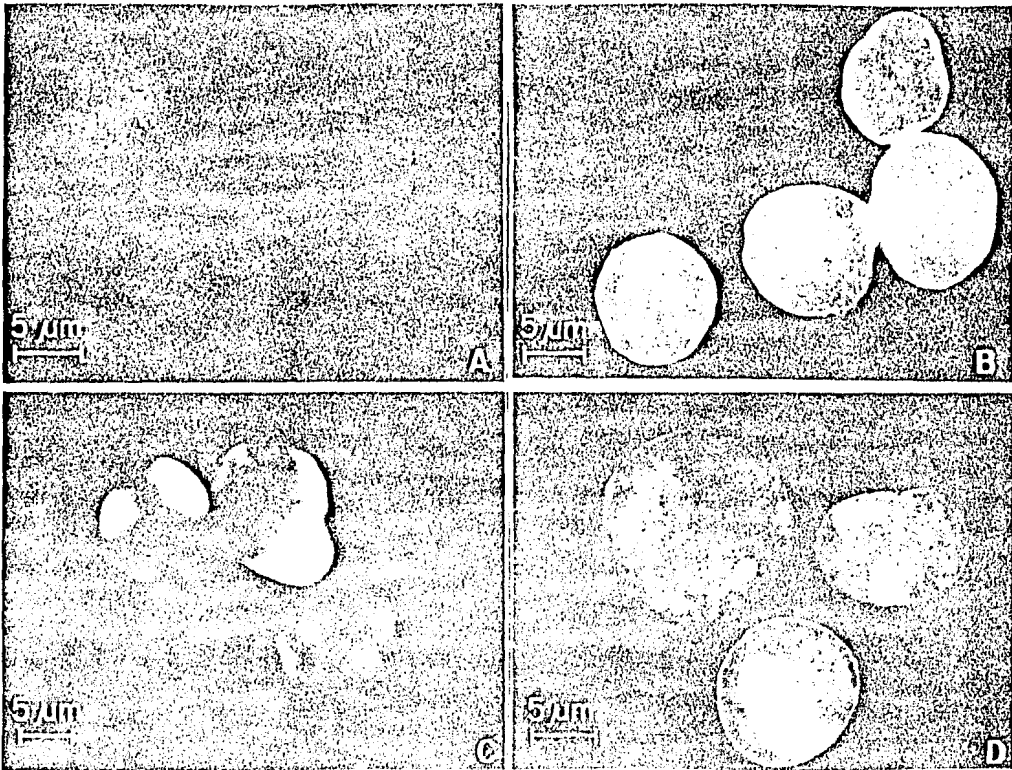


Figura 5.- Frecuencia de los patrones de tinción mostrados por los diferentes anticuerpos monoclonales con E. histolytica HMI:IMSS. La frecuencia de tinción se calculó promediando los resultados de 3 experimentos.

FRECUENCIA DE TINCION CON HM1

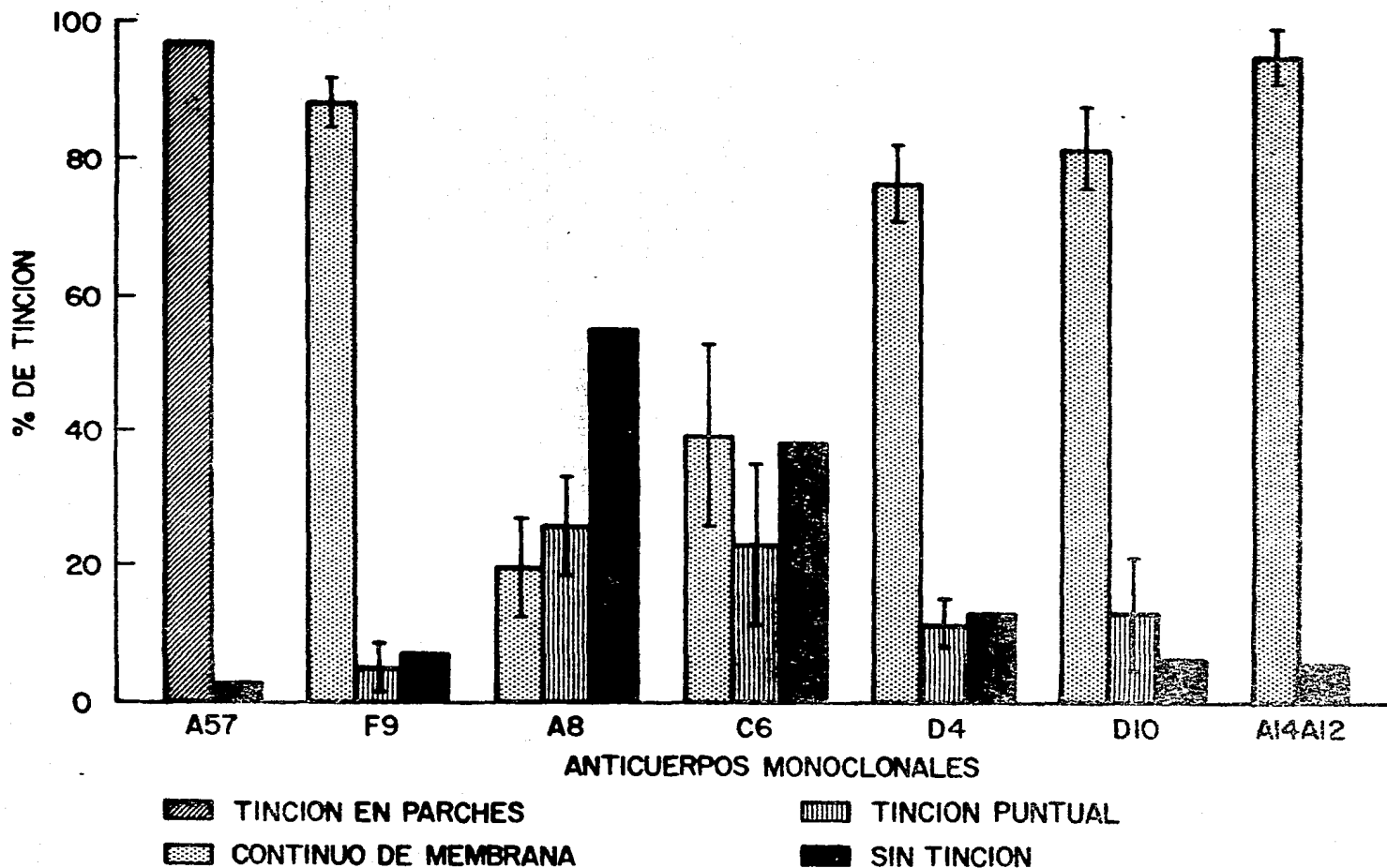
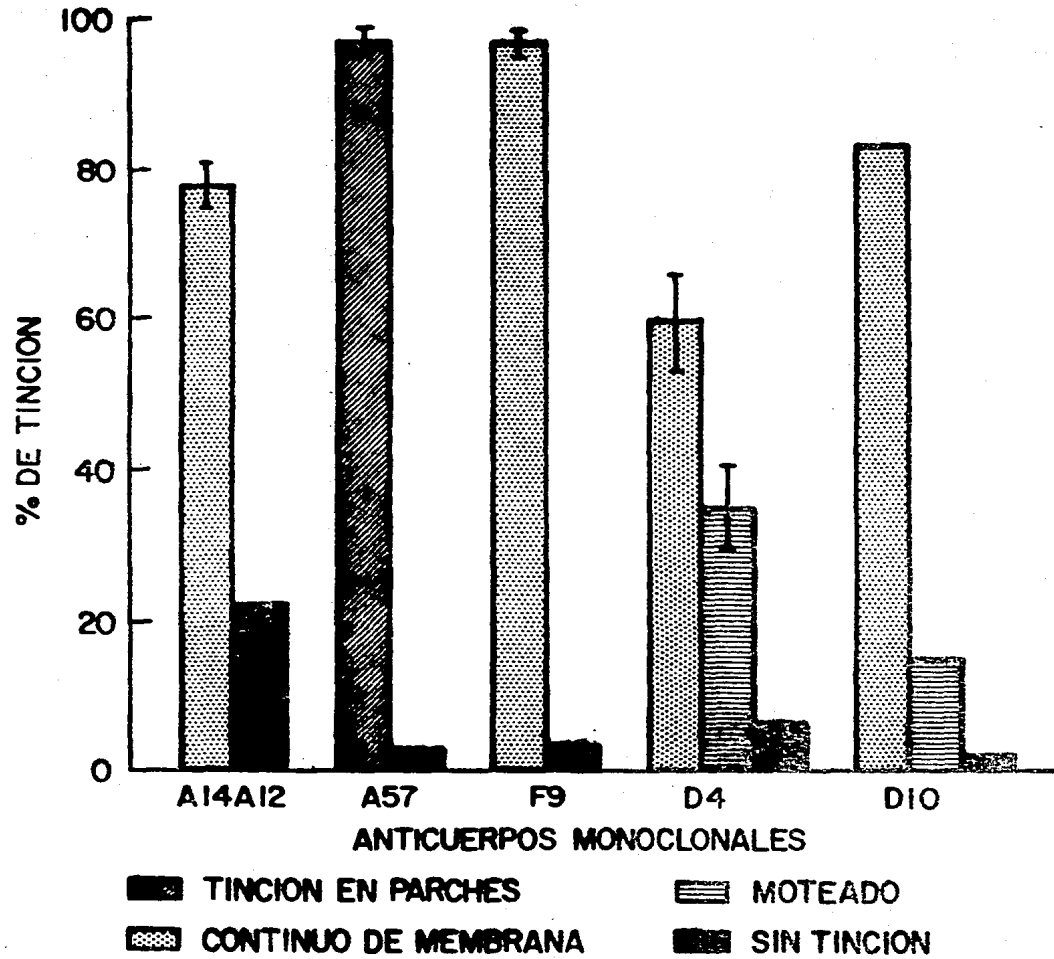


Figura 6.- Frecuencia de las especificidades mostradas por los acs. mos. en trofozoitos de la cepa MK9 de E. histolytica. La frecuencia se determinó promediando los resultados de 3 experimentos.

FRECUENCIA DE TINCION CON HK9



En la cepa HM1:IMSS, los monoclonales A8 y C6 revelaron un agregado único en la superficie en el 25% de las células, una tinción continua de la membrana plasmática en otro 25% y una ausencia de reactividad en la mitad de la población (Figura 5).

Los cinco monoclonales restantes mostraron una reactividad uniforme en la población celular, manifestando los patrones de tinción característicos para cada anticuerpo monoclonal (Figura 5).

Los monoclonales que se utilizaron para el ensayo con la cepa HK9, fueron los que con la cepa HM1 mostraron una reactividad superior al 70% en la población celular. Estos anticuerpos revelaron una reactividad igualmente elevada, aunque con frecuencias en los patrones de reconocimiento diferentes, como puede observarse en la Figura 6.

d) Estudio de la reactividad de anticuerpos monoclonales anti-E. histolytica, con especies no histolyticas y Laredo por inmunofluorescencia indirecta

Al ensayar los anticuerpos monoclonales con E. invadens, E. moshkovskii y Laredo, no mostraron reactividad cuando se compararon con un control positivo para E. histolytica HM1:IMSS (Figura 7).

e) Alteración de la distribución topográfica inducida por fagocitosis

Para determinar si ocurría algún trastorno en la distribución de los antígenos superficiales reconocidos por algunos monoclonales, los trofozoitos de E. histolytica HM1:IMSS se sometieron a fagocitosis de eritrocitos de conejo, después de eliminar a los eritrocitos libres, se fijaron con la solución de formaldehído-glutaraldehído. Posteriormente los trofozoitos se hicieron reaccionar con los anticuerpos monoclonales, comparando en cada caso con un control sin fagocitosis. Los monoclonales que se eligieron fueron los que con la cepa HM1 mostraron una reactividad superior al 70% en la población celular (Fig 5).

La distribución de los antígenos sobre la superficie de los trofozoitos, reconocidos por los anticuerpos monoclonales A14A12 y F9, aparentemente no sufrió ninguna alteración, como puede observarse en las figuras 8A-8B y 8E-8F respectivamente, correspondiendo las figuras 8A y 8E a los controles sin fagocitosis. Se observan algunas invaginaciones en la membrana de los trofozoitos, que podrían corresponder a canales endocíticos.

Figura 7.- Ausencia de reactividad cruzada de los acs. mos. anti-E. histolytica con otras especies de Entamoeba. La reactividad de los 8 acs. mos. con E. invadens, E. moshkovskii y Laredo, fué analizada en trofozoitos fijados. Todos los anticuerpos sólo reaccionaron con trofozoitos de E. histolytica. En las imágenes se ilustran los resultados obtenidos para uno de los mos. estudiados.

Panel A. Tinción del ac. monoclonal A14A12 en trofozoitos de E. histolytica HM1:IMSE.

Panel B, C y D. Muestran trofozoitos de E. invadens, E. moshkovskii y Laredo respectivamente.

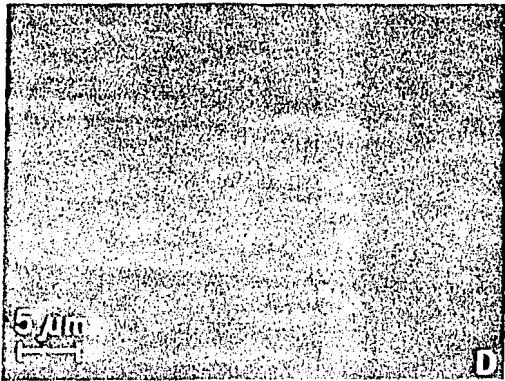
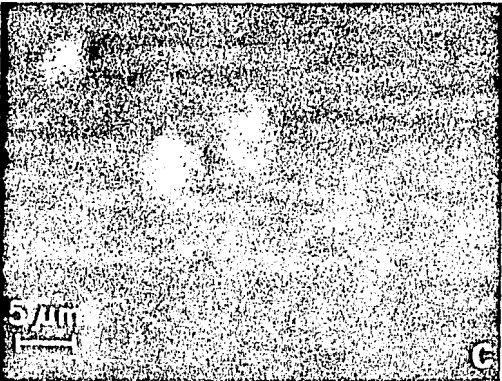
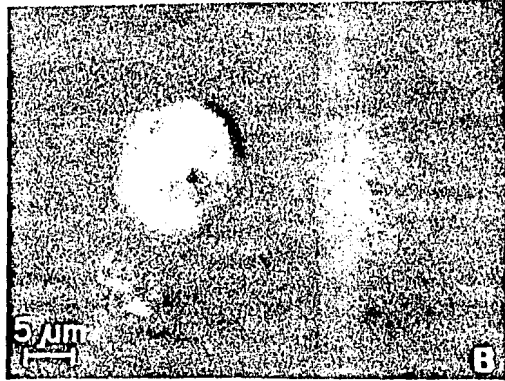
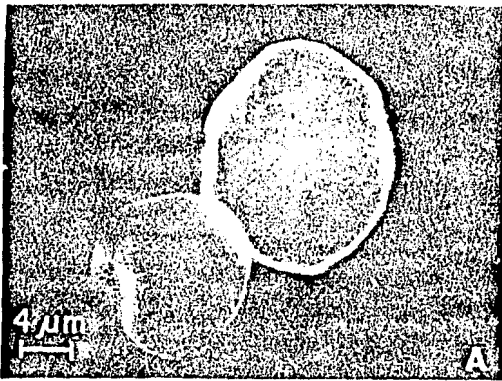


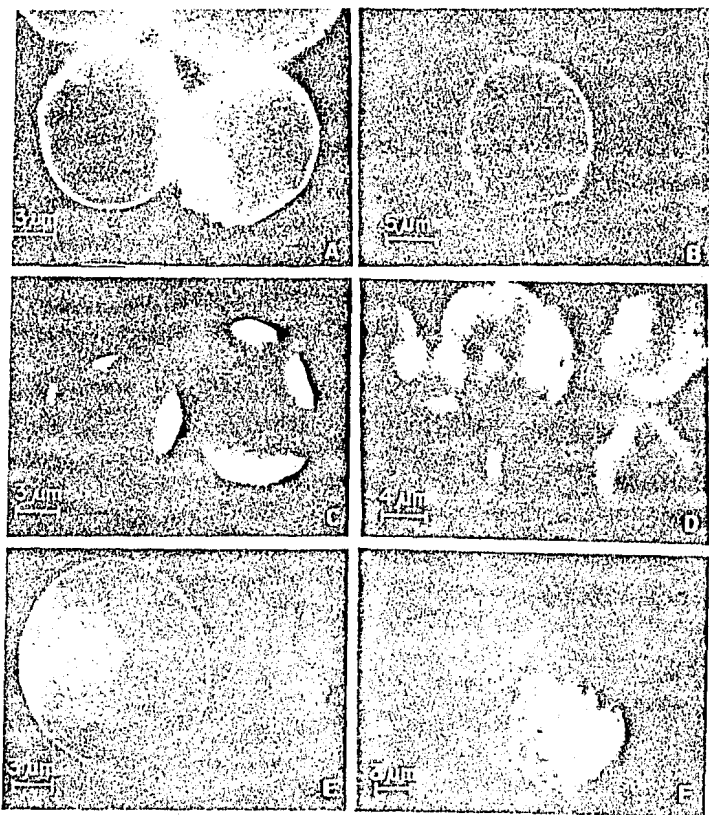
Figura 8.- Alteración de la distribución topográfica de antígenos superficiales de E. histolytica HM1:IMSS inducida por fagocitosis. El ensayo se realizó por IFI en trofozoitos fijados con FA-GA después de la fagocitosis.

A, C y E. Controles sin fagocitosis para los acs. mos. A14A12, A57 y F9 respectivamente.

Panel B. Se observa que el patrón de distribución del ac. mo. A14A12 no sufrió ningún trastorno, apreciándose invaginaciones en la membrana que podrían corresponder a canales endocíticos.

Panel D. Como se observa en la imagen, la distribución del antígeno reconocido por el ac. mo. A57 presentó alteraciones después de la fagocitosis, pasando de 2 ó 3 zonas bien localizadas a una distribución totalmente heterogénea sobre la membrana plasmática.

Panel F. La distribución del antígeno definida por el ac. mo. F9 no sufrió modificaciones, ya que la distribución presentada en condiciones sin fagocitosis se mantiene sin embargo el ac. se ubicó en lo que podrían ser canales endocíticos, lo que se aprecia en la fotografía como pequeños cráteres.



En el caso del antígeno reconocido por el anticuerpo AS7, es claro que después de la fagocitosis su distribución superficial se ve alterada, ya que en condiciones normales (sin fagocitosis) se localiza en 2 o 3 zonas fluorescentes bien delimitadas (Fig 8C) y cuando los trofozoitos han fagocitado, el antígeno se dispersa heterogeneamente sobre la superficie celular (Fig 8D).

f) Inducción de "capping" por suero inmune en E. histolytica

Los anticuerpos del suero de conejo anti-E. histolytica HMI:IMSS, se unieron a la membrana de los trofozoitos, induciendo una redistribución polar de los componentes de superficie. Conforme el fenómeno de "capping" progresó, la acumulación polar de los anticuerpos estuvo concentrada en la región del uroide de las células. La morfología de los "caps" fué heterogénea, variando de medias lunas superficiales a vesículas bien definidas. Estas formas variadas de redistribución superficial representaron una progresión del fenómeno de "capping", que finalizó con la desaparición del anticuerpo de la superficie de los trofozoitos y la reaparición de algunos antígenos (Figura 9).

Figura 9. - Inducción de redistribución de antígenos de superficie (capping) en E. histolytica HM1:1MSE, utilizando suero inmune. Los trofozoitos fueron expuestos a los acs. en frío, posteriormente se lavaron e incubaron a 37°C por diferentes tiempos.

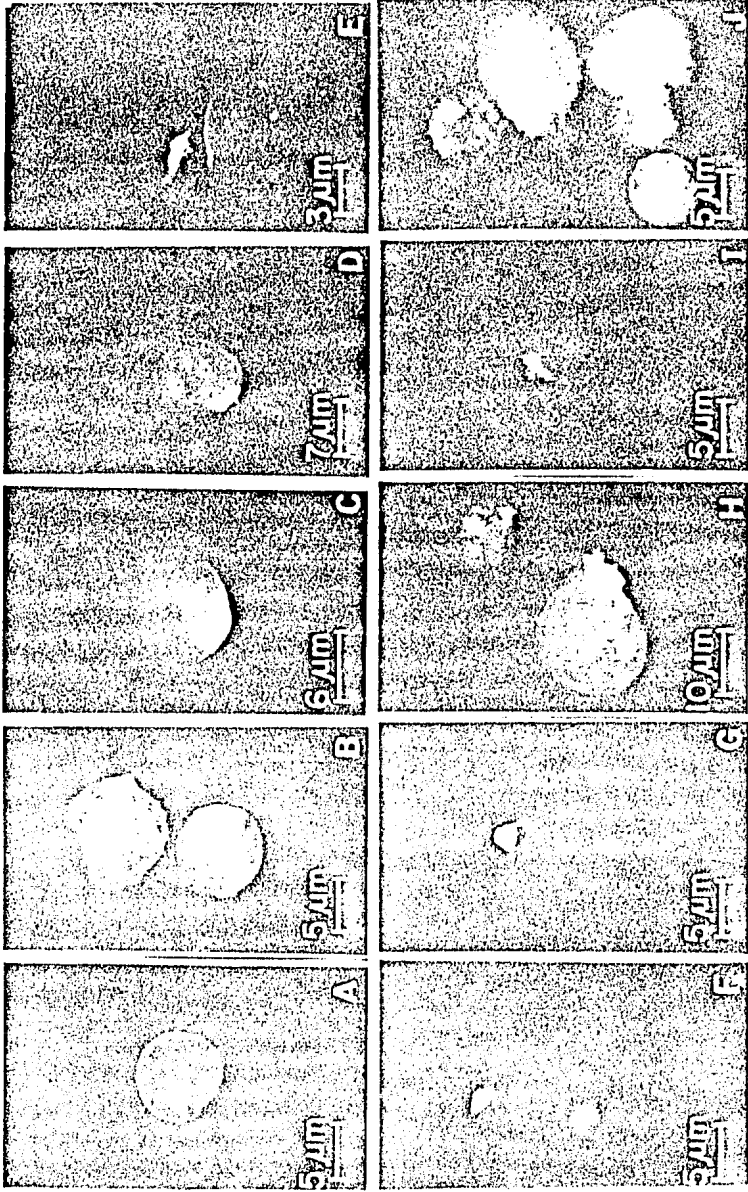
Panel A. Fluorescencia confluyente en la membrana que indica la distribución fortuita de antígenos en E. histolytica definida por la unión de acs. poliespecíficos.

B, C, D, E y F. En estos esquemas se aprecia que los acs. unidos inicialmente a la membrana empiezan a ser redistribuidos hacia la región del uroide, a los tiempos 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 minutos de incubación a 37°C. Se observa que la morfología de los antígenos redistribuidos es muy variada.

Panel G. En esta figura se observa que a los 15 minutos de incubación a 37°C, el "cap" se ha formado totalmente.

H e I. Pasados los 30 minutos de incubación, el "cap" empieza a ser liberado.

Panel J. Este fenómeno de "capping" finalizó con la desaparición del "cap" de la superficie de los trofozoitos. Tomada a los 60 minutos de incubación a 37°C.



VIII. DISCUSION

Considerando la propiedad biológica de E. histolytica de redistribuir moléculas superficiales cuando interacciona con ligandos como anticuerpos poliespecíficos (29, 30, 31), el análisis de la distribución topográfica de antígenos reconocidos por algunos anticuerpos monoclonales anti-amiba, fué realizado en trofozoitos fijados.

Para llevar a cabo la fijación celular, se emplearon diferentes fijadores que han mostrado su efectividad en otros tipos celulares (43, 44, 45), sin embargo en este caso, algunos destruían a los trofozoitos y no era conveniente para nuestros fines, ya que pretendíamos detectar antígenos en las células intactas. Otro aspecto importante fué el problema de autofluorescencia, ocasionada por fijadores como el glutaraldehído, pues a pesar de ser el que mejor preservó la morfología (Figura 2), provocó marcada autofluorescencia. Este fijador posee un gran potencial entrecruzador, razón por la cual conserva muy bien la morfología, sin embargo, modifica la estructura química y conformacional de algunos antígenos dificultando su detección por inmunofluorescencia (40).

También se probaron mezclas de fijadores en las que se combinaban fijadores suaves como el formaldehído y otros fuertes como el glutaraldehído, en un intento por mejorar la propiedades que cada uno de ellos presenta por separado. Se eligió una de estas mezclas (Tabla 1, solución 7) porque mantuvo en buenas condiciones la morfología de los trofozoitos y ocasionó el menor grado de autofluorescencia. Los resultados obtenidos, indican que los epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales, conservaron su antigenicidad aún después de la fijación.

Al estudiar la localización topográfica con los 8 acs. mos., se observó que 6 acs. definieron antígenos homogéneamente distribuidos sobre la superficie de la célula (los acs. A8 y C6 sólo en el 25% de la población), en cambio los acs A8 y C6 en un 25% y A57 revelaron antígenos localizados en áreas discretas de la membrana.

Respecto al segundo patrón de distribución, consideramos que estas observaciones son novedosas en el campo de la biología celular de E. histolytica, ya que indican que algunos antígenos de la membrana plasmática se distribuyen heterogéneamente, organizándose además en dominios antigénicos que pudieran estar implicados en la realización de ciertas actividades biológicas importantes para el parásito.

En torno a estas observaciones, es sabido que los antígenos de la membrana plasmática son proteínas o glucoproteínas embebidas en diferentes grados en la bicapa lipídica (46). Bajo condiciones normales se espera que la distribución de dichas moléculas tenga un carácter fortuito (

47) sin embargo, es posible encontrar de manera natural, utilizando modelos matemáticos, diferentes grados de agrupamiento para algunos determinantes de la membrana, sugiriendo que esta organización puede ser relevante desde el punto de vista funcional (48). También se ha reportado en linfocitos de mamífero que el antígeno de espectrina se encuentra organizado en forma de un "cap" discreto, cuando se revela con un antisuero contra alfa-espectrina de eritrocitos de pollo (49).

Al determinar la frecuencia de tinción sobre la población de E. histolytica HM1 (Figura 4), se encontró que 2 de los acs. mos. presentaron patrones de reconocimiento diferentes, excluyentes entre si, y ausencia de reactividad en la mitad de la población. Esto parece indicar que la población de amibas de una cepa dada, posiblemente esté compuesta por subpoblaciones diferentes, al menos en lo que se refiere a la presencia y distribución de algunos antígenos, lo cual podría estar relacionado con los diferentes estadios del ciclo celular, ya que no se trabajó con cultivos sincronizados.

Del análisis de reactividad cruzada de los monoclonales anti-E. histolytica con otras especies de Entamoeba, se observó que ninguno de los anticuerpos mostró reactividad con especies no histolyticas, lo que indica que estos reactivos son especie-específicos.

Al tratar de definir si los antígenos revelados por algunos monoclonales estaban involucrados en la fagocitosis, encontramos que el patrón de tinción mostrado por el ac. A57, sufrió marcados trastornos en su distribución a diferencia de los otros acs. ensayados, lo que podría sugerir que el antígeno reconocido por dicho anticuerpo se ubica en zonas donde se localizan canales endocíticos, sin embargo, esto no puede afirmarse ya que para ello se deben realizar otro tipo de estudios como inhibición de la fagocitosis, que apoyen su participación en el proceso.

Fué posible inducir "capping" de componentes de superficie en E. histolytica utilizando una capa simple de acs. poliespecíficos. Este fenómeno no fué el resultado de una segregación espontánea, ya que como se observa el inicio, los anticuerpos reaccionaron homogéneamente sobre la superficie de los trofozoitos (Figura 9A), posteriormente en las diferentes etapas, los antígenos fueron redistribuidos hacia la zona del uroide, hasta que a los 15 minutos ocurrió la formación del "cap". El proceso culminó con la liberación del "cap" de la célula.

El proceso de "capping" ha sido estudiado principalmente en linfocitos empleando anticuerpos específicos para receptores definidos (50, 51), en un intento por establecer los mecanismos mediante los cuales ocurre la segregación superficial de moléculas. Se ha observado que utilizando

fragmentos monovalentes de anticuerpo no es posible inducir redistribución de moléculas de superficie, ya que estos fragmentos solamente tienen un sitio de unión para el antígeno y por lo tanto no puede ocurrir el entrecruzamiento contiguo de las proteínas de la membrana (52).

En el caso de E. histolytica el estudio de este proceso resulta de gran interés, ya que como se ha sugerido anteriormente (29, 30, 31) posiblemente le permita evadir la respuesta inmune del huésped. Por esta razón deseabamos estandarizar el método de inducción de "capping", para posteriormente aplicarlo al análisis de la dinámica de las moléculas de superficie, mediante anticuerpos monoclonales.

Sentimos que el contar con acs. mos. contra antígenos de la membrana plasmática de E. histolytica ofrece ventajas para la purificación y el análisis de moléculas de superficie, para correlacionarlas posteriormente con actividades biológicas como adhesión, fagocitosis, citotoxicidad, etcétera. Por otra parte contar con acs. mos. especie-específicos, permite el desarrollo de reactivos para inmunodiagnóstico y tipificación. Además facilitan el estudio de la participación de la respuesta inmune en la infección amibiana y el análisis de la dinámica de distribución molecular en la membrana plasmática de la amiba

IX. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo fueron:

- 1.- La mezcla fijadora que mejor funcionó para nuestro estudio fue formaldehído 3.7%-glutaraldehído 0.0075%.
- 2.- De 8 anticuerpos monoclonales contra antígenos de E. histolytica analizados, sólo uno de los anticuerpos no mostró reactividad con antígenos de la superficie externa de la membrana plasmática.
- 3.- Tres monoclonales revelaron antígenos distribuidos heterogeneamente sobre la superficie de los trofozoitos, indicando la existencia de dominios antigénicos discretos en condiciones nativas.
- 4.- Dos de los anticuerpos reaccionaron con un bajo porcentaje celular en la población de E. histolytica HMI:IMSS, sugiriendo que el antígeno reconocido por estos anticuerpos quizás se expresa diferencialmente, dependiendo de la etapa del ciclo celular en que se encuentren los trofozoitos.
- 5.- Todos los anticuerpos monoclonales mostraron reactividad exclusivamente para antígenos de E. histolytica.
- 6.- Únicamente el antígeno revelado por el anticuerpo A57 sufrió trastornos en su patrón de distribución después de la fagocitosis, posiblemente porque se encuentre involucrado en este proceso.
- 7.- Es posible inducir redistribución de antígenos de superficie (capping) utilizando una sola capa de anticuerpos específicos en concentraciones elevadas.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pérez-Tamayo, R., Brand, H. (1970) Amebiasis In: Marcial-Rojas, ed. Pathology of Protozoal and Helminthic diseases. Huntington, New York. 145-187.
- 2.- Lee-Ramos, A.F., González-Montesinos, F. (1970) Pronóstico de la amebiasis invasora del hígado. Arch. Invest. Méd. (Méx.)1(Suppl): S199-S204.
- 3.- Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N. and Sepúlveda, E. (1976) National serologic survey. II search for antibodies against E. histolytica in México. Sepúlveda, E. and Diamond, L.S. eds. Proceedings of the International Conference on Amebiasis, I.M.S.S., México, 609-618.
- 4.- Trissi, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R. and Pérez de Suárez, E. (1978) Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med. 148: 1137-1145.
- 5.- Trissi, D., Martínez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R. (1977) Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study several Entamoeba strains. J. Exp. Med. 145: 652-665.
- 6.- Muñoz, M.L., Calderón, J. and Rojkind, M. (1982) The collagenase of E. histolytica. J. Exp. Med. 155: 42-51
- 7.- Bos, H.J. (1979) Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts; isolation and characterization of an intracellular toxin. Exp. Parasitol. 47: 369-377.
- 8.- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.E., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F. and Pittman, F.E. (1979) Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 139: 9-17.
- 9.- Wittner, M. and Rosenbaum, M. (1970) Role of bacteria in modifying virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 755-761.
- 10.- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. (1979) Pathogenicity of axenically cultivated Entamoeba histolytica, strain 200:NIH, in the hamster. J. Parasitol. 65: 768-771.

- 1.- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.E. and Pittman, F.E. (1978) Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 248-254.
- 12.- Bos, H.J. and Vand de Griend, R.J. (1977) Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica. Nature 265: 341-343.
- 13.- Huidt, G., Davies, P., Allison, A.C. and Schorlemmer, H.U. (1979) Interactions between Entamoeba histolytica and complement. Nature 277: 214-216.
- 14.- Ortíz-Ortíz, L., Capin, R., Capin, N.R. Sepúlveda, B. and Zamacona, G. (1978) Activation of the alternative pathway of complement by Entamoeba histolytica. Clin. Exp. Immunol. 34: 10-18.
- 15.- Capin, R., Capin, N.R., Carmona, R. and Ortíz-Ortíz, L. (1980) Effect of complement depletion on the induction of amebic liver abscess in the hamster. Arch. Invest. Méd. (Méx) 11, Suppl 1: 173-180.
- 16.- Calderón, J. and Tovar-Gallegos, R. G. (1980) Loss of susceptibility to antibodies and complement-mediated lysis in Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx) II (Suppl) 241.
- 17.- Ortíz-Ortíz, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B. and Capin, N.R. (1975) Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. Clin. Immunol. Immunopathol. 4: 127.
- 18.- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
- 19.- Yoshida, N., Nussenzweig, R.S., Potochnjak, P., Nussenzweig, V. and Aikawa, M. (1980) Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. Science 207: 71-79.
- 20.- Epstein, N., Miller, L.H., Kaushel, D.C., Udeinya, I.J., Renner, J., Howard, R.J., Asofsky, R., Aikawa, M. and Hess, R.L. (1981) Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malarial (Plasmodium knowlesi) merozoites block erythrocyte invasion. J. Immunol. 127: 212-217.
- 21.- Diamond, L.S., Harlow, D.R. and Cunnick, C.C. (1978) A new medium for axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 431-433.

- 22.- Boonpucknavic, S., Lynraven, G.S., Nairn, R.C. and Ward, H.A. (1967) Subcellular localization of Entamoeba histolytica antigens. *Nature* 216: 1232-1233.
- 23.- Mc. Laughlin, J. and Meerovitch, E. (1975) The surface and cytoplasmic membranes of Entamoeba invadens (Rodhain 1934) I. Gross chemical and enzymatic properties. *Comparative biochemistry and physiology* 52B: 477-486.
- 24.- Arroyo-Begovich, A. (1978) Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hámster lactante. E. Material antigénico. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 9, Suppl 1: 311-314.
- 25.- O'Shea, M.S. and Feria-Velasco, A. (1974) Demostración ultramicroscópica de antígenos de superficie en trofozoitos de Entamoeba histolytica por inmunofluorescencia con Ig G humana específica. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 5, Suppl 2: 307-314.
- 26.- Aley, S.B., Scott, W.A. and Cohn, Z.A. (1980) Plasma membrane of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 152: 391-404.
- 27.- Lushbaugh, W.B. and Miller, J.H. (1974) Fine structural topochemistry of Entamoeba histolytica Schaudin, 1903. *J. Parasitol.* 60: 421-433.
- 28.- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. and Chávez de Ramírez, B. (1976) Ultrastructural study of various Entamoeba strains. In proceedings of the International Conference on Amebiasis. Ed. B. Sepúlveda and L.S. Diamond, I.M.S.S. México, 226-237.
- 29.- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A. and González-Robles, A. (1975) Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation and microexudate. *J. Cell. Biol.* 64: 538-550.
- 30.- Aust-Kettis, A. and Sundqvist, K.G. (1978) Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response. Capping and endocytosis; influence of inhibiting and accelerating factors; variation of the expression of surface antigens. *Scand. J. Immunol.* 7: 35-44.
- 31.- Calderón, J., Muñoz, M.L. and Acosta, H.M. (1980) Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoebae. *J. Exp. Med.* 151: 184-193.
- 32.- Calderón, J. and Avila-Muro, E.E. Antibody-induced cap in E. histolytica: Isolation and electrophoretic

- analysis. En prensa J. Infect. Dis. Mayo 1986.
- 33.- Krupp, I. M. (1977) Definition of the antigenic pattern of Entamoeba histolytica, and immunoelectrophoretic analysis of the variation of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 387-392.
 - 34.- Bos, H.J. (1978) Fractionation and serological characterization of Entamoeba histolytica antigen. Acta Leidensia 45: 105-116.
 - 35.- Chang, S.M., Lin, C.M., Dussanic, D.G. and Cross, J.H. (1979) Antigenic analysis of two axenized strains of Entamoeba histolytica by two-dimensional immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 28: 845-853.
 - 36.- Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1971) Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas Publisher. Springfield Illinois, 709.
 - 37.- Johnson, G.D., Holborow, E.J. and Dorling, J. (1978) Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In Handbook of Experimental Immunology. D. M. Weir, editor. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. 15.1-15.22.
 - 38.- Lefkovits, I. and Pernis, B. (1979) Immunological Methods. Academic Press. New York, 158.
 - 39.- Sternberger, L.A. (1979) Immunocytochemistry 2nd ed. John Wiley and Sons. New York. 24-58.
 - 40.- UNDP/WORLD BANK/WHO. Hybridoma Technology with special reference to parasitic diseases. Special Programme for research and training in tropical diseases.
 - 41.- Johnson, G.D. and Nogueira-Araujo, G.M. de C. (1981) A simple method reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J. Immunol. Meth. 43: 349-350.
 - 42.- Goding, J.W. (1983) Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press. New York, 208-249.
 - 43.- Bosman, F. T., Lindeman, J., Kuiper, G., van der Wal, A. and Kreuning, J. (1977) The influence of fixation on immunoperoxidase staining of plasmacells in paraffin sections of intestinal biopsy specimens. Histochemistry 53: 57-62.
 - 44.- Osborn, M., Webster, R.E. and Weber, K. (1978) Individual microtubules viewed by immunofluorescence and

- electronic microscopy in the same PtK2 cell. *J. Cell Biol.* : R27-R34.
- 45.- Biberfeld, P., Biberfeld, G., Molnar, Z. and Fagraeus, A. (1974) Fixation of cell-bound antibody in the membrane immunofluorescence test. *J. Immunol. Meth.* 4: 135-148.
- 46.- Schauenstein, K. and Wick, G. (1982) Membrane immunofluorescence. In *Immunofluorescence technology, selected theoretical and clinical aspects.* Wick, G., Traill, K.N. and Schauenstein, K. eds. Elsevier Biomedical Press. Oxford, 37-49.
- 47.- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- 48.- Abbas, A.K., Ault, K.A., Karnosky, M.J. and Unanue, E.R. (1975) Non-random distribution of surface immunoglobulin on murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 114: 1197-1204.
- 49.- Repasky, E.A., Symer, D.E. and Bankert, R.B. (1984) Spectrin immunofluorescence distinguishes a population of naturally capped lymphocytes in situ. *J. Cell Biol.* 99: 350-355.
- 50.- de Petris, S., Raff, M.C. (1973) Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. *Nature New Biol.* 241: 257-259.
- 51.- Quinn, P.J. (1976) *The molecular biology of cell membranes.* the Macmillan Press Ltd. London, 88-94.
- 52.- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1983) *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc. New York, 276-283.